Entwicklung neuartiger Wirt - Vektor Systeme mit breitem Wirtsspektrum zum funktionsbasierten Screening von Metagenombanken

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sonja Christina Tröschel

aus Bad Soden am Taunus

Düsseldorf, Mai 2010

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger
Korreferent: Prof. Dr. Martina Pohl
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2010

Diese Arbeit ist Christian
und meinen Eltern gewidmet.

Gott gibt die Nüsse, aber er knackt sie nicht auf.

Johann Wolfgang von Goethe

(1749-1832)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei…

… Herrn Prof. Dr. Jäger für das interessante Thema, sowie die gewährte Freiheit bei dessen Ausgestaltung, für sein Interesse an meiner Arbeit, die guten Arbeitsbedingungen, die Möglichkeit der Weiterbildung und für seine Unterstützung beim Anerkennungsverfahren und bei Veröffentlichungen.

… Frau Prof. Dr. Pohl für die freundliche Übernahme des Koreferates, die konstruktiven Diskussionen und für die Vermittlung von Sensibilität und der Fähigkeit zur Reflektion.

… dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, für dessen Förderprogramm Genomik-Plus und die dadurch gewährte Finanzierung.

… der Frenken Vieh- und Fleisch GmbH für die Möglichkeit zur Probennahme.

… Frau Dr. Wilhelm und Herrn Dr. Rosenau für die engagierte Betreuung, die anregenden Diskussionen und jederzeit angebotenen Hilfestellungen, sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

… Herrn Dr. Drepper, Herrn Dr. Bertram und Herrn Dr. Leggewie für fachliche Anregungen und angenehme Gespräche.

… den Mitgliedern des IMETs, insbesondere der Arbeitsgruppe Mikrobielle Expression, für das gute Arbeitsklima und die vielen praktischen Ratschläge.

… Frau Dipl.-Biol. Link und Frau Dipl.-Biol. Real für die produktive Zusammenarbeit und die experimentelle Unterstützung, ohne diese viele Aspekte der Arbeit nicht hätten untersucht werden können, sowie für das Lesen der Dissertation. Vielen Dank Olga für deine Hilfe beim Picken der Klone und vielen Dank Catherine für dein Engagement bei der Entwicklung des Elektroporationsprotokolls für *P. putida*.

… Herrn Prof. Dr. Streit und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere bei Frau Dr. Perner, für die Hilfe bei der ribosomalen DNA-Analyse.

… Herrn Prof. Dr. Gottschalk und Herrn Prof. Dr. Daniel, sowie den Mitarbeitern des Göttinger *Genomics Laborartory,* für die Sequenzierung der Plasmide.

… der BRAIN AG und deren Mitarbeitern für die solide Ausbildung während meiner Diplomarbeit.

… Herrn Prof. Dr. Holstein für sein Engagement und seine Hilfe bei wichtigen Entscheidungen während meines Studiums und der Promotion, ohne die mein Lebensweg anders verlaufen wäre.

… meinen Freunden und meiner Familie für den Rückhalt und die schöne Zeit.

… meinen Eltern für die liebevolle und finanzielle Unterstützung.

… Christian, der immer für mich da ist. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft.

Zusammenfassung

Hintergrund: Das Metagenom, die Gesamtheit aller genomischen Information der Organismen eines Habitats, wird als unerschöpfliche Quelle für bioaktive Moleküle angesehen. Da nur ein Bruchteil dieser Organismen kultivierbar ist (< 1%) kann die Information nicht genutzt werden. Daher können kulturunabhängige Verfahren, in denen die metagenomische DNA isoliert, kloniert und durchmustert wird, angewendet werden. Aktivitätsbasierte Screenings sog. Metagenombanken hängen von der funktionalen Genexpression und Proteinsynthese im heterologen Organismus ab. Die Verwendung unterschiedlicher heterologer Wirte eröffnet dabei zusätzliches Expressionspotential und führt zur Detektion einer größeren Anzahl und Vielfalt von bioaktiven Molekülen.

Zielsetzung: Ein Modulsystem aus neuartigen Shuttle-Vektoren und verschiedenen bereits etablierten bakteriellen Wirten sollte entwickelt werden, um heterologe Genexpression und Proteinsynthese parallel in verschiedenen Organismen untersuchen zu können.

Ergebnisse: Erstmalig konnte in dieser Arbeit eine Serie von Shuttle-Vektoren, die in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas putida* strukturell stabil vorlagen, entwickelt werden. Diese wurden gemäß ihrem Wirtsspektrum pEBP genannt. Die Verwendung des Vektors pEBP18 als Expressionsplasmid wurde in den oben genannten Wirten durch Analysen der Expression von zwei lipolytischen Enzymen und von GFP validiert.
Für Metagenom-Analysen wurden Proben aus verschiedenen Bodenabflüssen in einem Schlachthof entnommen. Kultivierbare Organismen wurden angereichert, morphologisch beschrieben und über ribosomale DNA-Analysen klassifiziert. Weiterhin wurde metagenomische DNA in den Vektor pEBP18 kloniert. Die erzeugten Genbanken wurden funktionsbasiert durchmustert. In *E. coli* (5×10^5 Klone) wurden Klone mit lipolytischer, proteolytischer und hämolytischer Aktivität, sowie ein Pigment-produzierender Klon detektiert. Weiterhin kam es bei 0,25% aller Kolonien zur Expression des Transkriptionsreporters GFP durch die Erkennung von Promotoren, die durch die metagenomische Insert-DNA kodiert wurden. In *P. putida* (8×10^4 Klone) wurden viele Klone mit Esterase-/Lipase- und einige mit Protease-Aktivität gefunden. Ausgewählte Plasmide der Genbanken wurden in alle drei Wirte übertragen. Es konnten unterschiedliche Aktivitäten der Klone festgestellt werden.

Fazit: Die neuartigen Shuttle-Vektoren sind universell als Cosmide, Expressionsplasmide und *genetic trap* Vektoren einsetzbar. Weiterhin können sie als Genbankvektoren in *E. coli*, *B. subtilis* und *P. putida* genutzt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit viele neuartige, bioaktive Molekülen des Metagenoms zu identifizieren.

Abstract

Background: The metagenome, the genetic information of all organisms in a given habitat, is an untapped resource for bioactive molecules. Considering that only a small part of microorganisms is cultivable (< 1%) most of the biological information is not accessible. Therefore, culture-independent methods comprising isolation of DNA as well as the construction and screening of clone libraries have been established. Activity-based analysis of metagenomic libraries rely on functional gene expression and protein synthesis in the heterologous host. Thus, additional expression capability will be gained, if the range of bacterial hosts is expanded leading to the detection of a larger amount and variety of bioactive molecules.

Aim: Construction of a modular system of novel shuttle-vectors for the use in different well established bacterial host organisms developed for simultaneous study of heterologous gene expression and protein production.

Results: For the first time, a set of shuttle-vectors was developed which were stable in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* and were named pEBP due to their host spectra. The utilisation of the vector pEBP18 as expression plasmid was confirmed by studying expression of two lipolytic enzymes and GFP functioning as transcriptional reporter.
For metagenomic analysis, samples were collected from bottom drains in a butchery. Cultivable organisms were enriched, described by morphology, and classified by ribosomal DNA analysis. Metagenomic DNA was cloned into the vector pEBP18. The resulting libraries were screened for enzymatic activities. In *E. coli* libraries (5×10^5 clones) lipolytic, proteolytic, and hemolytic activity, and one pigment producing clone were detected. In addition, 0,25% of all clones showed GFP expression which was caused by metagenomic DNA encoded promoters, maybe useful for other expression studies. Various clones with lipolytic and just a few clones with proteolytic activity were detected in *P. putida* (8×10^4 clones). Furthermore, a subset of plasmids was shuttled into all three hosts where varying activities were observed.

Conclusion: The novel shuttle-vectors can be applied as cosmids, expression plasmids, and genetic trap vectors. In addition, these vectors can be utilized to screen libraries in *E. coli*, *B. subtilis* and *P. putida*. Thus, a novel and unique method was developed to mine metagenomes for bioactive molecules.

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Publikationen

Troeschel, S.C., Drepper, T., Leggewie, C., Streit, W.R., and Jaeger, K.-E. (2010) Novel tools for the functional expression of metagenomic DNA. In: Streit, W.E. (ed.) *Molecular Methods in Metagenomics*. In press, Humana Press, Totowa (USA).

Troeschel, S.C., Drepper, T., Ehrenreich, A., and Jaeger, K.-E. (2010) Tools to discover novel enzymes from environmental DNA. *J Biotechnol*, in preparation.

Rosenau, F., Troeschel, S.C., Link, O., Real, C.I., Wilhelm, S., and Jaeger, K.-E. (2010) Construction of a broad host range shuttle-vector for activity-based screening of metagenomic libraries. In preparation.

Vortrag

Troeschel, S.C. Novel shuttle vectors to construct metagenomic libraries. Workshop: Functional Genomics and Industrial Biotechnology. Graz, 2008.

Posterpräsentationen

Thies, S., Troeschel, S.C., Rosenau, F., and Wilhelm, S. Physiology of biosurfactant production: metabolic and physiological prerequisites for the functional screening of metagenomic libraries. CLIB - Graduate Cluster Industrial Biotechnology - 1st Annual Retreat. Wuppertal, 2010.

Troeschel, S.C., Real, C.I., Wilhelm, S., Rosenau, F., and Jaeger, K.-E. Novel shuttle vectors to construct metagenomic libraries. ProkaGenomics 2009 - 4th European Conference on Prokaryotic Genomics. Göttingen, 2009.

Troeschel, S.C., Real, C.I., Bertram, M., and Jaeger, K.-E. A novel shuttle vector for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas species*. 27th Symposium - Mechanisms of Gene Regulation. Witzenhausen, 2008.

Troeschel, S.C., Leggewie, C., and Jaeger, K.-E. Construction of a cosmid based shuttle vector. ProkaGenomics 2007 - 3rd European Conference on Prokaryotic Genomics. Göttingen, 2007.

Inhalt

Danksagung ..... **VI**

Zusammenfassung ..... **VII**

Abstract ..... **VIII**

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion ..... **IX**

Inhalt ..... **X**

Tabellen und Abbildungen ..... **XIV**

Abkürzungen ..... **XVII**

Begriffsdefinitionen ..... **XX**

1 Einleitung **1**

1.1 Was ist Metagenomik und zu welchen Zwecken wird sie genutzt? 1
1.2 Spezialisierung *versus* Diversität 3
1.3 Wie erschließt man das Metagenom? 4
1.4 Wie kann man funktionsbasierte Screenings in *E. coli* verbessern? 5
1.5 Welche alternativen bakteriellen Wirte gibt es? 7
1.6 Zielsetzung 8

2 Material und Methoden **10**

2.1 Geräte 10
2.2 Software, Programme und Websiten 11
2.3 Chemikalien 11
2.4 Reaktions- und Nachweis-Kits 13
2.5 Plasmide 14
2.6 Oligonukleotide 15
2.7 Enzyme 17
2.8 Bakterienstämme 18
2.9 Kultivierung von Bakterien 18
2.9.1 Nährmedien 18
2.9.2 Antibiotika 19
2.9.3 Wachstumsbedingungen und Lagerung von Bakterien 19
2.10 Probennahme im Schlachthof, Probenaufarbeitung und Kultivierung 19
2.10.1 Probennahme 19
2.10.2 Probenvorbereitung 20
2.10.3 Anreicherung kultivierbarer Mikroorganismen des Schlachthofs in Flüssigkultur 20
2.10.4 Vereinzelung kultivierbarer Mikroorganismen des Schlachthofs 20
2.11 Mikroskopie 20
2.12 Nachweis von Hydrolasen durch Kultivierung auf Substratagar 20
2.12.1 Nachweis von Amylase-Aktivität auf Stärkeplatten 21
2.12.2 Nachweis von hämolytischer Aktivität auf Blutagar 21
2.12.3 Nachweis proteolytischer Aktivität auf *skim milk*-Agar 21

2.12.4 Nachweis estero-/lipolytischer Aktivität auf Tributyrin-Agar ... 22
2.12.5 Nachweis lipolytischer Aktivität auf Rhodamin B-Agar ... 22
2.13 Blau-Weiß-Selektion über α-Komplementation in *E. coli* ... 22
2.14 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren ... 22
2.14.1 Standard ‚Mini' Präparation ... 22
2.14.2 Isolierung metagenomischer DNA ... 23
2.14.3 Präzipitation von DNA durch Isopropanol-Fällung ... 23
2.14.4 Phenol-Chloroform Extraktion ... 24
2.14.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ... 24
2.14.5.1 Tüpfeltest ... 24
2.14.5.2 Photometrische Bestimmung ... 24
2.14.6 Berechnung der Stoffmenge von DNA ... 25
2.15 *in vitro* Modifikation von DNA ... 25
2.15.1 Hybridisierung des Polylinkers ... 25
2.15.2 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme (RE) ... 25
2.15.3 Partialverdau von metagenomischer DNA ... 26
2.15.4 *blunting* ... 26
2.15.5 Dephosphorylierung von DNA ... 27
2.15.6 Ligation von DNA-Fragmenten ... 27
2.15.7 Ligationskontrolle ... 27
2.15.8 Vorbereitung episomaler Plasmide für die Transformation von *B. subtilis* über natürliche Kompetenz ... 27
2.16 Agarose Gelelektrophorese (AGE) ... 28
2.17 Elektroelution ... 28
2.18 Amplifikation von DNA durch PCR ... 29
2.18.1 Standard-PCR ... 29
2.18.2 Kolonie-PCR ... 29
2.18.3 *overlap extension* PCR (oePCR) ... 29
2.18.4 *real time* PCR (RT-PCR) ... 29
2.19 Bestimmung der Plasmid-Kopienzahl über RT-PCR ... 30
2.20 Klonierungen ... 30
2.20.1 Klonierung ribosomaler DNA ... 30
2.20.2 Standard-Klonierung von PCR Produkten ... 31
2.20.3 Subklonierung von DNA ... 31
2.21 Sequenzierung ... 31
2.21.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA ... 31
2.21.2 Sequenzvisualisierung und -auswertung ... 31
2.22 Phylogenetische Analyse von ribosomaler DNA ... 32
2.23 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA ... 32
2.23.1 Berechnung der Transformationseffizienz ... 32
2.23.2 Berechnung der Transformationsrate ... 32
2.23.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* ... 33
2.23.4 Chemische Transformation von *E. coli* ... 33
2.23.5 Elektro-Transformation von *E. coli* DH10b ... 33
2.23.6 Transformation von *B. subtilis* über natürliche Kompetenz ... 34
2.23.7 Elektro-Transformation von *P. putida* ... 34
2.24 Protein Expression und Probenaufarbeitung ... 35

2.24.1 Expression ... 35
2.24.2 Aufarbeitung des Kulturüberstandes ... 35
2.24.3 TCA-Fällung der Proteine des Kulturüberstands ... 35
2.24.4 Aufarbeitung des Zellpellets für SDS-PAGE Analysen ... 36
2.24.5 Zellaufschluss ... 36
2.24.6 Löslichkeits-Test ... 36
2.25 Aktivitätstests ... 36
2.25.1 GFP-Fluoreszenz Messung ... 36
2.25.2 Nachweis lipolytischer Enzymaktivität ... 36
2.26 SDS-PAGE ... 37
2.27 Western Blot ... 37

3 Ergebnisse und Diskussion ... 39

3.1 Konstruktion von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas* sp. Shuttle-Vektoren ... 39
3.1.1 Konstruktion von Shuttle-Vektoren der pEBP10er-Serie ... 40
3.1.1.1 Ursprungsplasmid pWE21 ... 41
3.1.1.2 Klonierung von pEBP10 ... 41
3.1.1.3 Analyse und Annotation der ‚verkürzten minimalen Region' minR' ... 43
3.1.1.4 Klonierung von pEBP12 ... 46
3.1.1.5 Klonierung von pEBP14 ... 49
3.1.1.6 Klonierung und Charakterisierung von pEBP18 ... 50
3.1.2 Konstruktion von Vektoren der pEBP20er-Serie ... 54
3.1.2.1 Elimination des ColE1 *ori* auf Basis von pEBP10, pEBP14 und pEBP18 ... 54
3.1.2.2 *in silico* Sequenzvergleiche der pNI10-Derivate ... 56
3.1.2.3 Elimination des ColE1 *ori* auf Basis von pEBP191 ... 57
3.1.2.4 Elimination des ColE1 *ori* auf Basis von pEBP193 ... 59
3.1.2.5 Fazit ... 62
3.2 Entwicklung eines effizienten Protokolls zur Elektroporation von *Pseudomonas putida* KT2440 ... 62
3.3 Heterologe Expression von Reportergenen mit pEBP18 ... 65
3.3.1 Insertion der Reportergene in pEBP18 ... 67
3.3.2 Heterologe Expression in *E. coli* BL21 (DE3) ... 68
3.3.3 Heterologe Expression in *P. putida* KT2440T7 ... 73
3.3.4 Expression in *B. subtilis* TEB1030 ... 76
3.3.5 Fazit ... 79
3.4 Metagenom-Analyse des Habitats ‚Schlachthof' ... 80
3.4.1 Probennahme und Beschreibung ... 81
3.4.1.1 Probe P1 ... 81
3.4.1.2 Probe P2 ... 82
3.4.1.3 Probe P3 ... 82
3.4.1.4 Probe P4 ... 83
3.4.1.5 Probe P5 ... 83
3.4.1.6 Probe P6 ... 84
3.4.2 Anreicherung von kultivierbaren Organismen ... 84
3.4.2.1 Anreicherung von kultivierbaren Organismen in Flüssigkultur ... 84

3.4.2.2 Anreicherung von kultivierbaren Organismen als Plattenkultur ... 86
3.4.2.3 Vereinzelung der kultivierbaren Organismen der Plattenkulturen ... 87
3.4.3 Phylogenetische Analyse von Probe P4 ... 100
3.5 Identifizierung von Biokatalysatoren aus dem Metagenom ‚Schlachthof' ... 102
3.5.1 Isolierung und Fragmentierung der DNA aus Probe P4 ... 102
3.5.2 Konstruktion und Screening von Metagenombanken in *Escherichia coli* DH10b ... 104
3.5.2.1 Konstruktion von Metagenombanken in *E. coli* DH10b ... 104
3.5.2.2 Identifizierung von *E. coli* Genbankklonen mit hydrolytischer Aktivität ... 105
3.5.2.3 Identifizierung von GFP exprimierenden *E. coli* Genbankklonen ... 108
3.5.2.4 Analyse der konstitutiven GFP Expression ausgewählter Klone ... 110
3.5.3 Konstruktion und Screening von Metagenombanken in *P. putida* KT2440 ... 115
3.5.3.1 Konstruktion von Metagenombanken in *P. putida* KT2440 ... 115
3.5.3.2 Screening der Metagenombanken in *P. putida* KT2440 ... 115
3.5.3.3 Unterscheidung zwischen Esterase- und Lipase-Aktivität ... 116
3.6 ‚Kreuz-Expression' ... 117

4 Literaturverzeichnis ... 122

5 Anhang ... 139

Tabellen und Abbildungen

Abb. 1 Anzahl der Publikationen in der Metagenomik zwischen 1998 und 2009. 2
Abb. 2 Schematische Darstellung der durchzuführenden Teilaspekte der Metagenom-Analyse. 9
Abb. 3 Sequenz des Polylinkers. 25
Abb. 4 Schematische Darstellung von pWE21. 41
Abb. 5 Schematische Darstellung der Klonierung von pEBP10 auf Basis von pWE21. 42
Abb. 6 Schematische Darstellung von pEBP10. 43
Abb. 7 Schematische Darstellung von pNUK73. 44
Abb. 8 Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Replikationsproteine $RepA_{320}$ und $RepA_{346}$. 46
Abb. 9 Schematische Darstellung von pEBP12 sowie dessen Klonierung auf Basis von pEBP10. 47
Abb. 10 Schematische Darstellung der Klonierung von pEBP14 auf Basis von pEBP12. 49
Abb. 11 Schematische Darstellung der Klonierung von pEBP18 auf Basis von pEBP14. 51
Abb. 12 Schematische Darstellung von pEBP18. 52
Abb. 13 Analyse der Plasmid-Kopienzahl von pEBP18 in der exponentiellen Wachstumsphase in *E. coli* DH5α, *P. putida* KT2440 und *B. subtilis* TEB1030. 53
Abb. 14 Schematische Darstellung von pEBP10, pEBP14 und pEBP14. 55
Abb. 15 Schematische Darstellung von pNI10, pNI105 und pNUK73. 56
Abb. 16 Schematische Darstellung der Klonierung von pEBP191. 58
Abb. 17 Schematische Darstellung der (hypothetischen) Klonierung von pEBP192. 58
Abb. 18 Schematische Darstellung von pEBP18, pEBP191 und pEBP192. 59
Abb. 19 Schematische Darstellung von pEBP193 sowie dessen Klonierung. 60
Abb. 20 Analyse der PCR Produkte einer Standard-PCR zur Identifizierung von pEBP193 über AGE. 60
Abb. 21 Schematische Darstellung von pEBP193 bzw. pEBP24. 61
Abb. 22 Transformation von *P. putida* KT2440 mit pBBR1MCS2 durch Elektroporation. 64
Abb. 23 Heterologe Expression der *Bacillus subtilis* Lipase A (LipA) und der Cutinase (Cut) von *Fusarium solani pisi* in *E. coli* BL21 (DE3) auf Tributyrin-Agar. 68
Abb. 24 Photometrische Messung der GFP-Fluoreszenz in verschiedenen *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen. 69
Abb. 25 Nachweis von GFP im GZE verschiedenen *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen über einen Western Blot. 70
Abb. 26 Photometrische Messung der lipolytischen Aktivität in verschiedenen *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen. 71
Abb. 27 SDS-PAGE von Ganzzellextrakt und Überstand verschiedener *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen. 72
Abb. 28 Heterologe Expression der *Bacillus subtilis* Lipase A (LipA) und der Cutinase (Cut) von *Fusarium solani pisi* in *P. putida* KT2440T7 auf Tributyrin-Agar. 73
Abb. 29 Photometrische Messung der GFP-Fluoreszenz in verschiedenen *P. putida* KT2440T7-Stämmen. 74
Abb. 30 Nachweis von GFP im GZE verschiedenen *P. putida* KT2440T7-Stämmen über einen Western Blot. 74
Abb. 31 Photometrische Messung der intrazellulären lipolytischen Aktivität in verschiedenen *P. putida* KT2440T7-Stämmen. 75
Abb. 32 Heterologe Expression der *Bacillus subtilis* Lipase A (LipA) und der Cutinase (Cut) von *Fusarium solani pisi* in *B. subilis* TEB1030 auf Tributyrin-Agar. 77

Abb. 33 Nachweis der Transkription von *gfpmut3* während der Expression in verschiedenen *B. subtilis* TEB1030-Stämmen. ... 78
Abb. 34 Mikroskopische Darstellung von Zellen aus Probe P2. ... 82
Abb. 35 Mikroskopische Darstellungen von Zellen aus Probe P3. ... 83
Abb. 36 Mikroskopische Darstellungen von Zellen aus Probe P4. ... 83
Abb. 37 Mikroskopische Darstellungen von Zellen aus Probe P6. ... 84
Abb. 38 Anreicherung von kultivierbaren Organismen aus Probe P3, P4 und P6 in Flüssigkultur. ... 85
Abb. 39 Anreicherung von kultivierbaren Organismen des Schlachthofs als Plattenkulturen. ... 86
Abb. 40 *Operational Taxonomic Unit* 1 ... 88
Abb. 41 *Operational Taxonomic Unit* 2 ... 88
Abb. 42 *Operational Taxonomic Unit* 3 ... 88
Abb. 43 *Operational Taxonomic Unit* 4 ... 89
Abb. 44 *Operational Taxonomic Unit* 5 ... 90
Abb. 45 *Operational Taxonomic Unit* 6 ... 90
Abb. 46 *Operational Taxonomic Unit* 7 ... 91
Abb. 47 *Operational Taxonomic Unit* 9 ... 91
Abb. 48 *Operational Taxonomic Unit* 10 ... 92
Abb. 49 *Operational Taxonomic Unit* 11 ... 92
Abb. 50 *Operational Taxonomic Unit* 12 ... 92
Abb. 51 *Operational Taxonomic Unit* 14 ... 93
Abb. 52 *Operational Taxonomic Unit* 15 ... 93
Abb. 53 *Operational Taxonomic Unit* 16 ... 94
Abb. 54 *Operational Taxonomic Unit* 17 ... 94
Abb. 55 *Operational Taxonomic Unit* 18 ... 94
Abb. 56 *Operational Taxonomic Unit* 19 ... 95
Abb. 57 *Operational Taxonomic Unit* 20 ... 95
Abb. 58 *Operational Taxonomic Unit* 21 ... 96
Abb. 59 *Operational Taxonomic Unit* 22 ... 96
Abb. 60 *Operational Taxonomic Unit* 24 ... 96
Abb. 61 Phylogenetische Analyse der kultivierbaren Organismen des Schlachthofs. ... 98
Abb. 62 Phylogenetische Analyse der Organismen aus Probe P4. ... 101
Abb. 63 Analyse von isolierter DNA aus Probe P4. ... 103
Abb. 64 *E. coli* DH10b Genbankklone mit hydrolytischer Aktivität. ... 105
Abb. 65 Genbankklon *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} 458. ... 106
Abb. 66 Schematische Darstellung der *orfs* der Insert-DNA der Plasmide pEBP18_3-6Kb SM_{Ec} 679 und BA_{Ec} 354. ... 107
Abb. 67 GFP-exprimierende *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} I A1-H12. ... 109
Abb. 68 GFP-exprimierende Genbankklone *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} VI A1-A12. ... 109
Abb. 69 GFP-exprimierende *E. coli* DH5α Klone nach Transformation mit verschiedenen Plasmiden (pEBP18_3-6Kb (P4)) der *E. coli* DH10b Genbank. ... 111
Abb. 70 *E. coli* DH5α Kolonien kultiviert auf Vollmedium nach Transformation mit verschiedenen Plasmiden (pEBP18_3-6Kb (P4)) der *E. coli* DH10b Genbank. ... 112
Abb. 71 Restriktionsanalyse der Plasmide von vier *E. coli* DH5α pEBP18_3-6Kb (P4) BAI A2 Klonen. ... 113
Abb. 72 Photometrische Messung der GFP-Fluoreszenz in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. ... 114

Abb. 73 *P. putida* KT2440 Kolonien nach Transformation mit verschiedenen Plasmiden (pEBP18_3-6Kb (P4)) der *E. coli* DH10b Genbank auf Tributyrin-Agar und Rhodamin B-Agar. ... 116
Abb. 74 Schematische Darstellung der Expression von Biokatalysatoren in verschiedenen Wirten. ... 118
Abb. 75 Schematische Darstellung der Ergebnisse der ‚Kreuz-Expression'. ... 119

Tab. 1 Übersicht über die verwendeten Geräte. ... 10
Tab. 2 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Software, Programme und Websiten. ... 11
Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Chemikalien. ... 11
Tab. 4 Übersicht über die verwendeten Reaktions- und Nachweis-Kits. ... 13
Tab. 5 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. ... 14
Tab. 6 Übersicht über die verwendeten Sequenzierprimer. ... 15
Tab. 7 Übersicht über die verwendeten Primer für die 16S und 18S rDNA Amplifikation. ... 16
Tab. 8 Übersicht über die verwendeten Primer für die RT-PCR. ... 16
Tab. 9 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide zur Klonierung. ... 16
Tab. 10 Übersicht über die verwendeten Enzyme und ihre Bezugsquelle. ... 17
Tab. 11 Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme. ... 18
Tab. 12 Antibiotika. ... 19
Tab. 13 Deckelgrößen der *TrayCell* Messzelle und die dazugehörigen Parameter. ... 24
Tab. 14 Reaktionsansätze der Ligationskontrolle. ... 27
Tab. 15 Getestete Protokolle zur Elektroporation von *Pseudomonas putida* KT2440. ... 63
Tab. 16 Übersicht über die entnommenen Proben in den Räumen der Frenken Vieh- und Fleisch GmbH. ... 81
Tab. 17 Übersicht über verschiedene Aktivitäten von *E. coli* DH10b Genbankklonen. ... 105
Tab. 18 Detektionsfrequenz der identifzierten Aktivitäten der *E. coli* DH10b Genbank. ... 106
Tab. 19 Insert-Größe von Plasmiden von *E. coli* DH10b Klonen mit unterschiedlich starker Fluoreszenz. ... 110
Tab. 20 GFP-Fluoreszenz von *E. coli* DH10b Genbankklonen und DH5α Retransformanden. ... 111
Tab. 21 Aktivitäten der ‚Kreuz-Expression'. ... 119

Abkürzungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgelistet.

↕	Austausch einer DNA Sequenz
Δ	Deletion einer DNA Sequenz
Ø	Durchmesser
3’	dritte Kohlenstoffatom z.B. einer Desoxyribose
5’	fünfte Kohlenstoffatom z.B. einer Desoxyribose
à	je nach Kontext: für, für je, für jeweils, zu, zu je, zu jeweils (französisch)
AGE	Agarose Gelelektrophorese
Amp^R	Ampicillin Resistenz
*amy*E	α-Amylasegen (*B. subtilis*)
APH	Aminoglykosid-3’-Phosphotransferase
B. subtilis; $_{Bs}$	*Bacillus subtilis*
BAC	*bacterial artificial chromosome* (künstliches Bakterienchromosom)
Bp	Basenpaar(e)
bw	*backward* (rückwärts gerichtet)
cDNA	*complementary* DNA
cfu(s)	*colony forming unit(s)* (Kolonie-bildende Einheit(en))
Cm^R	Chloramphenicol Resistenz
ColE1	*colicinogenic factor* E_1, *E. coli* Replikationsursprung
cos	*cohesive end site* (kohäsive Enden der DNA bestimmter Phagen)
cut; Cut	Cutinase des Pilzes *Fusarium solani pisi* (Gen oder Protein)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
dsDNA	*double stranded* DNA (doppelsträngige DNA)
E. coli; $_{Ec}$	*Escherichia coli*
EC	*Enzyme Commission numbers* (numerisches Klassifikationssystem für Enzyme)
f	femto, dezimale Verkleinerung einer Einheit um 10^{-15}
fw	*forward* (vorwärts gerichtet)
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
gfpmut3	Fluoreszenz-optimierte Variante des grün-fluoreszierenden Proteins
Gm^R	Gentamycin Resistenz
GRAS	*generally regarded as safe*
GZE	Ganzzellextrakt
in silico	Vorgänge, die im Computer ablaufen (angelehnt an lateinisch *in silicio*)
in vitro	im Glas (lateinisch)
in vivo	im lebendigen Organismus (lateinisch)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

Kan^R	Kanamycin Resistenz
Kb	Kilobasen
lac-Promotor	Promotor des Lactose Operons
lacZ	β-Galaktosidasegen
LB	Luria-Bertani (Nährmedium)
lipA; LipA	*Bacillus subtilis* Lipase A (Gen oder Protein)
Mb	Megabasen (10^6 Basen)
MCS	*multiple cloning site*
Milli-Q Wasser	Wasser aus Millipore Anlage
minR	minimale Region
minR'	verkürzte minimale Region
mRNA	*messenger* RNA (Boten RNA)
OD_{Zahl}	optische Dichte gemessen bei einer definierten Wellenlänge (= Zahl)
oePCR	*overlap extension* PCR
orf	*open reading frame(s)* (offene(r) Leserahmen)
ori	*origin of replication* (Replikationsursprung)
OTU(s)	*operational taxonomic unit(s)*
P	PCR Primer
P. putida; $_{Pp}$	*Pseudomonas putida*
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion)
pEBP	Shuttlevektor, Plasmid (p) für *E. coli* (E), *B. subtilis* (B) und *P. putida* (P)
Pfu	*Pyrococcus furiosus*
pNPB	*para*-Nitrophenylbutyrat
P_{T7}	T7 RNA Polymerase-induzierbarer Promotor
P_{xyl}	Xylose-induzierbarer Promotor
rDNA	ribosomale DNA
RE	Restriktionsenzym(e), Restriktionsendonuklease(n)
repA, RepA	Gen eines Replikationsproteins bzw. dessen Genprodukt
RFE	relative Fluoreszenzeinheit(en)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	*revolutions per minute* (Drehzahl)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	*real time* PCR (Echtzeit PCR)
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient, 10^{-13} sec) oder Sequenzierprimer
SAP	*shrimp alkaline phosphatase*
SDS	*sodium dodecyl sulfate* (Natriumdodecylsulfat)
SHGB	Schlachthausgenbank
ssDNA	*single stranded* DNA (einzelsträngige DNA)
T_A	*annealing temperature* (Hybridisierungs-Temperatur)
TAE	Tris-Acetat

Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borat
t_E	Elongationszeit
template	Matrize, Muster
T_M	*melting temperature* (Schmelztemperatur)
U	*unit(s)* (Einheit(en) der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UTR	*untranslated region* (untranslatierter Bereich einer mRNA)
UV	Ultraviolett
v/v	*volume per volume* (Volumen pro Volumen)
VE-Wasser	vollentsalztes (demineralisiertes) Wasser
versus	gegen, gegenüber gestellt (lateinisch)
Vol.	Volumen
w/v	*weight per volume* (Gewicht pro Volumen)
wt	Wildtyp
x g	mal Erdbeschleunigung (g = 9,80665 Meter/sec^2)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
Xyl	Xylose

Begriffsdefinitionen

3’-Region

3’-terminaler Bereich eines DNA-Fragments (in einem Gen entspricht das Fragment dem C-Terminus des korrespondierenden Proteins)

5’-Region

5’-terminaler Bereich eines DNA-Fragments (in einem Gen entspricht das Fragment dem N-Terminus des korrespondierenden Proteins)

BAC (*bacterial artificial chromosome*)

Ein *bacterial artificial chromosome* ist ein Plasmid, das auf dem *E. coli* Fertilitätsplasmid (F-Plasmid oder auch Fertilitätsfaktor) beruht, dabei aber nur wenige ‚F-Gene’ enthält, welche die Replikation und die Kopienzahl steuern. Typischerweise kann Fremd-DNA (> 300 Kb) in BACs eingebaut und stabil vermehrt werden [1].

blunt ends

glatte DNA Enden (doppelsträngige DNA ohne 5’- oder 3’-Überhang)

blunting

enzymatische Prozessierung (glätten) von überhängenden DNA Enden z.B. durch T4 DNA Polymerase und dNTPs

codon usage

Codongebrauch oder auch Codon Bias (bestimmte Codons werden von verschiedenen Spezies unterschiedlich häufig verwendet) [2-5]

Cosmid

Ein Cosmid ist ein Plasmid mit einer *cohesive end site*. Diese Sequenz stammt aus dem Bakteriophagen λ und ermöglicht die *in vitro* Verpackung von rekombinanten DNA-Molekülen mit einer Größe von 35-52 Kb in Phagenpartikel. Cosmide können durch Transduktion in *E. coli* übertragen werden [1, 6-9].

downstream

‚stromabwärts’ (von definierter Position in Richtung 3’-Ende der DNA)

Fosmid

Ein Fosmid ist ein Cosmid, das auf dem *E. coli* Fertilitätsplasmid (F-Plasmid oder auch Fertilitätsfaktor) beruht [10].

four base cutter

Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms besteht aus vier Basen

frameshift

Ein Rasterschub oder Leserasterwechsel während der Translation wird beispielsweise durch die Insertion oder Deletion eines Nukleotids in einem Gen hervorgerufen, wodurch es zur Synthese eines Proteins mit einer veränderter Aminosäurensequenz kommt [1].

housekeeping Gen

Haushaltsgen (lebenswichtiges Gen) [1]

kryptisches Plasmid

Plasmid ohne identifizierten Selektionsvorteil wie Antibiotika Resistenzgene, Virulenzfaktoren, Gene des Sekundärstoffwechsels etc.

locus, loci

lateinisch ‚Ort’ oder ‚Platz’ (chromosomale Lokalisation z.B. eines Gens)

minR (minimale Region)

2,5 Kb große Region des Plasmids pNI10 und dessen Derivaten mit Replikationsursprung und Replikationsprotein essenziell für die Plasmid-Replikation in Pseudomonaden

minR' (verkürzte minimale Region)

minimale Region des Plasmids pNI10 und dessen Derivaten, verkürzt am 5'-Terminus, aber mit Replikationsursprung und Replikationsprotein essenziell für die Plasmid-Replikation in Pseudomonaden

'minR' (deletierte, verkürzte minimale Region)

Deletion der verkürzten minimalen Region minR' um 1,1 Kb

Plasmid-Kopienzahl

Anzahl der Plasmid-Moleküle pro Bakterienzelle [11] oder auch pro Bakterienchromosom [12]. Es wird dabei in *low copy number* (1-10 Plasmide pro Zelle), *mid copy number* (10-20 Plasmide pro Zelle) oder *high copy number* Vektoren (> 100 Plasmide pro Zelle) unterschieden [13-15].

Rekombination

Die Rekombination ist ein Vorgang bei dem DNA-Moleküle aus zwei verschiedenen Quellen ausgetauscht oder in einem einzigen DNA-Molekül zusammen gebracht werden. Erfolgt dies über ein einziges Rekombinationsereignis spricht man von *single cross over* oder *Campbell-type* Integration, bei zwei Rekombinationsereignissen hingegen von doppelt-homologer Rekombination [1, 16-18].

segregative Plasmidinstabilität

Bei der Zellteilung wird das Plasmid nicht an jeder Tochterzellen weitergegeben, wodurch eine Plasmid-freie Subpupulation entsteht [13, 19, 20].

short tandem repeat

repetitives DNA Element, Duplikation einiger weniger Basen innerhalb einer Nukleotidsequenz

shotgun Sequenzierung

Nach der DNA Isolierung und Aufreinigung werden kleinere DNA-Fragmente erzeugt, die direkt und zufällig sequenziert werden. Mit Hilfe bioinformatischer Methoden wird dann aus überlappenden Regionen eine Konsensussequenz zusammengesetzt [1, 21-23].

skim milk

Magermilch. Casein ist als hauptsächlicher Eiweißbestandteil der Milch für die weiße Farbe verantwortlich [24].

sticky ends

klebrige, kohäsive DNA Enden (doppelsträngige DNA mit 5'- oder 3'-Überhang)

strukturelle Plasmidinstabilität

Die Basenabfolge einer DNA-Sequenz wird durch Substitutionen, Insertionen oder Deletionen verändert. Teilweise kommt es zu einer kompletten Neuorganisation des Moleküls, sog. *rearrangements* [13, 19, 20].

Transposon

Ein Transposon ist ein genetisches Element das ein oder mehrere Gene umfassen kann und die Möglichkeit hat seinen Ort im Genom zu verändern, das heißt sich z.B. von einer Stelle auf dem Chromosom zu einer anderen zu bewegen. Man spricht dabei von transponieren bzw. Transposition [1].

upstream

‚stromaufwärts' (von definierter Position in Richtung 5'-Ende der DNA)

1 Einleitung

Das älteste, uns bekannte, fossile Beweisstück für Leben ist ungefähr 3,5 Milliarden Jahre alt [25, 26]. Seitdem hat die Evolution eine enorme Vielfalt an Organismen hervorgebracht. Schätzungen zur Folge existieren alleine ca. 10^7 unterschiedliche mikrobielle Spezies [27, 28], die mitunter ‚lebensfeindliche Habitate' besiedeln, welche durch extreme Umweltbedingungen wie große Hitze oder Kälte, sehr saure oder basische pH-Werte, hohen Druck oder hohe Salz- oder Schwermetall-Konzentrationen etc. [29-33] geprägt sind. Ermöglicht wird dies durch die physiologischen, genetischen und metabolischen Eigenschaften der Mikroorganismen, angepasst durch jahrtausendelange Evolution. Dementsprechend wird ihnen eine unermessliche Fülle von unterschiedlichen Enzymen zugesprochen, die durch ihre einzigartigen Eigenschaften ein enormes Potential für industrielle Anwendungen tragen [34, 35]. Allerdings ist nur ein Bruchteil aller Organismen (< 1%) kultivierbar [27, 36, 37], wodurch die genetische Information nicht zugänglich und nutzbar ist. Einen Ansatzpunkt zur Lösung bietet die Metagenomik [38, 39].

1.1 Was ist Metagenomik und zu welchen Zwecken wird sie genutzt?

Der Begriff Metagenom wurde erstmals im Jahre 1998 von Jo Handelsman verwendet. Seitdem beschreibt Metagenomik die genomische Analyse einer Population von Mikroorganismen [38]. Es handelt sich um eine Kombination aus Metaanalyse und Genomik [40], wobei Metaanalyse ein quantitatives Verfahren aus der Statistik ist, bei dem empirische Einzelergebnisse inhaltlich homogener Primärstudien zu Metadaten zusammengefasst werden [41], und Genomik die Erforschung der Gesamtheit der vererbbaren Information einer Zelle (Genom) und die Wechselwirkung der darin enthaltenen Gene beinhaltet [42]. Da der größte Anteil der Mikroorganismen eines Habitats nicht kultivierbar ist, kommen bei Metagenom-Analysen kulturunabhängige Verfahren zum Einsatz, welche die Isolierung und ggf. Klonierung von sog. metagenomischer DNA, sowie eine funktions- oder sequenzbasierte Analyse, beinhalten [40, 43]. Je nach Fragestellung werden dann beispielsweise die mikrobielle Diversität bestimmt, komplette Genome unkultivierbarer Organismen rekonstruiert, Populationsdynamiken innerhalb von Gemeinschaften untersucht, oder unbekannte Gene identifiziert bzw. Sequenzinformation mit biologischer Funktion verknüpft [44-46]. Die zunehmende Bedeutung der Metagenomik spiegelt sich in den über

2.600 Publikationen wider, die zwischen 1998 und 2009 in der *ISI Web of Knowledge* Datenbank hinterlegt wurden. Im Durchschnitt sind etwa 20% der Artikel in der Kategorie ‚Biotechnologie und angewandte Mikrobiologie' gelistet. Dies zeigt das Potential für industrielle Anwendung (Abb. 1).

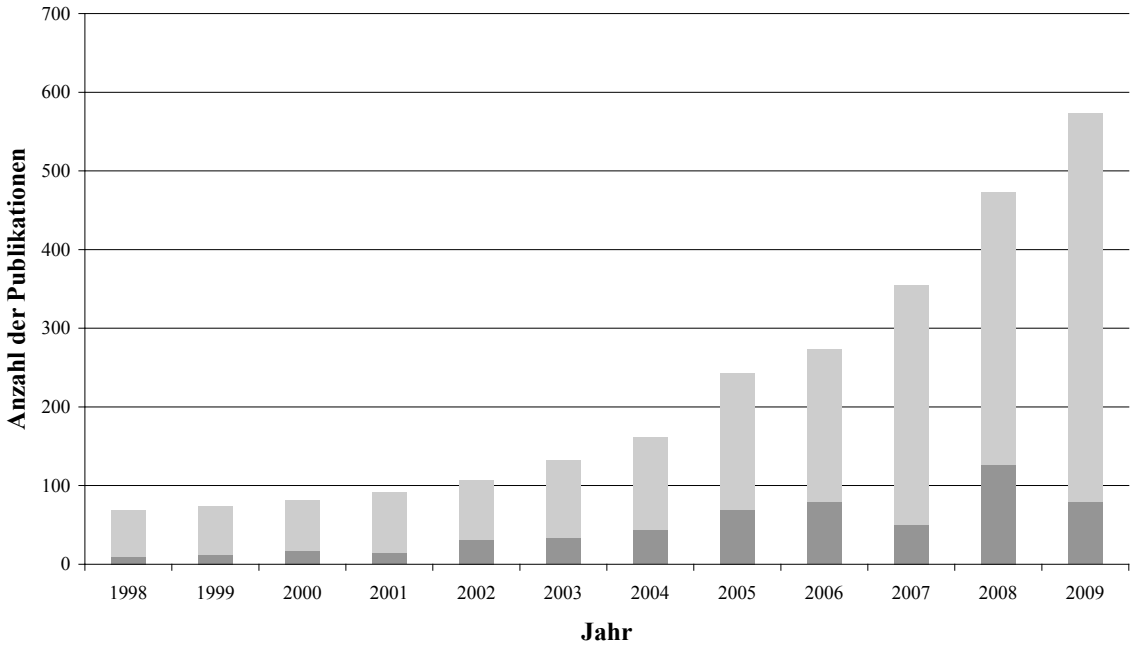


Abb. 1 Anzahl der Publikationen in der Metagenomik zwischen 1998 und 2009. Die Anzahl der Publikationen, die zwischen 1998 und 2009 in der *ISI Web of Knowledge* Datenbank hinterlegt wurden, ist als Balkendiagramm dargestellt. Die Anzahl der Artikel, die in der Kategorie ‚Biotechnologie und angewandte Mikrobiologie' gelistet waren, sind ‚dunkelgrau' gekennzeichnet. Bei der *online* Recherche wurden die Begriffe (*topic*) *metagenom** oder (OR) "*environmental dna*" oder (OR) *uncultured* eingegeben.

Für die ‚weiße' (industrielle) Biotechnologie sind insbesondere Enzyme von Bedeutung, die in einer Vielzahl von Prozessen Anwendung finden, wie bei der Produktion von Bulk- und Feinchemikalien, Lebensmitteln, Futterzusätzen, Biokraftstoffen, Wasch- und Reinigungsmitteln, etc. [47]. Enzyme bieten als biologische Katalysatoren viele Vorteile, wie z.B. eine hohe Effizienz und eine ausgeprägte Substrat-, Regio- und Stereoselektivität der von ihnen katalysierten Reaktionen. Sie können oft unter milden Reaktionsbedingungen (niedriger Temperatur, geringem Druck, nahezu neutralem pH-Wert) sehr komplexe biochemische Reaktionen katalysieren [35, 48]. Dadurch lassen sich zum einen enorme Kosten in der industriellen Synthese einsparen und zum anderen werden die Herstellungsprozesse umweltfreundlicher. Allerdings ist nicht für jede chemische Reaktion ein entsprechender Biokatalysator bekannt, oder ein bekanntes Enzym ist durch Patentierung geschützt und daher nicht verfügbar [35]. An dieser Stelle setzen Metagenom-Analysen an, um neuartige Biokatalysatoren zu erschließen. Viele biotechnologisch relevante Enzyme konnten schon im Metagenom entdeckt werden, wie verschiedene Arten von Hydrolasen [49-57] oder Enzyme, die an der Synthese von Metaboliten oder bioaktiven Molekülen beteiligt sind [53, 58-60].

1.2 Spezialisierung *versus* Diversität

Der erste Schritt bei Metagenom-Analysen ist die Entnahme einer Umweltprobe, wobei das ausgewählte Habitat die mikrobielle Population, und dadurch enzymatische Aktivitäten, vordefiniert [61]. Extreme Habitate, wie hydrothermale Quellen an der Erdoberfläche oder in der Tiefsee sowie Gletscher etc., werden typischerweise von nur einigen wenigen aber hoch spezialisierten Mikroorganismen besiedelt, den sog. Extremophilen. Diese bergen ein großes Potential zur Identifizierung von Extremozymen; Enzymen mit ‚extremen Eigenschaften'. Allerdings sind nicht alle Enzyme von Extremophilen automatisch Extremozyme. Nur Umweltfaktoren wie Temperatur oder Druck beeinflussen alle zellulären Enzyme, während pH-Wert oder Salzgehalt (Osmolarität) des Habitats meist nur Einfluss auf extrazelluläre Enzyme nehmen [33, 62-64]. Die Organismen mikrobieller Gemeinschaften aus mesophilen Habitaten sind weniger spezialisiert, aber extrem in ihrer Diversität. Schätzungen zur Folge leben bis zu 10^9 Bakterien aus bis zu 10^5 unterschiedlichen Spezies in einem Gramm Erdboden, wodurch in einer Tonne Erdboden mehr Bakterien leben (10^{16} Bakterien) als Sterne in unserer Galaxie (10^{11} Sterne) existieren [28, 65-68]. Da die Umweltbedingungen mesophiler Habitate jahreszeitlichen Veränderungen unterworfen sind, haben sich die Organismen an variierende Wasserverfügbarkeit, Nährstoffzusammensetzung, Temperatur usw. angepasst, wodurch ihre Enzyme möglicherweise ein breiteres Substrat- oder Temperaturspektrum haben [61, 69].

Unabhängig davon, ob extreme oder mesophile Habitate für Metagenom-Analysen verwendet werden, ist die Wahrscheinlichkeit zur Identifizierung von Enzymen mit einer bestimmten Eigenschaft gering [70, 71]. Je mehr Zielgene durch die metagenomische DNA kodiert werden, je höher also ihre Abundanz ist, desto größer ist die Chance, diese zu detektieren. Daher kann es von Vorteil sein, ein Habitat auszuwählen, das schon mit Organismen einer bestimmten Eigenschaft angereichert ist. Ein eindrucksvolles Beispiel dafür ist die Identifizierung von neuartigen Xylanasen mit ungewöhnlichen Primärstrukturen und neuen, bisher unbekannten Domänen. Die Enzyme wurden in Genbanken detektiert, deren metagenomische DNA von einer bakteriellen Population aus den Verdauungstrakten von Termiten und Motten isoliert worden war [72].

Da nicht immer ein natürlich angereichertes Habitat zugänglich ist, kann die Anreicherung von Organismen mit speziellen Eigenschaften auch unter Laborbedingungen durchgeführt werden. Populär sind sog. Anreicherungskulturen, in denen die Organismen einer Probe zyklisch in Gegenwart definierter Substrate angezogen und verdünnt werden. Das

eingesetzte Substrat bewirkt dabei einen Selektionsvorteil für die Organismen mit der gesuchten Eigenschaft. Nach mehreren Kultivierungszyklen ist die bakterielle Population in der Probe zwar weniger divers, dafür aber stärker spezialisiert [61, 70]. Auf diese Art konnten schon viele biotechnologisch relevante Enzyme identifiziert werden, wie z.B. Polysaccharid-abbauende Enzyme [54, 57,] Alkohol Oxidoreduktasen [73], Agarasen [54] und an der Synthese von Vitaminen [58] oder Antibiotika [59, 60, 74] beteiligte Enzyme.

1.3 Wie erschließt man das Metagenom?

Nachdem ein Habitat ausgewählt und eine Probe entnommen wurde, muss die metagenomische Information verfügbar gemacht werden. Typischerweise wird dazu die metagenomische DNA isoliert, wobei die Isolierung möglichst vollständig und die DNA hochmolekular und rein sein sollte [75-79]. Anschließend wird sie analysiert, z.B. über eine komplette *shotgun* Sequenzierung verknüpft mit wirkungsvollen Algorithmen [22, 80-84]. Häufiger jedoch werden Sequenzen aus dem Metagenom amplifiziert, z.B. zur phylogenetischen Charakterisierung, oder metagenomische DNA wird fragmentiert, um nach der Ligation mit einem Vektor und der Transformation eines heterologen Wirts sog. Metagenombanken zu erzeugen [44, 69]. Je nach Größe der fragmentierten DNA unterscheidet man in Genbanken mit kleineren (< 10 Kb) und großen Inserts [85]. Dabei sind Genbanken mit kleineren Inserts technisch einfacher zu erstellen und werden beispielsweise zur Identifizierung von einzelnen Genen genutzt, während Genbanken mit größeren Inserts besser geeignet sind, um Stoffwechselwege oder Gencluster abbilden zu können [69]. Außerdem speichern sie bei identischer Klonzahl eine größere Menge an metagenomischer Sequenz.

Sind die Metagenombanken dann in einem heterologen Wirt, typischerweise *Escherichia coli*, erstellt, ist der nächste Schritt die Identifizierung von Enzymen oder bioaktiven Molekülen. Dazu kommen am häufigsten zwei verschiedene Analyseverfahren zum Einsatz: das sequenzbasierte und das funktionsbasierte Screening. Sequenzbasierte Methoden nutzen Oligonukleotide in Form von Gensonden oder (degenerierten) Primern, um konservierte Proteinsequenzen (Domänen oder Motive) zu bereits bekannten Enzymen aufzuspüren. Da sequenzbasierte Methoden auf Homologie basieren, können konvergente Enzyme (ähnliche Funktion aber andere Struktur) bzw. neue Proteinklassen nicht detektiert werden. Außerdem bedeutet Sequenzähnlichkeit nicht zwangsläufig eine Funktionskonservierung und die

identifizierten Gene müssen anschließend exprimiert und die Proteine charakterisiert werden [37, 43, 86].

Funktionsbasierte Techniken stehen immer mit der Detektion einer Aktivität in Zusammenhang und dadurch mit Genexpression und Proteinsynthese im heterologen Wirt, die oft neben Transkription und Translation [87-89] auch von korrekter Proteinfaltung [90-92] oder post-translationalen Modifizierungen oder Prozessierungen [89, 93, 94] beeinflusst werden. Üblicherweise werden nur wenige aktive Klone innerhalb großer Genbanken detektiert [44], im einfachsten Fall durch eine Farbreaktion oder die Bildung eines Hofs um die Kolonie in einem Plattenassay [61]. Allerdings sind für komplexe enzymatische Reaktionen die Nachweisverfahren nicht trivial und manchmal ist kein Hochdurchsatz-fähiger Assay verfügbar. In solchen Fällen kann z.B. der Nachweis indirekt über Reporterproteine, typischerweise Fluoreszenzreporter, erfolgen, deren Expression durch die metagenomische DNA gesteuert wird, wobei sog. *genetic trap* Vektoren ihren Einsatz finden [95-97]. Problematisch wird es, wenn Aktivitäten nicht durch ein einzelnes Strukturgen kodiert sind, sondern eine ganze Reaktions-/Regulationskaskade durchlaufen werden muss. In solchen Fällen ist die Klonierung und funktionaler Erhalt eines gesamten Operons oder Genclusters notwenig, welches eine Größe von 100 Kb oder mehr betragen kann [35, 46]. Trotz aller Limitierungen konnten schon viele biotechnologisch relevanten Enzyme durch funktionsbasierte Analysen von Metagenombanken in *E. coli* detektiert werden, wie Esterasen und Lipasen [49, 50, 98], Alkohol Oxidoreduktasen [99], Amidasen [54, 59], Amylasen [52, 56], Chitinasen [55], Proteasen [100] und viele mehr. Die größte Stärke funktionsbasierter Nachweisverfahren liegt in der Identifizierung neuartiger Enzyme bisher unbekannter Enzymklassen. Wenn es zur Detektion kommt, ist die funktionale Expression im heterologen Wirt und die gewünschte Aktivität gewährleistet [43, 101].

1.4 Wie kann man funktionsbasierte Screenings in *E. coli* verbessern?

Der Erfolg funktionsbasierter Screenings in *E. coli* hängt direkt von der heterologen Expression der metagenomischen Gene und der Proteinsynthese aktiver Enzyme ab. Dies wird in gewisser Weise auch durch die Wahl des Vektors, der zur Erzeugung der Genbanken verwendet wird, beeinflusst. Genbanken mit kleineren Inserts werden typischerweise in einem Plasmid erzeugt [85] und die relativ hohe Gendosis ermöglicht die Detektion von Enzymen, deren Gene unter Kontrolle des natürlichen Promotors nur schwach in *E. coli* exprimiert werden [88]. Da heterologe Promotoren und/oder regulatorische Elemente

teilweise nicht erkannt werden, kann die mRNA Synthese auch durch die Induktion von Vektor-kodierten Promotoren erfolgen. Allerdings muss in diesem Fall das Gen relativ zum Promotor in korrekter Orientierung lokalisiert sein. Dementsprechend ist die Verwendung bidirektionaler Vektoren, deren *multiple cloning site* von zwei Promotoren in entgegengesetzter Richtung flankiert wird, sinnvoll. So führte das Screening einer Genbank, konstruiert auf Basis eines Expressionsvektors mit zwei unterschiedlich orientierten Promotoren [102] und metagenomischer Insert-DNA aus Kompost, nach Induktion zur Identifizierung mehrerer neuer Lipasen, Esterasen, Phosphatasen und Amylasen [56]. Zudem war die Detektionsfrequenz aktiver Klone hoch [50, 52, 54], wobei ein direkter Vergleich mit anderen Screenings von Metagenombanken aufgrund unterschiedlicher experimenteller Aufbauten schwierig ist. Genbanken mit großen Inserts basieren meist auf Cosmiden und Fosmiden (bis 40 Kb Insert-Größe) oder BACs (200-300 Kb Insert-Größe). Allerdings kodieren bakterielle Genome, und wahrscheinlich auch große Inserts, für eine Vielzahl von Transkriptions-Terminations-Sequenzen [103]. Dadurch kann es zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription kommen, wenn die mRNA-Synthese durch die Induktion von Vektor-kodierten Promotoren gesteuert wird. Dies ist problematisch, wenn ein gesamtes Operon abgelesen werden soll. Großes Potential bieten für solche Fälle T7 RNA Polymerase-abhängige Systeme, deren Promotoren entweder direkt durch den Vektor oder nach Transposition durch ein Transposon [104, 105] kodiert werden. Diese virale Polymerase benötigt im Gegensatz zu bakteriellen Polymerasen eine stabilere RNA Sekundärstruktur und eine längere Desoxyadenosin-Sequenz zur Termination, wodurch bakterielle Terminations-Sequenzen nicht erkannt werden [104, 106].

Neben Problemen bei der Transkription beeinflussen Proteinsynthese und Faltung die Verfügbarkeit von Kofaktoren sowie posttranslationale Modifizierungen oder Prozessierungen [89, 93, 94] die Detektion von aktiven Klonen in *E. coli* Genbanken. Während korrekte Proteinfaltung durch die Koexpression von Chaperonen verbessert werden kann [89, 91, 107-109], sind korrekte posttranslationale Modifizierungen oder Prozessierungen heterologer Proteine, wenn überhaupt, nur durch komplexe, genetische Manipulation des Wirts zu realisieren. In solchen Fällen kann die parallele Verwendung unterschiedlicher bakterieller Wirte eine vielversprechende Alternative sein.

1.5 Welche alternativen bakteriellen Wirte gibt es?

Funktionsbasierte Analysen von Metagenombanken haben schon mehrfach zur Detektion von unterschiedlichen Enzymen geführt, wenn *E. coli* und mindestens ein weiterer Wirt im Screening verwendet wurden [110-112]. Dieses Phänomen ist als sog. ‚*different host - different hit*' Effekt beschrieben [101]. Je nach physiologischer und metabolischer Eigenschaft, die man sich zunutze machen will, werden als alternative Wirte Rhizobien, Streptomyzeten oder auch Pseudomonaden eingesetzt [86, 113].

Pseudomonas putida ist ein sehr gut untersuchtes, nicht pathogenes Bakterium (GRAS-Status) mit einer bekannten Genomsequenz [114]. Der Metabolismus von *P. putida* KT2440 gilt als sehr vielfältig und es wurden sowohl ein breites Spektrum an katabolischen Stoffwechselwegen, als auch Gene, die an Stoffkreisläufen in der Natur (*element cycling*) und am Abbau von (xenobiotischen) Schadstoffen beteiligt sind, beschrieben [114, 115]. Dies spiegelt sich auch in der hohen Anzahl von Genen, die für Transkriptions-Regulatoren (fast 450 in Vergleich zu 266 in *E. coli*) kodieren, sowie 24 putativen ECF (*extracytoplasmatic function*) Sigmafaktoren wider [116]. Außerdem produzieren Pseudomonaden unter gewissen Bedingungen Sekundärmetabolite und verfügen daher über eine Phosphopantetheinyl-Transferase mit breitem Substratspektrum, die beispielsweise Polyketid-Synthasen und nicht-ribosomale Peptid-Synthasen von Myxobakterien und Streptomyzeten posttranslational modifizieren und aktivieren kann [117, 118]. So konnte eine Typ III Polyketid-Synthase von *Sorangium cellulosum* (Myxobakterium), aktiv in *P. putida*, *P. syringae* und *P. stutzeri*, exprimiert werden, nicht aber in *E. coli* [118]. Zusammen mit dem hohen GC-Gehalt (61,6%) des Chromosoms und dazu angepasster *codon usage* erscheinen Pseudomonaden besser als *E. coli* zur Expression von Genen von Actinomyzeten und Mykobakterien geeignet [119].

Bacillus Spezies, wie *B. subtilis* oder *B. licheniformis*, werden bislang weniger in funktions-basierten Analysen von Metagenombanken sondern typischerweise als Wirte für die Produktion und Sekretion von heterologen Proteinen verwendet [17, 89, 120, 121]. Besonders attraktiv macht sie ihre Fähigkeit, Proteine direkt ins Medium zu sekretieren. Dies erleichtert die nachfolgenden Reinigungsschritte (*downstream processing*). Dabei übersteigen sekretierte Proteinkonzentrationen, die mehr als ein Gramm heterologes Protein pro Liter Kulturmedium betragen können, die anderer Bakterien um ein Vielfaches [122].

B. subtilis ist nicht pathogen (GRAS-Status) und sein Genom ist sequenziert [123]. Im Gegensatz zu *E. coli* kodiert *B. subtilis* für eine Vielzahl von Sigmafaktoren (18 *versus* 7) und sogar für eine Phosphopantetheinyl-Transferase, die nicht-ribosomale Peptid-Synthasen posttranslational modifizieren kann [116, 124]. Zusammen mit dem niedrigen GC-Gehalt (43,5%) des Chromosoms und keiner Präferenz bestimmter Codons [123, 125] hat *B. subtilis* Potential zur Expression metagenomischer Gene. Als Gram-positives Bodenbakterium der Abteilung *Firmicutes* besitzt *B. subtilis* andere physiologische und metabolische Eigenschaften als die Gram-negativen Proteobakterien, wodurch zusätzliches Expressionspotential aus Metagenombanken erschließbar sein sollte.

Um allerdings Metagenombanken funktionsbasiert in unterschiedlichen Wirten zu durchmustern, sind neben Techniken, welche die Transformation der Wirte mit Fremd-DNA ermöglichen, Shuttle-Vektoren von zentraler Bedeutung. Neben der Möglichkeit zur effizienten Erzeugung rekombinanter Vektoren mit metagenomischer Insert-DNA in *E. coli* sollten die Shuttle-Vektoren dann in sog. ‚Screening-Wirte' übertragbar sein und in diesen strukturell und segregativ stabil vorliegen. Allerdings sind generell nur wenige funktionsfähige Shuttle-Vektoren beschrieben und ein Vektor, der parallel in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas putida* verwendet werden kann, wurde noch nicht publiziert.

1.6 Zielsetzung

Zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist die Konstruktion einer Serie von Shuttle-Vektoren auf der Basis von Cosmiden, die in den drei Wirten *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas putida* strukturell und segregativ stabil vorliegen. Gemäß ihrem Wirtsspektrum werden sie pEBP genannt. Neben Replikationsursprüngen und Antibiotika-Resistenzgenen zur Selektion sollen die Shuttle-Vektoren für induzierbare Promotoren *upstream* einer *multiple cloning site* kodieren. Zur Überprüfung ihrer Funktionalität sollen verschiedene Reporterproteine in den drei Wirten exprimiert werden. Anschließend sollte ihre Eignung zur Erzeugung und funktionsbasierter Analyse von Metagenombanken in verschiedenen Wirten überprüft werden. Dazu wird ein natürlich angereichertes Habitat für Organismen mit hydrolytischer Aktivität ausgewählt. Zusätzlich werden die nach der Probennahme kultivierbaren Organismen charakterisiert. Die Teilaspekte der Metagenom-Analyse, die im Rahmen der Promotion bearbeitet werden, sind schematisch in Abb. 2 zusammengefasst.

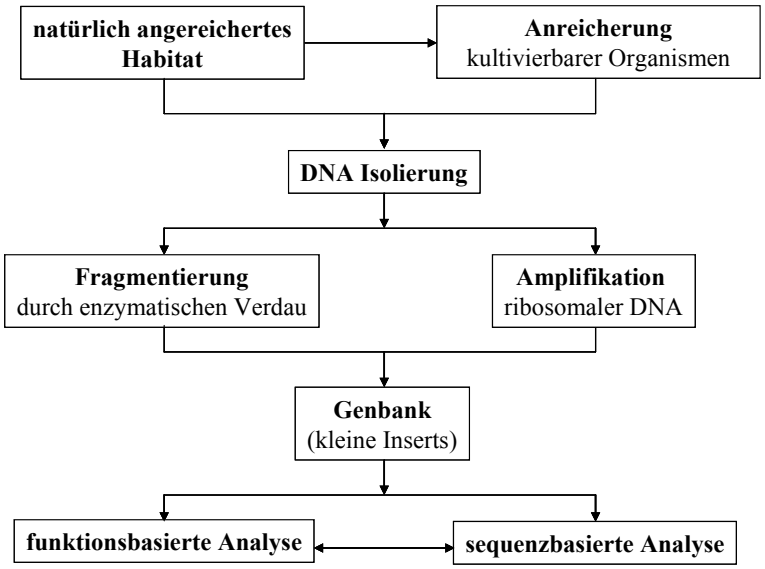


Abb. 2 Schematische Darstellung der durchzuführenden Teilaspekte der Metagenom-Analyse.

Um die Annahme zu demonstrieren, dass die Durchmusterung von Metagenombanken in verschiedenen Organismen zusätzliches Expressionspotential nutzbar macht, sollten ausgewählte rekombinante Plasmide in *E. coli*, *P. putida* und *B. subtilis* übertragen und auf verschiedene hydrolytische Aktivitäten überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tab. 1 Übersicht über die verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung (Hersteller)
Brutroller	SB2 mit Aufsatz für 63 Kulturröhrchen (Carl Roth GmbH)
Brutschüttler	Infors HT Multitron Standard (Infors GmbH)
Digitalkammera	Canon Digital IXUS 65 Digitalkamera (Canon AG)
Dunkelkammer	CN-6 (254/365 nm) (Vilber Lourmat Deutschland GmbH)
Elektrophorese (DNA)	Mini-Sub Cell GT System oder Wide Mini-Sub Cell GT System (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Elektrophorese (Protein)	Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Blot	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Elektroporator	MicroPulser electroporator (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Homogenisator	Ultra-Turrax T25 basic (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Imaging System	Stella 3200 mit UV- und White Light Table (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH)
Mikroskop	Axioplan 1 (HBO 50), Plan-Neofluar 100 *x* (Phase 3), AxioCam MRm (Carl Zeiss AG)
PCR-Automat	Mastercycler Gradient oder Ep-gradient S (mit Realpleax 4) (Eppendorf AG)
pH-Elektrode	GAT Ionode IJ44 (Gamma Analysen Technik GmbH)
pH-Meter	Multi-Calimatik Typ 763 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG)
Photometer	Luminescence Spektralphotometer LS50B (PerkinElmer Cellular Technologies Germany GmbH) oder BioPhotometer (Eppendorf AG)
Power Supply	Consort EV265 / EV243 / E862 oder Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Scanner	CanoScan LiDE 1.000 (Canon AG)
Sterilisator	KSG 25-2-3 (KSG Sterilisatoren GmbH) oder VARIOKLAV Dampfsterilisator (H+P Labortechnik AG)
Thermoblock	Wechselblock für Reaktionsgefäße (Eppendorf AG)
Thermomixer	Thermomixer Comfort (Eppendorf AG)
Ultra-Mikro-Messzelle	TrayCell (Deckel: 1 mm, 0,2 mm) (Hellma GmbH & Co. KG)
UV Tisch	(Bio-Budget Technologies GmbH)
Waage	HF-3000G (A&D Engineering, Inc.) oder CP 2245 (Satorius AG)
Milli-Q Anlage	Milli-Q Integral Water Purification System; MilliPAK Express 20 (Millipore GmbH)
Zentrifuge	Heraeus Biofuge pico (Heraeus Holding GmbH) oder Hettich Rotina 35R (Rotor 1717) (Andreas Hettich GmbH & Co. KG))

Alle hier nicht aufgeführten Kleingeräte entsprechen den allgemeinen Laborstandards.

2.2 Software, Programme und Websiten

Tab. 2 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Software, Programme und Websiten.

Name	Bezeichnung und Firma oder URL
Adobe Photoshop Elements 7, Bildbearbeitung Software (Adobe Systems GmbH)	
AIDA	AIDA Image Analyzer Version 4.18 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH)
ARB	ARB Program and Database [126], http://www.arb-home.de
AxioVision, Bildanalyse Software für Mikroskopie (Carl Zeiss AG)	
BioMath Calculator (http://www.promega.com/biomath/Default.htm)	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, nucleotide blast (Datenbank: Nucleotide collection (nr/nt), Algorithmus: Megablast), protein blast (Datenbank: non-redundent protein sequences (nr), Algorithmus: blastp), NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Clone Manager	Software for the Molecular Biologist, Scientific & Educational (Sci-Ed) Software
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH http://www.dsmz.de/
Eppendorf Mastercycler ep realplex (Version 1.0), Eppendorf AG	
ExPASy	ExPASy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics, compute pI/Mw tool, http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html
ISI (Institute for scientific information) web of knowledge, http://portal.isiknowledge.com/	
Microsoft Office (Microsoft Deutschland GmbH)	
MOPS	MWG Oligo Property Scan, Eurofins MWG Operon, https://ecom.mwgdna.com/services/webgist/mops.tcl
NCBI	National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Primer 3	Primer 3 Input (Version 0.4.0), http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
Tree of Life, http://tolweb.org/tree/	

2.3 Chemikalien

Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Bezeichnung (Hersteller)
Aceton	Aceton Rotisolv HPLC (Carl Roth GmbH)
Acrylamid	Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) (Carl Roth GmbH)
Agar	Agar-Agar, Kobe I (Carl Roth GmbH)
Agarose	Roti-garose, Agarose NEEO Ultra-Qualität für die DNA/RNA-Elektrophorese (Carl Roth GmbH)
Ammonium-eisen(III)-citrat	Ammoniumeisen(III)-citrat, braun (FLUKA Chemika/Biochemika Fluka Chemie AG)
Ammoniumsulfat	Ammoniumsulfat, ≥ 99,5%, p.a., ACS, ISO (Carl Roth GmbH)
Ampicillin	Ampicillin Sodium Salt (GERBU Biochemicals GmbH)
APS	Ammoniumperoxodisulfat, ≥ 98%, p.a., ACS (Carl Roth GmbH)
Blutagar (Basis)	Blutagar (Basis) für die Mikrobiologie (Carl Roth GmbH)
Borsäure	Borsäure, ≥ 99,8%, p.a. (Carl Roth GmbH)
Bromphenolblau	Bromphenolblau Na-Salz, für die Elektrophorese (Carl Roth GmbH)
$CaCl_2$	Calciumchlorid Dihydrat (Carl Roth GmbH)

Fortsetzung Tab. 3

Chemikalie	Bezeichnung (Hersteller)
Casamino Acids	Bacto Casamino Acids (Becton, Dickinson and Company)
Chloramphenicol	Chloramphenicol, 99% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Chloroform-Isoamylalkohol	Roti-C/I (24:1) (Carl Roth GmbH)
Coomassie	Brillant Blau G 250 (C.I. 42655) (Carl Roth GmbH)
DMF	N,N-Dimethylformamid, Rotipuran, ≥ 99,8%, p.a. (Carl Roth GmbH)
DMSO	Dimethylsulfoxid, Rotipuran, ≥ 99,8%, p.a. (Carl Roth GmbH)
dNTPs	PCR Nucleotide Mix, 10 mM each (Roche Diagnostics GmbH)
DTT	1,4-Dithiothreitol, minimum 99% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, ≥ 99%, p.a. (Carl Roth GmbH)
Essigsäure	Essigsäure, Rotipuran, 100%, p.a. (Carl Roth GmbH)
EtBr	Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/mL) (Carl Roth GmbH)
EtOH	Ethanol, Rotipuran, ≥ 99,8%, p.a. (Carl Roth GmbH)
Gentamycin	Gentamycin sulfate, research grade (Serva Electrophoresis GmbH)
Glukose	α-D(+)-Glucose Monohydrat für die Mikrobiologie (Carl Roth GmbH)
Glycerin	Glycerin, Rotipuran, ≥ 99,5%, p.a., wasserfrei (Carl Roth GmbH)
Glycin	Glycin, Pufferan ≥ 99%, p.a. (Carl Roth GmbH)
Gummi arabicum	Gummi arabicum, Ph.Eur., sprühgetrocknet (Carl Roth GmbH)
HCl	Salzsäure 37%, p.a. (Carl Roth GmbH)
Hefeextrakt	Hefeextrakt, pulv., für die Bakteriologie (Carl Roth GmbH)
HEPES	HEPES-Natriumsalz, Pufferan ≥ 96% (Carl Roth GmbH)
Herring Sperm DNA	Herring Sperm DNA, 10 µg/µL (Promega GmbH)
Iod	Iod puriss p.a. (FLUKA Chemika/Biochemika Fluka Chemie AG)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid für die Molekularbiologie, ≥ 99%, dioxanfrei, animal free (Carl Roth GmbH)
Isopropanol	2-Propanol, Rotisolv, ≥ 99,9%, UV/IR-Grade (Carl Roth GmbH)
K_2HPO_4	di-Kaliumhydrogenphosphat, ≥ 99%, p.a., wasserfrei (Carl Roth GmbH)
Kaliumacetat	Kaliumacetat, ≥ 99%, Ph.Eur., BP (Carl Roth GmbH)
Kaliumglutamat	L-Glutaminsäure - Natriumsalz - Monohydrat, reinst (AppliChem GmbH)
Kalium-Iodid	Kaliumiodid, reinst Ph.Eur., USP (AppliChem GmbH)
Kanamycin	Kanamycinsulfat (Carl Roth GmbH)
KCl	Kaliumchlorid, ≥ 99%, Ph.Eur., USP, BP (Carl Roth GmbH)
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat, ≥ 98%, Ph.Eur., USP, BP (Carl Roth GmbH)
Mannitol	D(-)-Mannit ≥ 98%, Ph.Eur., USP, BP, für die Biochemie (Carl Roth GmbH)
MeOH	Methanol, Rotipuran ≥ 99,9%, p.a., ACS, ISO (Carl Roth GmbH)
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid-Hexahydrat, ≥ 99%, p.a., ACS (Carl Roth GmbH)
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat-Heptahydrat, ≥ 99%, Ph.Eur., USP, BP (Carl Roth GmbH)
Milli-Q Wasser	Wasser aus Millipore Anlage, 18,2 Ω bei 25°C (Millipore GmbH)
Na_2CO_3	Natriumcarbonat ≥ 99,8%, p.a., ACS, ISO, wasserfrei (Carl Roth GmbH)
NaCl	Natriumchlorid, > 99,8%, Kochsalz (Carl Roth GmbH)

Fortsetzung Tab. 3

Chemikalie	Bezeichnung (Hersteller)
NaDOC	Desoxycholsäure Natriumsalz, ≥ 98%, für die Biochemie (Carl Roth GmbH)
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat, ≥ 99,5%, p.a., ACS, ISO (Carl Roth GmbH)
NaOH	Natriumhydroxid, ≥ 99%, p.a., ISO, in Plätzchen (Carl Roth GmbH)
Natriumacetat	Natriumacetat-Trihydrat, ≥ 99,5%, p.a., ACS, ISO (Carl Roth GmbH)
Natriumcitrat	tri-Natriumcitrat-Dihydrat, ≥ 99%, p.a., ACS (Carl Roth GmbH)
Olivenöl	Olivenöl, Ph.Eur. (Carl Roth GmbH)
Phenol-Chloroform	Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (Carl Roth GmbH)
Phenolrot	Phenol Red Sodium Salt, pH 6.8 (Yellow) - 8.2 (Red) (FLUKA Chemika/ Biochemika Fluka Chemie AG)
Phosphorsäure	ortho-Phosphorsäure 85%, Rotipuran ≥ 85%, p.a., ACS, ISO (Carl Roth GmbH)
pNPB	4-Nitrophenyl butyrate, ≥ 98% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Rhodamin B	Rhodamin B (C.I. 45170) (Carl Roth GmbH)
Saccharose	Saccharose für die Mikrobiologie (Merck KgaA)
Schafblut	Schafblut, defibriniert (Fiebig Nährstofftechnik)
SDS	SDS ultra pure, ≥ 99%, für die Elektrophorese (Carl Roth GmbH)
skim milk	*skim milk* Powder (FLUKA Chemika/Biochemika Fluka Chemie AG)
Sorbitol	D-Sorbit ≥ 98%, für die Biochemie D-Sorbitol (Carl Roth GmbH)
Stärke	Mondamin (Discounter)
TCA	Trichloressigsäure, BioChemica (AppliChem GmbH)
TEMED	TEMED, 99%, p.a., für die Elektrophorese (Carl Roth GmbH)
Tributyrin	(MP Biomedicals, LLC)
Tris	Tris, Pufferan, ≥ 99,9%, Ultra Qualität (Carl Roth GmbH)
Triton X 100	Triton X 100, reinst (Carl Roth GmbH)
Trypton	Trypton/Pepton aus Casein pankreatisch verdaut (Carl Roth GmbH)
Tryptophan	L-Typthophan, reinst (Merck KgaA)
Tween 20	Tween 20, Ph.Eur. (Carl Roth GmbH)
X-Gal	X-β-Gal, ≥ 99%, für die Biochemie (Carl Roth GmbH)
Xylose	D-(+)-Xylose (Alfa Aesar GmbH & Co. KG)

2.4 Reaktions- und Nachweis-Kits

Tab. 4 Übersicht über die verwendeten Reaktions- und Nachweis-Kits.

Kit (Hersteller)	Anwendungsbereich
DNease Blood & Tissue Kit (QIAGEN AG)	genomische DNA Isolierung
innuPREP Gel Extraction Kit (Analytik Jena AG)	Isolierung von DNA aus Agarose-gelen
innuPREP Plasmid Mini Kit (Analytik Jena AG)	Plasmid Isolierung (max. 10 µg)
NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)	Plasmid Isolierung (max. 1.000 µg)
NucleoBond Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)	Plasmid Isolierung (max. 250 µg)
pGEM-T Easy Vektor System (Promega GmbH)	Vermehrung von PCR Produkten
QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN AG)	RT-PCR
RNeasy Mini Kit (QIAGEN AG)	RNA Isolierung

2.5 Plasmide

Tab. 5 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Name	Genotyp	#: GenBank Accession Number
pAC6	Amp^R *amyE*' '*amyE* ColE1 Cm^R *lacZ* SD-*sacB*	[127]
pBBR1MCS2	Km^R *lacZ*α *mob rep*	#U23751.1 [128]
pBBR1MCS5	Gm^R *lacZ*α *mob rep*	#U25061.1 [128]
pBSMul3-*Cut-ssEpr*	pBSMul3 Cutinase (*Fusarium solani pisi*) Epr (*extracellular serine protease*) Sekretionssignal	#NC_000964 [129]
pEBP10	*amyE*' '*amyE* ColE1 *cos gfpmut3* Gm^R (pBBR1MCS5) Km^R (pNUK73) minR' P_{T7} P_{Xyl}	diese Arbeit
pEBP12	pEBP10 MCS	diese Arbeit
pEBP13	pEBP12 *Spe*I	diese Arbeit
pEBP14	*amyE*' '*amyE* ColE1 *cos gfpmut3* Gm^R (pBBR1MCS5) Km_{Bs}^R (pUB110) MCS minR' P_{T7} P_{Xyl}	diese Arbeit
pEBP17	pEBP14 Cm^R (pC194) ΔKm_{Bs}^R	diese Arbeit
pEBP18	*amyE' 'amyE* ColE1 *cos gfpmut3* Km_{Pp}^R (pBBR1MCS2) Cm^R (pC194) MCS minR' P_{T7} P_{Xyl}	diese Arbeit
pEBP18_*cut*	pEBP18 Cutinase (*Fusarium solani pisi*)	diese Arbeit, #K02640.1
pEBP18_*lipA*	pEBP18 *Bacillus subtilis* Lipase A	diese Arbeit, #M74010.1
pEBP191	pEBP18 minR (*repA* (pNUK73)*, ori* (pNI105))	diese Arbeit
pEBP192	pEBP18 minR (pNI105)	diese Arbeit
pEBP193	pEBP18 *Oli*I/*Bcu*I Fragment aus pNI105	diese Arbeit
pNI10	minR (*repA, orf2*, *ori*)	[130]
pNI105	Km^R minR (*repA, orf2*, *ori*)	[130]
pNUK73	ColE1 Km^R *lacZ*α minR' (*repA, orf2*, *ori*)	#AB084167.1 [131]
pUB110	*gamma incA* Kan^R *mob MO* ori^+ *repA*	#M19465.1 [132]
pUC18	Amp^R ColE1 *lacZ*α	#L09136.1 [133]
pUC18_'minR'-Km^R	pUC18 Km^R 'minR' (*'repA, orf2, ori* (pNUK73))	diese Arbeit
pUC18_3'(pNI105)	pUC18 *Spe*I/*Ale*I Fragment aus pNI105	diese Arbeit
pUC18_5'-minR	pUC18 5'-minR (pNI105)	diese Arbeit
pUC18_Cm^R	pUC18 Cm^R (pWE21)	diese Arbeit
pUC18_*cut*	pUC18 Cutinase (*Fusarium solani pisi*)	#K02640.1, diese Arbeit
pUC18_Gm^R	pUC18 Gm^R (pBBR1MCS2)	diese Arbeit
pUC18_Km_{Bs}^R	pUC18 Km^R (pUB110)	diese Arbeit
pUC18_Km_{Pp}^R	pUC18 Km^R (pBBR1MCS2)	diese Arbeit
pUC18_*lipA*	pUC18 *Bacillus subtilis* Lipase A	#M74010.1, diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 5

Name	Genotyp	#: GenBank Accession Number
pUC18_oePCR	pUC18 mit pEBP12 PCR Produkt (Primer P6-P9)	diese Arbeit
pUC18_*repA*'	pUC18 *repA*' (pNUK73)	diese Arbeit
pWE15	Amp^R ColE1 *cos* Neo^R P_{T3} P_{T7} SV40	#X65279.1 [134]
pWE21	Amp^R *amyE' 'amyE* Cm^R ColE1 *cos gfpmut3* P_{T7} P_{Xyl} $Spec^R$	Henning, H. (2006)
pWE22	pWE21 $\Delta Spec^R$	diese Arbeit
pWE23	pWE22 ΔAmp^R Gm^R (pBBR1MCS2)	diese Arbeit
pWE24	pWE23 Km^R (pNUK73) 'minR' (pNUK73)	diese Arbeit

2.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide für Klonierungen wurden vor der Bestellung mit der Funktion *Analyze Molecule (Type of analysis: Dyad Symmetries)* des Computerprogramms *Clone Manager* auf Sekundärstrukturen überprüft und ggf. verändert (2.2). Die Schmelztemperaturen (T_M) wurden über *MOPS* oder manuell mit der Formel T_M (°C) = 2 *x* (A + T) + 4 *x* (G + T) berechnet und für Primerpaare angeglichen. Primer für die RT-PCR (100-150 Bp Produktgröße) wurden mit dem Programm *Primer 3* abgeleitet und dabei folgende Parameter (minimal/optimal/maximal) angegeben: Primergröße (18/20/22 Bp), Primer T_M (56/58/60°C), Primer GC (40/50/60%). Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon in HPSF-gereinigter (*high purity salt free*) und lyophilisierter Form bezogen und in einer Konzentration von 100 pmol/µL in Milli-Q Wasser gelöst.

Tab. 6 Übersicht über die verwendeten Sequenzierprimer. T_M: Schmelztemperatur.

Name	Sequenz (5'→3')	T_M (°C)	sonstiges
GM1F	CCAGCAGCCGCGGTAAT	57,6	[135]
S1	GAGCGGATAACAATTTCACACAGG	61	M13rev (-49)
S2	TGTAAAACGACGGCCAGT	54	M13uni (-21)
S3	GCTCATGAGCCCGAAGTG	58,2	diese Arbeit
S4	GCCATGTTTCAGAAACAAC	52,4	diese Arbeit
S5	GGTTTTCGACTCGTAGAG	53,7	diese Arbeit
S6	GCAATGCGAAGGGATGTTT	54,4	diese Arbeit
S7	CATCGCTCATCCATGTCG	56	diese Arbeit
S8	GAAAAATCCAGTTCTCAACC	53,2	diese Arbeit
S9	GGCAGTGCCTTCTACAG	55,2	diese Arbeit
S10	GCAGTTCGGCGAAGATCG	58,2	diese Arbeit
S11	GACAACGCTGACCAGGTC	58,2	diese Arbeit
S12	GAACTGTGGTTCGTAGATG	54,4	diese Arbeit
S13	GGCTATTCAGCACCTGC	54,5	diese Arbeit
S14	AACCTCAACAAGATGCGTG	54,5	diese Arbeit
S15	AGGAGATTCCTAGGATGG	53,7	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 6

Name	Sequenz (5'→3')	T_M (°C)	sonstiges
S16	TTATGTCAACTGGGTTCGT	52,4	diese Arbeit
S17	CGGAGCCTATGGAAAAACG	56,7	diese Arbeit
S18	GCATGCACCATTCCTTGC	56	diese Arbeit
S19	GTGCAGCAGAGGTATCAATC	57,3	diese Arbeit
S20	GACACGGATACAACCAAC	53,7	diese Arbeit
S21	CATCACCATCTAATTCAAC	50,2	diese Arbeit
S22	CAGCCGATTGTCTGTTGTG	56,7	diese Arbeit
S23	GTGTCTTACCGGGTTGGAC	58,8	diese Arbeit
S24	GAACACGATATTCACGGTTTACCCACTTAT	64	diese Arbeit

Tab. 7 Übersicht über die verwendeten Primer für die 16S und 18S rDNA Amplifikation. T_M: Schmelztemperatur. M: variable Base A oder C. Y: variable Base C oder T.

Name	Sequenz (5'→3')	T_M (°C)	Referenz
1429R	CGGYTACCTTGTTACGAC	53,7-56	[136]
616V	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	53,2-57,3	[137]
E1688	CGACGGGCGGTGTGTA	56,9	[138]
E4	CTGGTTGATTCTGCCAG	52,8	[138]

Tab. 8 Übersicht über die verwendeten Primer für die RT-PCR. T_M: Schmelztemperatur. #: NCBI Referenzsequenz des Gens. GeneID: Identifikationsnummer des Gens (NCBI).

Name	Sequenz (5'→3')	T_M (°C)	Referenz
gfp-fw	GCGTTCAACTAGCAGACCAT	57,3	diese Arbeit
gfp-bw	CCATGTGGTCTCTCTTTTCG		
*rpo*D_Ec-*fw*	CAGGTTCAATGCTCCGTTGC	59,3	#NC_000913.2, GeneID: 947567, diese Arbeit
*rpo*D_Ec-*bw*	CTGCGTTCGGGTCAACAAAG		
*rpo*D_Pp-*fw*	AATGGGTACTGTCGAGCTGC	59,3	#NC_002947.3, GeneID: 1044097, diese Arbeit
*rpo*D_Pp-*bw*	GCCCATGACTTCACGAATGC		
*sig*A_Bs-*fw*	GCCTGTCTGATCCACCACGTAGC	66	[139] #NC_000964.3, GeneID: 937897
*sig*A_Bs-*bw*	CGGTATGTCGGACGCGGTATG	63,7	

Tab. 9 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide zur Klonierung. Über die Oligonukleotide wurden Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingefügt, gekennzeichnet in ‚fetter Schrift'. Das Restriktionsenzyme (RE) ist in Spalte 4 angegeben. T_M: Schmelztemperatur.

Name	Sequenz (5'→3')	T_M (°C)	RE
P1	TC**GACTCCATGTC**CAGCGCCAGAAACAG	69,5	*Eam*1105I
P2	GAGTT**GACGTC**GACGCACACCGTGGAAAC	70,9	*Aat*II
P3	GAAG**ACGCGT**CCTGCTCGCCAGCTTGCT	72,4	*Mlu*I
P4	CTC**GCCGGC**TCCCGTCAAGTCAGCGTAA	72,4	*Pdi*I
P5	GCAA**GACGTG**AAGAAGGATC	57,3	*Aji*I
P6	GACATTA**TCGCGA**GCCCATTTATACC	63,2	*Bsp*68I

Fortsetzung Tab. 9

Name	Sequenz (5'→3')	T_M (°C)	RE
P7	ATTCAACAAAGCCA**ACTAGT**GTCTCAAAATCTCTGATG	67,3	*Bcu*I
P8	CATCAGAGATTTTGAGAC**ACTAGT**TGGCTTTGTTGAAT	67,3	*Bcu*I
P9	TCCTTCTT**CACGTC**TTGCCTATTCGC	64,8	*Aji*I
P10	CT**AAGCTT**ATTTTATTAAAGAGTAGTTCAAC	58,9	*Hind*III
P11	GA**ACTAGT**AACATGATTAACAATTATTAGAG	58,9	*Bcu*I
P12	AGA**ACTAGT**CCTTCTTCAACTAACGGG	63,4	*Bcu*I
P13	ACT**AAGCTT**CGAGTTATCATCGGCAATAG	63,9	*Hind*III
P14	ACT**GACGTC**CTTTCATAGAAGGCGGCGGTG	70,9	*Aat*II
P15	ATA**GAGGAG**CGAAAAGTGCCACCTTAAGTGAATGTCAGCT	70,9	*Bse*RI
P16	CTCG**ACGCGT**AGCTCCCTG	63,1	*Mlu*I
P17	CTGGCGGG**GCTCAGC**ACTT	63,1	*Bpu*1102I
P18	GATGTTTACA**CACTCCCGTG**CCAAAG	64,8	*Oli*I
P19	ATAT**ACTAGT**CTTGGAGCATCTGCTGACC	65,3	*Bcu*I
P20	CA**GGATCC**GTAATATAATTGGAGAATTTGTTACAA	63,6	*Bam*HI
P21	GA**GGATCC**TTCAAGGTTTTGTTTTTCATTAATTCG	64,8	*Bam*HI
P22	AT**GGATCC**AAGGAGGATATTATGGCGCCTACTAGTAACCCTG	73,3	*Bam*HI
P23	TCTAGA**GGATCC**TCAAGCAGAACCACGGAC	69,5	*Bam*HI

2.7 Enzyme

Tab. 10 Übersicht über die verwendeten Enzyme und ihre Bezugsquelle.

Enzym	Hersteller
*Bse*RI	New England Biolabs GmbH
Ligase (T4 DNA Ligase)	Fermentas GmbH
Lysozym (Lysozyme chloride form from chicken egg white, Grade VI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PfuTurbo DNA Polymerase	Stratagene
PNK (T4 Polynucleotide Kinase)	Fermentas GmbH
Proteinase K (aus Tritirachium album, chromatographisch gereinigt, lyophilisiert, 30 mAnson-U/mg, für biochemische Zwecke und für die Molekularbiologie)	Merck KGaA
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH
RNaseA (Ribonuclease A from bovine pancreas, BioChemika, powder, white, ~90 U/mg)	FLUKA Chemika/Biochemika Fluka Chemie AG
RQ1 DNase I (RNase frei)	Promega GmbH
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	Fermentas GmbH
T4 DNA Polymerase	Fermentas GmbH
Taq DNA Polymerase	Fermentas GmbH

Alle Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, mit den Puffern des Herstellers verwendet. Proteinase K (10 mg/mL) wurde in Milli-Q Wasser und Lysozym (100 mg/mL) in 10 mM Tris-HCl (pH 8) gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert [140]. DNase freie RNaseA (100 mg/mL) wurde in 0,01 M Natriumacetat (pH 5,2) gelöst, für 15 min bei

100°C inkubiert und langsam auf RT abgekühlt. Nach Zugabe von 0,1 Volumen 1 M Tris-HCl (pH 7,4) erfolgte die Lagerung bei -20°C [140].

2.8 Bakterienstämme

Tab. 11 Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
Bacillus subtilis Marburg 168	wt	[123]
Bacillus subtilis TEB1030	*his nprE aprE Bpf ispI -lipA -lipB*	[141]
Escherichia coli BL21 (DE3)	*F⁻ ompT hsdS$_B$* ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3)	[142]
Escherichia coli DH10b	*F⁻ mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR* Δ(*ara,leu*)*7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ-*	[143]
Escherichia coli DH5α	*F⁻ φ80lacZΔM15* Δ(*lacZYA-argF*) *U169 recA1 endA1 hsdR17* (r_k-, m_k+) *phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*	[144, 145]
Pseudomonas putida KT2440	wt	[114, 146]
Pseudomonas putida KT2440T7	*galλ* Gm^R (DE3)	[147]

2.9 Kultivierung von Bakterien

2.9.1 Nährmedien

Flüssige Nährlösungen und feste Nährböden unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung nur durch den Zusatz von 1,2-1,5% (w/v) Agar im Falle des Nährbodens und werden im folgenden Abschnitt als Nährmedium bezeichnet. Die Medien wurden mit VE-Wasser angesetzt und für 20 min bei 120°C und 2 bar sterilisiert [148].

LB-(Luria-Bertani)-Medium [140]
10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,2

EM-Medium modifiziert [149]
20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,2

EM1-Medium
EM-Medium mit 1% (w/v) Glukose*

SHGB-(Schlachthausgenbank)-Medium
20 g/L Trypton, 7,5 g/L Hefeextrakt, 7,5 g/L NaCl, 1% (w/v) Glukose*, pH 7,2

SOB-Medium [140]
20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$*

SOC-Medium [140]
SOB-Medium, 20 mM Glukose*

* separat als Stammlösung autoklaviert und anschließend steril zugesetzt:
50% (w/v) Glukose, 2 M $MgCl_2$

2.9.2 Antibiotika

Antibiotika wurden als Stammlösung angesetzt, mit einem 0,22 µm Membranfilter sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Die Zugabe zum Medium erfolgte erst unmittelbar vor dessen Verwendung und bei einer Mediumtemperatur unterhalb von 50°C [140].

Tab. 12 Antibiotika. Die Antibiotika wurden als Stammlösung angesetzt und in entsprechender Endkonzentration verwendet. t_{reg}: Regenerationszeit des Wirts nach einer Transformation vor der Selektion mit dem Antibiotikum. /: Antibiotikum nicht verwendet.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration (µg/mL)			t_{reg}
		E. coli	*P. putida*	*B. subtilis*	
Ampicillin	200 mg/mL in 50% (v/v) EtOH	150-200	/	/	15 min
Chloramphenicol	25 mg/mL in 70% (v/v) EtOH	7,5	/	7,5	2,5 h
Gentamycin	50 mg/mL in Milli-Q Wasser	10-25	10-25	/	3 h
Kanamycin	50 mg/mL in Milli-Q Wasser	10-25	10-25	10-50	2-2,5 h

2.9.3 Wachstumsbedingungen und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte standardmäßig bei 37°C in LB-Medium. *P. putida* wurde bei 30°C und *B. subtilis* bei 37°C in EM1-Medium (2.9) angezogen. Bakterienkulturen mit Plasmid-kodierter Antibiotikum-Resistenz wurden grundsätzlich unter Selektionsdruck gehalten. Die verwendeten Antibiotikum-Konzentrationen sind in Tab. 12 angegebenen. Plattenkulturen wurden über Nacht bei optimaler Wachstumstemperatur bebrütet und danach für max. vier Wochen bei 4°C gelagert. 1-5 mL Flüssigkulturen wurden mit einer Einzelkolonie einer Plattenkultur inokuliert und i.d.R. im Reagenzglas in einem Brutroller inkubiert. Flüssigkulturen größerer Volumina wurden mit einer Übertag- oder Übernachtkultur im Verhältnis von 1:50 inokuliert und in Erlenmeyerkolben mit zwei oder vier Schikanen in einem Brutschüttler (120 rpm) bebrütet, wobei das Kulturvolumen 0,1-0,2 Gefäßvolumen entsprach. Übernachtkulturen wurden ca. 16 h inkubiert. Zur dauerhaften Konservierung von Bakterienstämmen wurde eine Übernachtkultur mit 20% (v/v) Glycerin oder 7% (v/v) DMSO versetzt, für eine Stunde bei -20°C eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Kulturen sind für mehrere Jahre haltbar [140].

2.10 Probennahme im Schlachthof, Probenaufarbeitung und Kultivierung

2.10.1 Probennahme

Alle Proben wurden in den Räumen der Schweineschlachtung bzw. in der Rinderschlachtung der Frenken Vieh- und Fleisch GmbH (Düren, Deutschland) aus den Bodenabflüssen bzw. den Bodenabflusssieben entnommen. Die Probennahme erfolgte unter unsterilen Bedingungen. Flüssige Proben wurden in sterile Zentrifugenbecher überführt. Feststoffe wurden entweder aus den Abflüssen von Hand entnommen oder mit einem Spatel von der Oberfläche abgekratzt und in sterilen *Falcon tubes* gesammelt. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Proben steril behandelt und auf Eis gelagert.

2.10.2 Probenvorbereitung

Um Schwebeteilchen abzutrennen, wurden flüssige Proben zuerst über einen Faltenfilter filtriert. Anschließend wurden die Zellen der Probe durch Zentrifugation (4°C, 2.665 *x g*, 25 min) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und separat gelagert. Flüssige Proben wurden somit in Pellet und Überstand getrennt. Feste Proben wurden direkt verwendet (2.10.3, 2.14.2).

2.10.3 Anreicherung kultivierbarer Mikroorganismen des Schlachthofs in Flüssigkultur

Kultivierbare Organismen der Proben wurden in 10 mL SHGB-Medium (2.9.1), versetzt mit 20 µL Olivenöl, bei RT (ohne Schütteln) angereichert. Das Medium wurde mit 1 mL Überstand der flüssigen Proben bzw. etwas Zellpellet (2.10.2) inokuliert. Zusätzlich wurden 10 mL Überstand der flüssigen Proben ohne Zugabe von Medium bei RT (ohne Schütteln) inkubiert. Nach 36 h wurde ein Aliquot der Kulturen in DMSO sowie Glycerin kryokonserviert (2.9.3). Die angereicherten Mikroorganismen der restlichen Probe wurden durch Zentrifugation (4°C, 2.665 *x g*, 25 min) pelletiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

2.10.4 Vereinzelung kultivierbarer Mikroorganismen des Schlachthofs

Je 100 µL verschiedener Verdünnungsstufen (10^0-10^{-5}) der Proben wurden auf SHGB-Agar ausplattiert und für 10 Tage bei RT inkubiert. Jeden Tag wurde die Morphologie der Organismen überprüft. Kolonien mit unterschiedlicher Morphologie (z.B. Kolonieform, Pigmentierung, Sekretbildung) wurden vereinzelt [148]. Nach drei fraktionierten Ausstrichen wurden die Organismen in Flüssigkulturen angezogen und mikroskopiert (2.11). Ein Aliquot der Kulturen wurde in DMSO sowie Glycerin kryokonserviert (2.9.3).

2.11 Mikroskopie

Die im Schlachthof entnommenen Proben (2.10.1) sowie kultivierbare Organismen mit unterschiedlicher Morphologie (2.10.4) wurden in Ringerlösung resuspendiert und mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung (2.1) mikroskopiert [148]. Waren die Zellen in der Probe sehr beweglich, wurde der Probe etwas Essigsäure zugesetzt und kurz bei RT inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software* (2.2).

Ringerlösung: 8,6 g/L NaCl, 0,3 g/L KCl, 0,3 g/L $CaCl_2$

2.12 Nachweis von Hydrolasen durch Kultivierung auf Substratagar

Die visuelle Identifizierung von Klonen mit hydrolytischer Enzymaktivität basierte auf der Bildung eines Halos durch die entsprechende Bakterienkolonie. Dazu wurden die Klone entweder direkt auf dem entsprechenden Substratagar ggf. mit Antibiotikum oder Induktor ausplattiert oder Einzelkolonien wurden punktförmig überpickt (2.9). Als Kontrolle

dienten die entsprechenden Stämme ohne Plasmid oder mit Leervektor. Nach Kultivierung ÜN bei optimaler Wachstumstemperatur wurden die Platten bei 4°C gelagert und täglich visuell auf die Bildung von Hydrolysehöfen überprüft. Die Platten wurden zur Dokumentation eingescannt oder mit einer *Canon Digital IXUS 65* Digitalkamera fotografiert (2.1).

2.12.1 Nachweis von Amylase-Aktivität auf Stärkeplatten

Der Nachweis des Stärkeabbaus erfolgt mit Hilfe von Iod in einer Iodprobe [1]. Die aus Iod und Iodid-Ionen gebildeten Polyiodid-Ionen lagern sich im Innern der spiralförmigen Amylose an und färben den stärkehaltigen Agar tiefblau bis schwarz. Amylasen setzten durch Stärkehydrolyse die Polyiodid-Ionen wieder frei, wodurch die Lösung eine gelb-braune Farbe erhält. Daher zeigen Stärke-abbauende Organismen nach der Iodprobe einen gelben Halo um die Kolonie, während Amylase-negative Kolonien tiefblau bis schwarz gefärbt sind [150-153]. *B. subtilis* besitzt ein nicht essenzielles α-Amylasegen [16, 150] und der Stamm TEB1030 (2.8) wurde immer als Positivkontrolle mitgeführt. Die Klone wurden punktförmig auf einer Masterplatte und auf einer Stärkeplatte angezogen. Anschließend wurde die Stärkeplatte mit 2-3 mL Lugol'scher Lösung überschichtet und die Bakterienkolonien mit einem Zellschaber entfernt. Nach 2 min Inkubation bei RT wurde die Lugol'sche Lösung abgenommen und die Kolonien visuell auf Stärkehydrolyse analysiert [24].

Stärkeagar: 1 L EM-Nährboden (ohne Glukose), 1% (w/v) Stärke

Lugol'sche Lösung: 0,5% (w/v) Iod, 1% (w/v) Kalium-Iodid

2.12.2 Nachweis von hämolytischer Aktivität auf Blutagar

Blutagar wird typischerweise zum Nachweis bestimmter Erregerklassen (z.B. Streptokokken, Staphylokokken) eingesetzt. Je nach hämolytischer Aktivität der Bakterien unterscheidet man in α-Hämolyse oder Vergrünung (grünliche Zone durch Entfärbung und Kaliumverlust der roten Blutkörperchen), β-Hämolyse (klare Hämolysezone z.B. durch die Produktion von Streptolysin O oder S) oder γ-Hämolyse (keinerlei Hämolyserverhalten) [24]. Während dieser Arbeit wurde Blutagar zur Identifizierung von Klonen mit hämolytischer Aktivität (β-Hämolyse) verwendet. Der Nährboden wurde nach Herstellerprotokoll angesetzt. Erst kurz vor Gelieren des Agars wurde das defibrinierte Schafblut steril zugegeben.

Blutagar: 40 g/L Blutagar (Basis), 5% (v/v) Schafblut

2.12.3 Nachweis proteolytischer Aktivität auf *skim milk*-Agar

Proteasen spalten Peptidbindungen zwischen Aminosäuren. Kommt es zur Hydrolyse von Casein (Milchprotein) bildet sich ein klarer Hof um die Bakterienkolonie [24]. Der Nährboden und die *skim milk* wurden getrennt autoklaviert und bei einer Temperatur von ≤ 60°C vermischt.

Nährboden (2 *x*): 500 mL LB- oder EM-Agar (ohne Glukose) doppelt konzentriert

skim milk (2 *x*): 30 g *skim milk* in 500 mL VE-Wasser (30 min, 100°C, 2 bar)

2.12.4 Nachweis estero-/lipolytischer Aktivität auf Tributyrin-Agar

Tributyrin-Nährboden ist eine milchig trübe Emulsion. Nach der Hydrolyse von Tributyrin, dem Triacylglycerid der Butansäure, durch Esterasen und Lipasen entstehen die wasserlöslichen Produkte Glycerin und Buttersäure, wodurch sich ein klarer Hof um die Bakterienkolonie bildet [154]. Die Säurebildung bewirkt einen Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot von rot nach gelb. 25 mL Nährboden wurde mit Tributyrin und Gummi arabicum versetzt und mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax T25 basic) emulgiert. Die Emulsion wurde mit Phenolrot Lösung zu dem restlichen Nährboden ($\leq$ 50°C) zugegeben, gemischt und in Platten gegossen.

Tributyrin-Agar: LB- oder EM-Nährboden (ohne Glukose), 15 mL/L Tributyrin, 1,5 g/L Gummi arabicum, 8 mL/L Phenolrot Lösung

Phenolrot Lösung: 5 mM $MgSO_4$, 30 mg/L Phenolrot

2.12.5 Nachweis lipolytischer Aktivität auf Rhodamin B-Agar

Lipasen können durch die Umsetzung von Olivenöl in Gegenwart von Rhodamin B nachgewiesen werden, wobei aktive Klone unter UV-Licht einen fluoreszierenden Hof (orange) um die Kolonie bilden [154, 155]. Die Platten wurden analog zu Tributyrin-Agar hergestellt.

Rhodamin B-Agar: LB- oder EM-Nährboden (ohne Glukose), 20 mL/L Olivenöl, 1,5 g/L Gummi arabicum, 0,01 g/L Rhodamin B

Rhodamin B-Lösung: 1 mg/mL in MilliQ-Wasser

2.13 Blau-Weiß-Selektion über α-Komplementation in *E. coli*

Die Blau-Weiß-Selektion [156] basiert auf der Unterscheidung der β-Galaktosidase Aktivität in Gegenwart des Substrats X-Gal und des Induktors IPTG. Dabei muss ein Wirtsbakterium (z.B. *E. coli* DH5α) verwendet werden, das die ω-Peptidregion der β-Galaktosidase chromosomal-kodiert, sowie Vektoren (z.B. pUC18) mit einer MCS in der komplementierenden α-Peptidregion. Nach der Transformation von *E. coli* DH5α mit einem Ligationsansatz wurden die Zellen auf selektivem Indikatormedium ausplattiert und für 16-20 h bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden für mehrere Stunden bei 4°C gelagert und positive Transformanden durch eine weiße Färbung identifiziert.

Indikatormedium: LB-Agar, 150 µg/mL Ampicillin, 165 µM IPTG, 6 mL X-Gal (2% (w/v) in DMF)

2.14 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.14.1 Standard ‚Mini' Präparation

Aus *P. putida* wurde Plasmid-DNA mittels *innuPREP Plasmid Mini Kit* nach Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten Puffer isoliert. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die Plasmid-DNA mit 40 µL Milli-Q Wasser eluiert.
Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *B. subtilis* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [157] ohne Kitsystem. Das Pellet aus 2-4 mL Übernachtkultur, erhalten durch Zentrifugation (2 min, 16.060 *x g*, RT), wurde vollständig in 250 µL Puffer I

resuspendiert. Bei der Isolierung von Plasmid-DNA aus *B. subtilis* wurden zusätzlich 2 mg/mL Lysozym zugesetzt und die Zellsuspension 30 min bei 37°C inkubiert. Die alkalischen Lyse erfolgte durch Zugabe von 250 µL Puffer II. Nach Mischen durch mehrfaches Invertieren und fünfminütiger Inkubation bei RT erfolgte die Neutralisierung mit 350 µL Puffer III. Der plasmidhaltige Überstand wurde durch Zentrifugation (10 min, 16.060 *x g*, RT) von Protein-SDS-Präzipitaten, denaturierter chromosomalen DNA, sowie Zelltrümmern abgetrennt, abgenommen und die Plasmid-DNA durch Isopropanol-Fällung (2.14.3) aufgereinigt, allerdings ohne Natriumacetat zuzusetzen.

Puffer I: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNaseA, pH 8

Puffer II: 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS

Puffer III: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

2.14.2 Isolierung metagenomischer DNA

Diese Methode [140, modifiziert] diente der Isolierung von DNA aus Bakterienzellen eines Biofilms oder einer Wasserprobe und sollte nicht zur Extraktion von DNA aus einer Bodenprobe verwendet werden, da verunreinigende Substanzen wie Huminsäuren koextrahiert werden. Je ein Gramm der Probe wurde schonend in 3 mL Lösung #1 resuspendiert und für 1,5 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min durch mehrmaliges Invertieren gemischt wurde. Nach Zugabe von 6 mL Lösung #2, 2 mM DTT und 50 µg/mL RNaseA (2.7) folgte eine Inkubation für 30 min bei 55°C. Die Lösung wurde alle 5 min durch Invertieren gemischt. 100 µg/mL Proteinase K wurden zugesetzt und für 15 min bei 55°C im Wasserbad gewärmt. Anschließend wurde die Suspension zur Homogenisierung durch eine Spritze mit einer Kanüle (Ø 0,9 mm) gezogen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde über eine Phenol-Chloroform Extraktion (2.14.4) und Isopropanol-Fällung (2.14.3) gereinigt und in ≥100 µL TE-Puffer (65°C) über Nacht bei 4°C gelöst. Die isolierte DNA kann bei 4°C (kurze Zeit) oder bei -20°C (dauerhaft) gelagert werden, wobei häufiges Einfrieren und Auftauen vermieden werden sollte.

Lösung #1 (pH 8): 345 mM Saccharose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mg/mL Lysozym

Lösung #2 (pH 8) : 300 mM NaCl, 2% (w/v) SDS, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA

2.14.3 Präzipitation von DNA durch Isopropanol-Fällung

Die Isopropanol-Fällung [140] diente der Konzentrierung und Reinigung von DNA und erfolgte in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen und Isopropanol. Dazu wurde die DNA in einem Volumen von min. 300 µL mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 0,7 Vol. Isopropanol (-20°C) für ca. 5 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (30 min, 16.060 *x g*, RT). Der Überstand wurde entfernt, das DNA-Pellet mit 300 µL 70% (v/v) EtOH (-20°C) gewaschen (Zentrifugation: 15 min, 16.060 *x g*, RT) und getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 30-50 µL Milli-Q Wasser oder TE-Puffer (65°C) resuspendiert.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, Milli-Q Wasser, pH 7,6-8

2.14.4 Phenol-Chloroform Extraktion

Die Phenol-Chloroform Extraktion [140] trennt Proteine und Nukleinsäuren. Nach Zugabe von 0,5-1 Vol. Phenol-Chloroform zur DNA-Lösung wurde solange durch Invertieren gemischt, bis sich eine Emulsion bildete. Die gelbliche, organische Unterphase und die wässrige Oberphase wurden durch Zentrifugation getrennt (Eppi: 2 min, 16.060 *x g*, RT; *Falcon tube*: 5 min, 3,000 *x g*, 4°C). Enthält die wässrige DNA-Lösung viele Salze (>0,5 M) oder große Mengen an Saccharose (>10% (w/v)), kann es zu einer Phasenumkehr kommen. Die wässrige Phase wurde, ohne die Interphase oder die organische Phase zu verschleppen, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5-1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und intensiv gemischt, bis sich eine Emulsion bildete. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation (s.o.) wurde die DNA der wässrigen Phase durch eine Isopropanol-Fällung (2.14.3) isoliert.

2.14.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren [140] erfolgte visuell über einen Tüpfeltest oder über eine photometrische Bestimmung durch die Messung der optischen Dichte mit dem *BioPhotometer* (Eppendorf AG) in Verbindung mit der Ultra-Mikro-Messzelle *TrayCell* (Hellma GmbH & Co. KG).

2.14.5.1 Tüpfeltest

1 µL der Probe bzw. einer Verdünnung wurde neben einer Konzentrationsreihe des DNA Standards (Herring Sperm DNA, 10-50 ng/µL) auf eine Tüpfelplatte getropft. Waren die Proben und der Standard vollständig getrocknet, konnte die Helligkeit der Tropfen bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 260 nm verglichen und somit die Konzentration abgeschätzt werden.

Tüpfelplatte: Petrischale mit Nocken (35 *x* 10 mm), 0,8% (w/v) Agarose, 0,5 µg/mL EtBr

2.14.5.2 Photometrische Bestimmung

Die DNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm über das Programm *dsDNA* des *BioPhotometer*s nach Herstellerprotokoll bestimmt. Als Küvette wurde die *TrayCell* Messzelle in Kombination mit zwei verschiedenen Deckeln, abhängig vom Messbereich, verwendet (Tab. 13).

Tab. 13 Deckelgrößen der *TrayCell* Messzelle und die dazugehörigen Parameter.

Deckelgröße	virtueller Verdünnungsfaktor	Probenvolumen	Messbereich
1 mm	10	3-5 µL	15-800 ng/µL
0,2 mm	50	0,7-4 µL	100-4.000 ng/µL

Ein Absorptionswert von eins entspricht bei einem Zentimeter Schichtdicke einer Konzentration von 50 µg/mL (dsDNA). Um die DNA-Konzentration zu berechnen, muss der gemessene Wert mit dem virtuellen Verdünnungsfaktor (1 cm Schichtdicke *x* Deckelgröße^{-1}) verrechnet werden:

DNA-Konzentration (ng/µL) = OD_{260} *x* virtueller Verdünnungsfaktor

2.14.6 Berechnung der Stoffmenge von DNA

Die Stoffmenge von DNA wurde über die folgende Formel berechnet (*BioMath Calculator*, 2.2):

$$\text{DNA - Stoffmenge}\,[\text{pmol}] = \mu\text{g DNA} \times \frac{\text{pmol}}{600\,\text{pg}} \times \frac{10^6\,\text{pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{1}{\text{N}}$$

‚N' ist die Anzahl der Nukleotide (in die Formel eingesetzt in Basenpaare),
‚660 pg/pmol' ist das durchschnittliche Molekulargewicht eines einzelnen Nukleotidpaars und
‚10^6 pg/µL' ist ein Umrechnungsfaktor von pg in µg.

Zur Berechnung der ‚DNA-Enden' wurde die DNA-Stoffmenge mit dem Faktor zwei multipliziert.

2.15 *in vitro* Modifikation von DNA

2.15.1 Hybridisierung des Polylinkers

Der Polylinker wurde aus den phosphorylierten Oligonukleotid I und II (Abb. 3), bezogen von der Firma Eurofins MWG Operon, konstruiert. Die beiden Oligonukleotide waren über nahezu die gesamte Sequenz komplementär, verfügten aber nach der Hybridisierung jeweils über einen phosphorylierten 5'-Überhang. Zur Hybridisierung wurden die Oligonukleotid in Milli-Q Wasser gelöst (100 pmol/µL), im Verhältnis von 1:1 gemischt, für 10 min bei 99°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt.

```
1   GATCATTTAAATGCCCGGGCTAGCGAATTCCGGATCCGCCCGGGCTACGTATTTAAAT
    GATCATTTAAATACGTAGCCCGGGCGGATCCGGAATTCGCTAGCCCGGGCATTTAAAT

2                          BmtI
                         ------+
                    SrfI        EcoRI   BamHI          SnaBI
                  ----+---     -+----  -+----         ---+---
            SwaI          NheI      AccIII      SrfI          SwaI
         ----+----      -+-----    -+-----   -----+---      ----+---
     gatcatttaa atgcccgggc tagcgaattc cggatccgcc cgggctacgt atttaaat
         taaatt tacgggcccg atcgcttaag gcctaggcgg gcccgatgca taaatttactag
```

Abb. 3 Sequenz des Polylinkers. 1: Die Sequenz der phosphorylierten Oligonukleotide I und II ist in 5'→3' Orientierung angegeben. Die Basen, die nach der Hybridisierung einen 5'-Überhang bilden, sind in ‚fetter Schrift' hervorgehoben. 2: Merkmale des Polylinkers. ‚-': Erkennungssequenz des jeweiligen Restriktions-enzyms. ‚+' Base der Hydrolyse in der Erkennungssequenz durch das RE.

2.15.2 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme (RE)

Die hydrolytische Spaltung von DNA erfolgte durch Restriktionsenzyme nach Herstellerprotokoll unter Verwendung der mitgelieferten Puffer bei optimaler Reaktionstemperatur, wobei der Anteil an Enzymlösung in einer Reaktion nie mehr als 5% (v/v) betrug. Bei Verwendung von zwei kompatiblen RE wurden jeweils gleiche Enzymaktivitäten (*units*) in die Reaktion eingesetzt. Waren die Reaktionstemperaturen oder Puffer beider Enzyme unterschiedlich, wurde die DNA erst mit einem Enzym hydrolysiert, anschließend über eine Isopropanol-Fällung (2.14.3) gereinigt und nach Resuspension in Milli-Q Wasser mit dem anderen Enzym verdaut. Das Restriktionsmuster von DNA wurde über analytische Restriktionsverdaue mit anschließender AGE (2.16)

überprüft, während durch präparative Verdaue und Aufreinigung der Zielbande über Gelelution (2.17) größere DNA Mengen zur Verfügung gestellt wurden.

Analytischer Restriktionsverdau: 100-300 ng DNA, 1,5 µL Puffer (10 *x*), 2 U RE, ad 15 µL Milli-Q Wasser, Inkubation: 30-120 min

Präparativer Restriktionsverdau: >10 µg DNA, 10 µL Puffer (10 *x*), 1-2 U RE pro µg DNA, ad 100 µL Milli-Q Wasser, Inkubation: ≥4 h

2.15.3 Partialverdau von metagenomischer DNA

Hochmolekulare metagenomische DNA kann durch partielle Hydrolyse in kleinere DNA Fragmente mit definierter Größe gespalten werden [140]. Um mehr Varianz in der Fragmentierung zuzulassen, erfolgt der Verdau typischerweise mit einem *four base cutter* RE. Die optimalen Parameter der Reaktion wurden über eine Restriktionskinetik bestimmt.

Enzymlösung: 1 U/µL *Bsp*143I Anfangskonzentration in Milli-Q Wasser, später variierend

Restriktionsansatz: 4 µg DNA, 4 µL Reaktionspuffer (10 *x*), ad 36 µL Milli-Q Wasser

Stopp-Puffer (6 *x*): 50% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) SDS, 100 mM EDTA (pH 8), etwas Bromphenolblau

Der Restriktionsansatz wurde für 10 min bei optimaler Reaktionstemperatur inkubiert. Währenddessen wurden Eppis mit 1 µL Stopp-Puffer (6 *x*) gefüllt und auf Eis gelagert, sowie eine *Bsp*143I Arbeitslösung mit einer Anfangskonzentration von 1 U/µL hergestellt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min wurden 4 µL Enzymlösung zu dem Restriktionsansatz gegeben und intensiv gemischt. Es erfolgte die Entnahme von 4 µL Aliquots zu den Zeitpunkten $t = 0$, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 min, die in die vorbereiteten Eppis überführt und auf Eis gelagert wurden. Die Restriktionskinetik wurde über AGE (0,5% (w/v) TAE Gel, 2.16) kontrolliert. Optimal ist eine gute Fragmentierung der DNA (gleichmäßige Verteilung von großen und kleinen DNA Fragmenten) nach 6-8 min. Die Kinetik wurde mit variierender Enzymmenge so lange wiederholt, bis eine exakte Restriktionsdauer bei definierter Enzymmenge bestimmt werden konnte. Anschließend wurde die metagenomische DNA exakt nach den zuvor ermittelten Parametern präparativ hydrolysiert, wobei mindestens 60 µg metagenomische DNA (15 Aliquots) verdaut wurden. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Puffer beendet und vereinigt. Nach präparativer AGE und dem Ausschneiden des Zielbereichs (z.B. 3-6 Kb) wurde die DNA über Elektroelution isoliert.

2.15.4 *blunting*

Überhängende DNA-Enden wurden mit einer T4 DNA Polymerase und dNTPs zu glatten Enden modifiziert indem 5'-Überhänge aufgefüllt (5'→3' DNA Polymerase Aktivität) und 3'-Überhänge abgebaut (3'→5' Exonukleaseaktivität) wurden [140].

Reaktionsansatz: 1 µg DNA, 1 *x* Reaktionspuffer, 1 U T4 DNA Polymerase, 0,1 mM dNTPs, Inkubation für 20 min bei RT

2.15.5 Dephosphorylierung von DNA

Bei ungerichteten Klonierungen wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert, um die Selbstligation zu reduzieren [140]. Dazu wurde die Plasmid-DNA nach einem Restriktionsverdau mit Isopropanol gefällt (2.14.3), in Reaktionspuffer (1 *x*) aufgenommen und mit einer *unit* SAP pro 10 pmol Vektorenden für 1 h bei 37°C inkubiert (2.7, 2.14.6).

2.15.6 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen kompatiblen, überhängenden Enden (*sticky ends*) oder glatten Enden (*blunt ends*) doppelsträngiger DNA-Moleküle unter Verbrauch von ATP. Zur effektiven *in vitro* Ligation von DNA mit *sticky ends* wurden 100 ng Vektor DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit Insert-DNA, Puffer (1 *x*) und 2,5-5 U Ligase für mindestens 1 h bei 22°C inkubiert. *Blunt end* Ligationen basierten auf 100 ng Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:5 bis 1:10 mit Insert-DNA, Puffer (1 *x*) sowie 5 U Ligase und wurden ÜN bei 22°C inkubiert [140].

2.15.7 Ligationskontrolle

Ligationskontrollen dienten der Überprüfung der Qualität eines Vektors nach erfolgter Dephosphorylierung. Dazu wurden drei Reaktionen wie folgt pipettiert und ÜN bei 22°C inkubiert.

Tab. 14 Reaktionsansätze der Ligationskontrolle. Ligase: T4 DNA Ligase (5 U/µL). PNK: T4 Polynucleotide Kinase (10 U/µL). ‚-': nicht zugesetzt.

Komponente	Reaktion A	Reaktion B	Reaktion C
Vektor-DNA	100 ng	100 ng	100 ng
Ligase Puffer (10 *x*)	2 µL	2 µL	2 µL
Enzym	-	0,5 µL Ligase	je 0,5 µL Ligase und PNK
Milli-Q Wasser	ad 20 µL	ad 20 µL	ad 20 µL

Nach Transformation und Selektion chemisch kompetenter *E. coli* DH5α mit je 10 µL Ligationsansatz wurden die *cfu* bestimmt und die Transformationseffizienz (2.23.1) berechnet. Reaktion A gibt Auskunft über den Hintergrund an ungeschnittenem Vektor. Reaktion B spiegelt die Menge an geschnittenem aber nicht dephosphorylierten Vektor wider. Reaktion C führt zur maximalen Ausbeute an Klonen, vorausgesetzt ATP ist nicht limitierend. Der Vektor wurde als ausreichend dephosphoryliert angesehen, wenn das Verhältnis von Reaktion B zu C mindestens 1:100 betrug.

2.15.8 Vorbereitung episomaler Plasmide für die Transformation von *B. subtilis* über natürliche Kompetenz

Soll *B. subtilis* mit episomalen Plasmiden über natürliche Kompetenz transformiert werden, müssen diese zuvor modifiziert werden [158-162]. 0,5-1 µg Plasmid-DNA wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 µL durch ein Restriktionsenzym linearisiert. Nach Hitzeinaktivierung des REs erfolgte die Zugabe von 2 µL Ligasepuffer (10 *x*), 5 U Ligase und Milli-Q Wasser (ad 20 µL). Die Ligation wurde min. 1 h bei 22°C inkubiert. Dabei

bilden sich Konkatemere. Dies kann bei Bedarf über eine analytische AGE kontrolliert werden (2.16).

2.16 Agarose Gelelektrophorese (AGE)

Die AGE [140] diente der Analyse (analytische AGE) und Aufreinigung (präparative AGE) von DNA. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente lag die Agarose-Konzentration des Gels zwischen 0,5-1,5% (w/v). Niedrigprozentige Agarosegele wurden mit TAE-Puffer (1 *x*) und hochprozentige mit TBE-Puffer (0,5 *x*) hergestellt und mit 0,5 µg/mL EtBr versetzt. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 0,2 Vol. Stopp-Puffer (2.15.2) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurde immer ein DNA-Molekulargewicht Standard mitgeführt, wobei der Standard je nach Größenbereich der DNA variierte. Die Elektrophorese erfolgte standardgemäß bei 3-4 V/cm für 25-60 min in horizontalen Gelkammern (Tab. 1), bis die DNA ausreichend aufgetrennt war. Metagenomische DNA wurde für mindestens 16 h bei 2 V/cm und einer Trennstrecke von ca. 25 cm analysiert. Anschließend erfolgte die Visualisierung der DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (λ = 254-366 nm) und Dokumentation mit dem *Eagle Eye II Imaging System* (Statagen AG).

TAE-Puffer (1 *x*): 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8

TBE-Puffer (0,5 *x*): 45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA, pH 8,3

DNA-Molekulargewicht Standards:

50 Bp -1 Kb: 0,5 µg *GeneRuler 50 Bp DNA Ladder* (Fermentas GmbH)
Banden (in Bp): 50, 100, 150, 200, 250, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000

250 Bp - 10 Kb: 0,5 µg *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* (Fermentas GmbH)
Banden (in Bp): 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 2.5000, 3.000, 3.500, 4.000, 5.000, 6.000, 8.000, 10.000

500 Bp - 40 Kb: 1 µg *1 Kb DNA Extension Ladder* (Invitrogen AG)
Banden (in Bp): 506/517, 1.018, 1.636, 2.036, 3.054, 4.072, 5.000/5.090, 6.108, 7.126, 8.144, 10.000, 15.000, 20.000, 40.000

2.17 Elektroelution

Die Elektroelution ist eine Methode zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen mit hoher quantitativer Ausbeute [140]. Zuerst wurde ein entsprechend großes Stück Dialyseschlauch kurz in VE-Wasser aufgekocht, mit fließendem VE-Wasser gespült und 30 min in TAE-Puffer (2.16) äquilibriert. Der Dialyseschlauch, verschlossen mit zwei Schlauchklemmen und gefüllt mit TAE-Puffer sowie dem Gelstück mit der zu eluierenden DNA, wurde in eine mit TAE-Puffer (4°C) befüllte Gelkammer gelegt. Das Gelstück wurde parallel zu den Elektroden ausgerichtet. Die Elektroelution erfolgte typischerweise für 2 h und 80 V bei 4°C. Die Vollständigkeit der Elution wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht kontrolliert. Anschließend wurde das elektrische Feld für etwa 30 sec umgekehrt. Die eluierte DNA wurde über Isopropanol-Fällung konzentriert.

Dialyseschlauch: Servapor Dialysis Tubing, regenerated cellulose, MWCO 12,000-14,000, pore diameter ca. 25 Å, diameter: 21 mm (Serva Electrophoresis GmbH)

2.18 Amplifikation von DNA durch PCR

2.18.1 Standard-PCR

PCR ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Amplifikation definierter DNA-Abschnitte aus einem Gemisch von DNA-Molekülen [163]. Die *annealing* Temperatur (T_A) lag 3-8°C unter der Schmelztemperatur T_M (2.6). Die Elongationszeit (t_E) war abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA und betrug 1.000 Bp/min. PCR-Ansätze (50 µL) bestanden typischerweise aus 50-100 ng *template* DNA, 1 *x* Reaktionspuffer, 0,4 µL dNTPs, 50 pmol *fw*-Primer, 50 pmol *bw*-Primer und DNA Polymerase. Je nach PCR variierten die Einstellungen des *Mastercycler Gradient* leicht: 1 *x* (95°C, 2 min), 30-35 *x* ((95°C, 45 sec), (T_A, 45 sec), (72°C, t_E)), 1 *x* (72°C, 10 min).

PfuTurbo DNA Polymerase: 2,5 U, Fehlerrate = $1{,}3 \times 10^{-6}$

Taq DNA Polymerase: 1,25 U, Puffer mit Ammoniumsulfat, 2 mM $MgCl_2$, Fehlerrate = $2{,}2 \times 10^{-5}$

2.18.2 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wurde analog einer Standard-PCR durchgeführt, aber mit dem Unterschied, dass die DNA aus ganzen Zellen amplifiziert wurde ohne die *template* DNA vorher zu präparieren. Dazu wurde die Bakterienkolonie gepickt, auf einer Masterplatte gesichert und in 1 mL Milli-Q Wasser resuspendiert. Bei Gram-positiven Organismen erfolgte die Zugabe von 2 mg/mL Lysozym und eine Inkubation für 10 min bei 37°C. Die Zellsuspension wurde erhitzt (10 min, 99°C), intensiv gemischt und zentrifugiert (2 min, 16.060 *x g*, RT). 1 µL der DNA-haltigen Lösung wurde als *template* verwendet.

2.18.3 *overlap extension* PCR (oePCR)

Eine Punktmutation (Austausch eines Basenpaares) wurde in Vektor-Sequenzen durch eine oePCR [140, 164] eingefügt. Dazu wurden insg. vier Primer abgeleitet. Zwei Primer waren komplementär (interne Primer) und beinhalteten die Mutation in der Zielsequenz, die beiden anderen Primer (externe Primer) hybridisierten im Plasmid *upstream* und *downstream* der Mutationsstelle. Zwei getrennte Standard-PCRs (2.18.1) mit jeweils einem internen und einem externen Primer sowie Plasmid-DNA als *template* wurden durchgeführt. Nach Aufreinigung der PCR Produkte wurde die Stoffmenge berechnet (2.14.6) und beide PCR Produkte wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt. Es folgte eine dritte PCR unter Verwendung der beiden externen Primer und 50 ng PCR Produktgemisch (s.o) als *template*.

2.18.4 *real time* PCR (RT-PCR)

Die Transkriptmenge bei einer Expression oder die Kopienzahl von Vektoren wurde unter Verwendung des RT-PCR Cyclers *Ep-gradient S* in Kombination mit 96 Well PCR-Platten (*twin.tec,* Eppendorf AG) und dem *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* nach Herstellerangaben (*QuantiTect Multiplex RT-PCR Handbook*) bestimmt, wobei das Reaktionsvolumen auf 20 µL reduziert wurde. RNA wurde über das *RNeasy Mini Kit* isoliert (2.4), wobei koextrahierte DNA nach der Isolierung für 2 h bei 37°C mit RQ1 DNase I (2.7) degradiert wurde. Die Gesamt-DNA wurde mittels *DNease Blood & Tissue Kit* gewonnen

(2.4). Der *Ep-gradient S* wurde wie folgt programmiert: 1 *x* (50°C, 30 min), 1 *x* (94°C, 15 min), 35 *x* ((94°C, 15 sec), (52°C, 30 sec), (72°C, 30 sec), Fluoreszenzmessung), 1 *x* (94°C, 15 sec), 1 *x* (52°C, 15 min). Die Auswertung erfolgte mit der Software von Eppendorf. Die Konzentration der unbekannten Probe wurde über einen Massenstandard (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg) von genomischer- oder Plasmid-DNA berechnet.

2.19 Bestimmung der Plasmid-Kopienzahl über RT-PCR

Die Wirtsorganismen wurden mit Plasmid-DNA transformiert (2.23), selektiert und in Flüssigkulturen angezogen. Aus einer Übernachtkultur wurde eine 50 mL Hauptkultur gestartet und bis zu einer $OD_{600} = 1$ inkubiert. Aus zwei OD_{600} wurde die Gesamt-DNA über das *DNease Blood & Tissue Kit* (2.4) isoliert und eine RT-PCR mit 100 ng Gesamt-DNA durchgeführt (Tab. 8, 2.18.4). Anschließend wurde die Gesamtmenge an isolierter DNA berechnet:

$$ng_{total} = \text{DNA-Konzentration}\,(ng \times \mu L^{-1}) \times \frac{V_{total}\,(\mu L)}{DNA_{eingesetzt}\,(ng)}$$

‚ng_{total}' ist Gesamtmenge an isolierter DNA (genomische DNA und Plasmid DNA) aus zwei OD_{600},
‚DNA-Konzentration' ist die Konzentration der DNA in der Probe bestimmt über den Massenstandard,
‚V_{total}' ist das Gesamtvolumen der Probe und
‚$DNA_{eingesetzt}$' ist die Menge an eingesetzter DNA in die RT-PCR.

Über die Gesamtmenge an isolierter DNA und der Größe von Plasmid und Bakteriengenom wurde dann die Kopienzahl pro Zelle berechnet, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde [165]. Die Berechnung der Kopienzahl von pEBP18 (10.706 Bp) basierte auf folgenden Genomgrößen: 4.215.606 Bp *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 [123], 4.639.675 Bp *E. coli* str. K-12 substr. MG1655, [166] und 6.181.863 Bp *P. putida* KT2440 [114].

$$\text{Plasmid-Kopienzahl} = \frac{\text{Genomgröße (Bp)} \times ng_{total}\ \text{Plasmid}}{\text{Plasmidgröße (Bp)} \times ng_{total}\ \text{genomische DNA}}$$

‚Genomgröße' ist die Größe des Bakteriengenoms,
‚Plasmidgröße' ist die Größe des Plasmids und
‚ng_{total}' ist Gesamtmenge an isolierter Gesamt-DNA (genomische DNA bzw. Plasmid DNA) aus zwei OD_{600}.

2.20 Klonierungen

2.20.1 Klonierung ribosomaler DNA

16S und 18S rDNA Amplifikationen erfolgte mit den Primerpaaren 616V und 1492R (16S) bzw. E4 und E1688 (18S) unter Verwendung von *Taq* DNA Polymerase und 140 ng metagenomische DNA als *template* (Tab. 7, 2.18.1). Nach der Isopropanol-Fällung der PCR Produkte und Elution in Milli-Q Wasser (2.14.3) wurde eine Ligation mit dem *pGEM-T Easy Vector* (2.4) angesetzt. Die Ligation erfolgte ÜN bei 22°C in einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 unter Verwendung der mitgelieferten Komponenten nach Herstellerangaben, wobei das Reaktionsvolumen um 50% reduziert wurde. Chemisch kompetente *E. coli* DH5α wurden mit 3 µL Ligationsansatzes transformiert (2.23.4) und über Blau-Weiß-Selektion (2.13) positive Klone für weitere Analysen ausgewählt.

2.20.2 Standard-Klonierung von PCR Produkten

DNA wurde über PCR unter Verwendung einer *PfuTurbo* DNA Polymerase amplifiziert (2.18). 5 µL PCR Produkt wurden über AGE (2.16) kontrolliert. Spezifische Amplifikationen wurden über Isopropanol-Fällung aufgereinigt (2.14.3). Produkte mit mehreren Banden wurden über eine präparative AGE aufgetrennt und die Zielbande über Gelelution (2.4) isoliert. Nach Konzentrationsbestimmung erfolgte eine Ligation (2.15.6) in pUC18, der *Sma*I hydrolysiert und aufgereinigt vorlag. Chemisch kompetente *E. coli* DH5α wurden mit dem Ligationsansatz transformiert (2.23.4) und über Blau-Weiß-Selektion (2.13) positive Klone ausgewählt, deren Plasmide isoliert (2.14.1) und über Restriktionsanalyse (2.15.2) kontrolliert wurden. Mindestens 100 µg Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde präpariert (2.4), abermals über Restriktionsanalyse überprüft und sequenziert (2.21).

2.20.3 Subklonierung von DNA

Unter Subklonierung wird die Klonierung von DNA aus einem Plasmid in ein anders verstanden. Dazu wurde das PCR Produkt in pUC18 kloniert und vervielfältigt, sequenziert und bei korrekter Sequenz in den eigentlichen Zielvektor überführt. Ca. 30 µg Zielvektor und min. 15 µg pUC18_Insert wurden präparativ mit den entsprechenden RE verdaut (2.15.2) und anschließend die Zielbanden über AGE (2.16) und Gelelution (2.4) isoliert. Nach Konzentrationsbestimmung (2.14.5) und Ligation (2.15.6) wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5α transformiert. Von ca. 10 Transformanden wurde Plasmid-DNA präpariert (2.14.1) und über Restriktionsanalyse kontrolliert. Mindestens 100 µg Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde isoliert (2.4) und abermals über Restriktionsanalyse und ggf. PCR überprüft (2.18.1).

2.21 Sequenzierung

2.21.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA, 50-100 ng/µL in Milli-Q Wasser, wurde standardmäßig bei der Firma *Eurofins MWG Operon* mit dem Sequenzierservice ‚Value Read' sequenziert. Ggf. wurden die Primer für die Sequenzierung in einer Konzentration von 2 pmol/µL in Milli-Q Wasser mitgeschickt.
In einer Kooperation mit dem *Göttingen Genomics Laboratory (G2L)* wurden die Sequenzen ausgewählte Plasmide aktiver Klone der Metagenombanken aufgeklärt. Dazu wurden die metagenomische Insert-DNA zuerst mit den Primern S15 und S24 (2.6) nach der ‚Sanger-Methode' [167, 168] ansequenziert. Anschließend wurde das komplette Plasmid über die 454-Technik [169-171] mit min. 10 *x* Abdeckung (*coverage*) sequenziert. Nicht eindeutige Bereiche wurden nachträglich über weitere Sanger-Sequenzierungen analysiert.

2.21.2 Sequenzvisualisierung und -auswertung

Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms *Clone Manager* visualisiert und verwaltet. Nach einer Sequenzierung wurde die Sequenz auf Bereiche mit geringer Qualität (Angabe *Eurofins MWG Operon*, Qualität: 0-19) überprüft und ggf. entfernt. Sequenzvergleiche wurden mit BLAST durchgeführt (2.2), wobei entweder zwei

Sequenzen gegeneinander *aligned* oder die Datenbank nach einer unbekannten Sequenz durchsucht wurde. Volllängensequenzen wurden aus Teilsequenzen nach Identifizierung von Konsensusbereichen über BLAST zusammengesetzt.

2.22 Phylogenetische Analyse von ribosomaler DNA

Einen ersten Überblick über die Diversität der Organismen einer Probe wurde über BLAST Analysen der klonierten und sequenzierten ribosomalen DNA gewonnen (2.21.2). Zur genauen phylogenetischen Einordnung wurde ein Stammbaum erstellt, dies erfolgte in Kooperation mit Dr. Mirjam Perner (Biozentrum Klein Flottbek, Mikrobiologie, Hamburg) über das Softwarepaket ARB [126]. Die Sequenzen wurden hierzu mittels eines *positional tree* Verfahrens und einer lokalen 16S rDNA Datenbank verglichen und ausgerichtet. Das *Alignment* wurde anhand der Sekundärstrukturen der 16S rRNA manuell korrigiert. Aus den unbekannten Sequenzen und den ausgewählten Referenzsequenzen wurde ein Stammbaum erstellt. Die Risikostufe von bekannten Organismen wurde über deren Typstämme und die DSMZ Datenbank (2.2) bestimmt.

2.23 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Bei Bedarf wurde bei der Transformation eine Positivkontrolle in Form eines Kontrollvektors und eine Negativkontrolle (Wasserkontrolle) ohne Plasmid-DNA mitgeführt.

2.23.1 Berechnung der Transformationseffizienz

Durch Plattierung serieller Verdünnungen der transformierten Zellen auf selektivem Nährboden, Inkubation über Nacht bei optimaler Wachstumstemperatur und Auszählen der Kolonien am Folgetag wurde die Transformationseffizienz berechnet. Sie gibt Aufschluss über die Anzahl der genetisch veränderten Organismen pro Mikrogramm Plasmid-DNA.

$$\text{Transformationseffizienz}\,[cfu/\mu g] = \frac{V_{total}}{V_{plattiert}} \times cfu \times \frac{10^3\ \text{ng} \times \mu g^{-1}}{\text{eingesetzte DNA (ng)}}$$

‚*cfu*' (*colony forming units*) ist die Anzahl der ausgezählten Bakterienkolonien,
‚V_{total}' ist das Gesamtvolumen der Zellsuspension,
‚$V_{plattiert}$' ist das ausplattierte Volumen der Zellsuspension,
‚10^3 ng *x* μg^{-1}' ist ein Faktor zur Umrechnung von ng in µg und
‚eingesetzte DNA (ng)' ist die Menge der eingesetzten DNA in die Transformation.

2.23.2 Berechnung der Transformationsrate

Serielle Verdünnungen der transformierten Zellen wurden auf Vollmedium (ohne Antibiotikum) ÜN angezogen. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt und die Lebendzellzahl (LZZ) wurde berechnet (siehe unten). Über die LZZ und die Transformationseffizienz (2.23.1) wurde die Transformationsrate bestimmt. Die Transformationsrate gibt Aufschluss über die Anzahl der Zellen, die während der Transformation ein Plasmid aufgenommen haben.

$$\text{Lebendzellzahl}\,[cfu] = \frac{V_{total}}{V_{plattiert}} \times cfu$$

$$\text{Transformationsrate}\,[\mu g^{-1}] = \frac{\text{Transformationseffizienz}\,[cfu/\mu g]}{\text{Lebendzellzahl}\,[cfu]}$$

‚*cfu*' (*colony forming units*) ist die Anzahl der ausgezählten Bakterienkolonien,
‚V_{total}' ist das Gesamtvolumen der Zellsuspension und
‚$V_{plattiert}$' ist das ausplattierte Volumen der Zellsuspension.

2.23.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* DH5α oder BL21 (DE3) wurden durch eine Behandlung mit Calciumchlorid erzeugt [140, 172], wobei die Präparation mit Zellen erfolgte, die zuvor 3 *x* fraktioniert ausgestrichen worden waren. Aus einer Übernachtkultur wurde eine Hauptkultur mit einer $OD_{600} = 0{,}05$ inokuliert und bis zum Erreichen von $OD_{600} = 0{,}5$ unter Schütteln inkubiert (2.9). Das Zellwachstum wurde auf Eis (10 min) gestoppt. Die Zellen wurden in 7 mL FB-Puffer (4°C) pro 100 mL Hauptkultur aufgenommen (Zentrifugation: 10 min, 4°C, 1750 *x g*) und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (s.o) wurden die Zellen in 1,7 mL FB-Puffer (4°C) pro 100 mL Hauptkultur resuspendiert, à 100 µL aliquotiert für 1 h bei -20°C eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

FB-Puffer: 100 mM KCl, 50 mM $CaCl_2$, 10% (w/v) Glycerin, 10 mM Kaliumacetat, pH 6,4

2.23.4 Chemische Transformation von *E. coli*

100 µL chemisch kompetente Zellen (2.23.3) wurden auf Eis aufgetaut und mit 50-100 ng Plasmid-DNA oder 10 µL Ligationsansatz (2.15.6) vermischt. Je nach Vektorgröße unterschieden sich die Inkubationszeiten auf Eis und der Hitzeschock. Die Parameter der Transformation mit Plasmiden ≤ 5 Kb betrugen 30 min Vorinkubation auf Eis, 1,5 min Hitzeschock (42°C) und 5 min Abkühlen auf Eis. Bei der Transformation mit größeren Plasmide wurden die Zellen für 60 min auf Eis und anschließend 2,5 min bei 42°C inkubiert sowie 10 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 600 µL glukosehaltigen Medium wurden die Zellen bei 37°C im Brutroller regeneriert (2.9). Typischerweise wurden 100 µL mehrerer Verdünnungen auf selektivem Nährboden ausplattiert und ÜN bebrühtet [140].

2.23.5 Elektro-Transformation von *E. coli* DH10b

Genbanken wurden in *E. coli* DH10b über Elektroporation erstellt. Dazu wurden elektrokompetente Zellen (*ElectroMAX DH10B Cells*, Invitrogen AG) auf Eis aufgetaut, à 25 µL aliquotiert, mit 1 µL Ligationsansatz (ca. 20 ng Plasmid) vermischt und luftblasenfrei in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (*myBudget* 1 mm Küvette, Bio-Budget Technologies GmbH) überführt. Nach Elektroporation bei 20 kV/cm und 5,9 msec (*MicroPulser* Elektroporator) erfolgte unmittelbar die Zugabe von 1 mL SOC-Medium (2.9.1). Die Suspension wurde in ein steriles Reagenzglas überführt, unter Schütteln bei 37°C inkubiert (2.9.1, 2.9.2) und anschließend auf selektivem Nährboden ausplattiert und ÜN bebrütet [140].

2.23.6 Transformation von *B. subtilis* über natürliche Kompetenz

Unter Nährstoff-Limitierung entwickeln etwa 5-10% der Zellen einer *B. subtilis* Population eine natürliche Kompetenz, welche die Aufnahme von Fremd-DNA und Rekombination ermöglicht [173-176]. Die natürliche Kompetenz wurde im Labor mit Paris-Medium (PM) induziert, wobei die Kultivierung der Zellen in ‚Schikanen-Kolben' unter Schütteln bei 37°C erfolgte [177, 178]. 5 mL PM wurden mit einer Einzelkolonie eines frischen *B. subtilis* Ausstrichs inokuliert und für 16 h angezogen. 10 mL PM wurden mit 200 µL der Übernachtkultur versetzt und bis zum Erreichen einer OD_{600} = 1 bei 120 rpm inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden à 500 µL in Reagenzgläser überführt und mit 1 µg Plasmid-DNA für 3-4 h im Brutroller bebrütet. 200 µL und 300 µL der Zellsuspension wurden auf selektivem Nährboden ausplattiert und für 16-48 h bei 37°C kultiviert.

Paris-Medium: 60 mM K_2HPO_4*, 40mM KH_2PO_4*, 3 mM Natriumcitrat*, 20 mM Kaliumglutamat*, 3 mM $MgSO_4$*, 1% (w/v) Glukose*, 0,1% (w/v) Casamino Acids[#], 20 mg/L Tryptophan[#], 2,2 mg/L Ammoniumeisen(III)-citrat[#]. Alle Komponenten des PMs wurden separat als Stammlösungen angesetzt und sterilisiert (*: 121°C, 20 min, 2 bar; [#]: Filtration (Poren-Ø: 0,22 µm)). Das PM wurde immer frisch angesetzt.

2.23.7 Elektro-Transformation von *P. putida*

P. putida KT2440 oder KT2440T7 wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen auf EM1-Agar fraktioniert ausgestrichen. Die Kultivierung von Flüssigkulturen erfolgte bei 30°C in Kolben mit Schikanen bei 120 rpm. 10 mL EM1-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *P. putida* inokuliert und 8 h bebrütet. 100 mL EM-Medium mit 0,5% (w/v) Glukose wurde mit der ÜT auf eine OD_{600} = 0,01 eingestellt und 16 h kultiviert. Die Präparation der kompetenten Zellen erfolgte unmittelbar vor der Elektroporation, wobei das Protokoll je nach Anzahl an Transformationen variierte. Kompetente Zellen im großen Maßstab wurden aus 100 mL Übernachtkultur präpariert. Je 20 mL Übernachtkultur wurden in ein 50 mL *Falcon tubes* überführt und für 10 min auf Eis gekühlt. Das Volumen wurde mit sterilem Milli-Q Wasser auf 50 mL aufgefüllt und die Zellen durch Zentrifugation (4°C, 1.750 *x g*, 10 min) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 Vol., 0,5 Vol. und 0,2 Vol. Saccharose-Lösung (RT) gewaschen und vereinigt. Die OD_{600} wurde gemessen und nach der Zentrifugation (s.o.) eine Zellkonzentration von $1{,}75 \times 10^{10}$ Zellen/mL eingestellt. Das Resuspensions-Volumen errechnete sich aus folgender Formel:

$$V_{res}\,[\mathrm{mL}] = OD_{600}\ \text{gesamt} \times \frac{10^8\ \text{Zellen} \times OD_{600}^{-1}}{1{,}75 \times 10^{10}\ \text{Zellen} \times \mathrm{mL}^{-1}}$$

‚V_{res}' ist das Resuspensions-Volumen in mL,
‚OD_{600} gesamt' ist die berechnete OD_{600} der Zellsuspenion (50 mL),
‚10^8 Zellen *x* OD_{600}^{-1}' ist ein Faktor zur Umrechnung der OD_{600} auf eine Zellzahl (3.1.1.6, Abb. 13) und
‚$1{,}75 \times 10^{10}$ Zellen *x* mL^{-1}' ist die einzustellende Zellkonzentration.

Kompetente Zellen für eine geringe Anzahl an Transformationen (≤ 6) wurden in Eppis präpariert [179], wobei ein Aliquot aus Zellen von je 6 mL Übernachtkultur bestand. 130 µL kompetente Zellen wurden mit 20-30 ng Plasmid-DNA oder 1-5 µL Ligationsansatz vermischt und luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette (*myBudget* 2 mm Küvette, Bio-Budget Technologies GmbH) überführt. Nach Elektroporation bei 12,5 kV/cm und 5,9 msec (*MicroPulser* Elektroporator) erfolgte unmittelbar die Zugabe

von 1 mL EM1-Medium. Die Suspension wurde in ein steriles Reagenzglas überführt, unter Schütteln bei 30°C inkubiert und anschließend auf selektivem Nährboden ausplattiert und ÜN bebrütet (2.9).

Saccharose-Lösung: 300 mM Saccharose in Milli-Q Wasser

2.24 Protein Expression und Probenaufarbeitung

2.24.1 Expression

E. coli BL21 (DE3) und *P. putida* KT2440T7 wurden jedes Mal neu mit Plasmid-DNA transformiert (2.23.4, 2.23.7), auf selektiven EM1-Agarplatten vereinzelt und direkt zur Expression verwendet. *B. subtilis* TEB1030 wurde einmalig transformiert und selektiert (2.23.6). Anschließend wurde die Amylase-Aktivität auf Stärkeplatten (2.12.1) analysiert sowie die Integration der Reportergene ins Chromosom Amylase-negativer Klone über PCR kontrolliert (2.18.2). Korrekte Klone wurden kryokonserviert (2.9). Für Expressionsanalysen wurden diese an zwei aufeinanderfolgenden Tagen fraktioniert ausgestrichen und dann verwendet.
Eine 10 mL Vorkultur wurde in selektivem EM-Medium in einem 100 mL Erlenmeyer-kolben mit vier Schikanen bei 30°C unter Schütteln angezogen. Am Folgetag wurde eine 200 mL Hauptkultur (EM-Medium) mit einer OD_{600} = 0,1 in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen inokuliert und bis zu einer OD_{600} = 1 ± 0,05 OD_{600} bei 30°C unter Schütteln angezogen. 25 mL Kultur wurden entnommen und auf Eis gelagert (0 h). Anschließend wurde die Kultur mit 100 µM IPTG bzw. 1% (w/v) Xylose induziert und unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Nach exakt 4 h und 20 h wurden Proben genommen und sofort auf Eis gelagert.

2.24.2 Aufarbeitung des Kulturüberstandes

10 mL Expressionskultur wurden in ein *Falcon tube* überführt und 15 min bei 2.790 *x g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (Poren-Ø: 0,22 µm) und entweder direkt in einem Aktivitätstest (2.25) eingesetzt oder die Proteine wurden über eine TCA-Fällung konzentriert (2.24.3) und über SDS-PAGE (2.26) analysiert.

2.24.3 TCA-Fällung der Proteine des Kulturüberstands

Der sterilfiltrierte Überstand (2.24.2) von 2 OD_{600} wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 0,1 Vol. NaDOC-Lösung versetzt. Die Probe wurde intensiv gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 Vol. TCA-Lösung, intensivem Mischen und einer 10 min Inkubation auf Eis, wurde die Probe 30 min bei 16.060 *x g* (4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 300 µL 80% (v/v) Aceton gewaschen und 15 min bei bei 16.060 *x g* (4°C) zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet an der Luft getrocknet, in 10 µL reduzierendem Probenpuffer aufgenommen (2.26), 10 min bei 100°C gekocht, kurz anzentrifugiert und intensiv gemischt [180]. Ggf. wurde der pH-Wert der Probe, sichtbar durch einen Farbumschlag von Bromphenolblau von blau nach gelb, durch Zugabe von 0,5 µL 1 M NaOH korrigiert.

TCA-Lösung: 70% (w/v) TCA

NaDOC-Lösung: 1% (w/v) NaDOC

2.24.4 Aufarbeitung des Zellpellets für SDS-PAGE Analysen

2 OD_{600} der Expressionskultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 16.060 *x g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 160 µL 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. 40 µl reduzierender Probenpuffer (2.26) wurde zugesetzt. Die Probe wurde 10 min bei 100°C gekocht, kurz anzentrifugiert und intensiv gemischt. Typischerweise wurden 10 µL, also 0,1 OD_{600}, über SDS-PAGE analysiert.

2.24.5 Zellaufschluss

Die Zellen aus 4 OD_{600} Expressionskultur wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 16.060 *x g* pelletiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 400 µL 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch eine Ultraschall-behandlung (Bandelin-Sonopuls HD 2070, 35% Power, Cycle 50%) für zweimal 1 min auf Eis.

2.24.6 Löslichkeits-Test

Nach Zellaufschluss über Ultraschall (2.24.5) wurden 150 µL Suspension für 3 min bei 16.060 *x g* zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und in ein steriles Reaktions-gefäß überführt (lösliche Fraktion). Das Pellet wurde in 150 µL 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert (unlösliche Fraktion). Beide Fraktionen wurden mit 30 µL reduzierendem Probenpuffer (2.26) versetzt, 10 min bei 100°C gekocht, kurz anzentrifugiert und intensiv gemischt. Typischerweise wurden 12 µL, also 0,1 OD_{600}, über SDS-PAGE analysiert.

2.25 Aktivitätstests

2.25.1 GFP-Fluoreszenz Messung

Die Zellen aus 0,5 OD_{600} Expressionskultur wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 16.060 *x g* pelletiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 mL 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. 500 µL Suspension wurden in eine Quarzküvette überführt und mittels *Luminescence Spektralphotometer LS50B* bei 475 nm angeregt und die Emission über einen Wellenlängenbereich von 495 nm - 600 nm alle 0,5 nm gemessen.

2.25.2 Nachweis lipolytischer Enzymaktivität

In eine Mikrotiterplatte wurden 80 µL 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 20 µL Probe (Überstand (2.24.2) oder Zellaufschluss (2.24.5)) vorgelegt und anschließend 100 µL frisch angesetzte Substratlösung zugegeben. Die Reaktionskinetik wurde über 15 min alle 15 sec bei 30°C und einer Wellenlänge von 410 nm im Photometer bestimmt, wobei die Umsetzung von farblosen *para*-Nitophenylbutyrat zu gelben *para*-Nitrophenolat und Buttersäure gemessen wurde [181]. Alle Proben wurden in einer Dreifachbestimmung gemessen.

Substratpuffer: pH 8,3, 100 mM Tris-HCl, 200 mM Triton X 100, 20 mM $CaCl_2$

Substratlösung: 10,8 mL Substratpuffer, 1,2 mL Isopropanol, 3,4 µL pNPB

2.26 SDS-PAGE

Proteinproben wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem elektrophoretische aufgetrennt [182]. Durch eine Komplexbildung der Proteine mit negativ geladenem SDS wurde die Eigenladung der Proteine überdeckt und eine Auftrennung nach Molekülgröße aufgrund ähnlicher Masse/Ladungsverhältnisses erreicht. Die Proteine wurden in einem Sammelgel für 15 min bei 100 V fokussiert und anschließend in einem Trenngel für 90 min bei 120 V separiert. Die Gele wurden ÜN unter Schütteln in einer Colloidal Coomassie Färbelösung [183-185] inkubiert, in VE-Wasser gewaschen und eingescannt. Die Proteingröße wurde über einen Protein-Molekulargewicht Standard (Marker) abgeschätzt.

Probenpuffer:	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 350 mM DTT, 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Sammelgel:	5% (v/v); 0,83 mL Acrylamid, 1,3 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 2,8 mL VE-Wasser, 50 µL 10% (w/v) SDS, 50 µL 10% (w/v) APS, 10 µL TEMED
Trenngel:	15% (v/v); 5 mL Acrylamid, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 2,4 mL VE-Wasser, 100 µL 10% (w/v) SDS, 100 µL 10% (w/v) APS, 10 µL TEMED
Marker:	6 µL *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas GmbH) Bandengröße in kDa: 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 170
SDS-PAGE Puffer:	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Färbelösung:	10% (w/v) Ammoniumsulfat, 0,12% (w/v) Coomassie, 10% (v/v) Phosphorsäure, 20% (v/v) MeOH

2.27 Western Blot

Die durch eine SDS-PAGE (2.26) aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen [186, 187], die zuvor 2 min im MeOH und mindestens 5 min in VE-Wasser inkubiert wurde. Der Transfer erfolgte in Dunn-Carbonat Puffer für 15 min bei 150 mA und für weitere 30 min bei 300 mA. Anschließend wurden freie Proteinbindestellen auf der Membran mit *skim milk* blockiert (1 h unter Schütteln bei RT oder ÜN bei 4°C). Nach einstündiger Inkubation mit einem Primärantikörper und dreimal 10 min Waschen mit TBST-Puffer wurde die Membran mit dem Zweitantikörper für 1 h unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde abermals dreimal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Überschichtung der Membran mit je 0,5 mL *ECL Detektions Reagenzien 1* und *2* nach Herstellerangaben in Kombination mit dem *Imaging System Stella 3200* und *AIDA Software*.

PVDF-Membran:	Roti-PVDF (Carl Roth GmbH)
Dunn-Carbonat Puffer:	10 mM $NaHCO_3$, 3 mM Na_2CO_3, 20% (v/v) MeOH
Blockierungslösung:	TBST-Puffer, 3% (w/v) *skim milk*
TBS-Puffer:	25 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 3 mM KCl
TBST-Puffer:	TBS-Puffer, 0,2% (v/v) Tween 20

Primärantikörper:	Living Colors Full-Length A.v. Polyclonal Antibody, Rabbit Anti *Aequorea victoria* green fluorescent protein (BD Biosciences Clontech), 1:10.000 in Blockierungslösung
Zweitantikörper:	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad Laboratories GmbH), 1:5.000 in Blockierungslösung

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Konstruktion von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas* sp. Shuttle-Vektoren

Vektoren sind ‚Vehikel', auch *carrier* genannt, um Fremd-DNA in eine Zelle einzubringen und stabil zu halten, wobei Plasmide [128, 188], Cosmide [8, 134], Fosmide [189] oder BACs [189-191] verwendet werden können. Plasmide sind laut Definition ‚extra-chromosomale DNA-Moleküle, die autonom replizieren und dabei ihre Replikation kontrollieren' [192-194]. Sie kommen in Organismen der drei Domänen *Archaea*, *Bacteria* und *Eukarya* vor. Prokaryotische Plasmide sind normalerweise zirkulär, zwischen einigen wenigen bis mehreren hundert Kilobasen groß und kodieren für den Wirt i.d.R. nicht essenzielle aber nützliche Funktionen, wie Virulenzfaktoren, Resistenzen oder Gene des Sekundärmetabolismus [193-196]. Jedes Plasmid besteht aus mindestens einer Region, die Gene oder *loci*, für die Replikation an sich aber auch für deren Kontrolle, kodiert [197]. Diese essenzielle Region besteht typischerweise aus einem Replikationsursprung (*origin of replication*), der charakteristisch für jedes Replikon ist. Zusätzlich kodieren viele Plasmide für mindestens ein Replikationsprotein, das an der Initiation der Plasmidreplikation beteiligt ist, sowie Gene, die die Replikation kontrollieren [197, 198]. Dennoch ist die Plasmidreplikation oft von vielen wirtskodierten Proteinen abhängig, wie beispielsweise DnaA (Replikations-Initiations-Faktor), DnaB (Helikase) und dessen Regulator DnaC, DnaG (Primase), DNA Polymerasen, Gyrase, RNaseH etc. [196, 199, 200]. Viele Plasmide können daher nur in einem oder in nah verwandten Organismen replizieren [198, 201]. Es gibt allerdings auch Plasmide mit einem breiten Wirtsspektrum [201-203], die nicht nur in verwandten bakteriellen Spezies sondern sogar in verschiedenen bakteriellen Gattungen, Familien oder Klassen replizieren können [204-206]. Diese Plasmide kodieren typischerweise mehrere Replikationsproteine mit Helikase-, Primase- oder Replikations-Inititations-Aktivität [196, 200, 207-209]. Plasmide, die in verschiedenen bakteriellen Abteilungen oder auch in Pro- und Eukaryoten existieren können, werden Shuttle-Vektoren bzw. binäre Vektoren genannt und vereinen mehrere Replikationsursprünge [206, 210-212].

Rekombinante DNA-Moleküle werden durch die Insertion von Fremd-DNA in einen Vektor erzeugt, wobei die Vermehrung meist in einem gut handhabbaren Organismus,

i.d.R. *E. coli*, stattfindet. Anschließend wird der Vektor in den eigentlichen Zielorganismus übertragen [66, 112, 124].

Es ist noch kein Shuttle-Vektor publiziert, der gleichzeitig in den Wirten *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas* Spezies verwendet werden kann. Im nachfolgenden Abschnitt wird die Konstruktion von einer ganzen Reihe solcher Shuttle-Vektoren dokumentiert (siehe dazu auch die Referenzen 213 und 214). Gemäß ihrem Wirtsspektrum erhielten sie den Namen pEBP, wobei ‚p' für Plasmid, ‚E' für *E. coli,* ‚B' für *B. subtilis* und ‚P' für *Pseudomonas* Spezies steht. Neben Resistenzgenen zur Selektion und Replikationsursprüngen für die Vermehrung in verschiedenen Wirten sollen die Vektoren eine *multiple cloning site* (MCS) zur Insertion von Fremd-DNA besitzen. *Upstream* der MCS sollen starke Promotoren lokalisiert sein, um gezielt Genexpression zu induzieren, wobei ein *downstream* gelegenes Gen einer Fluoreszenz-optimierten Variante von GFP (*gfpmut3*) [215, 216] als Transkriptionsreporter fungiert. Die Vermehrung von größeren Plasmiden (35-52 Kb) wird in *E. coli* durch eine *cos* Region erleichtert, welche eine effiziente *in vitro* Verpackung von rekombinanten DNA Molekülen in Phagenpartikel, sowie den Transfer in die Zellen durch Transduktion erlaubt [6, 8, 217]. Die Shuttle-Vektoren sollen zwei Anwendungen ermöglichen. (*i*) Sie sollen als Expressionsplasmide einsetzbar sein, indem Fremd-DNA gerichtet inseriert und in verschiedenen Wirten über induzierbare Promotor exprimiert wird. (*ii*) Weiterhin soll es möglich werden, Banken aus genomischer oder metagenomische DNA mit variabler Insert-Größe zu erzeugen und diese funktionsbasiert in den verschiedenen Wirten zu durchmustern. Funktionsbasierte Analyseverfahren hängen neben einem leistungsfähigen Nachweis-Assay zwangsläufig von der Aktivität des Genprodukts ab. Die Verwendung verschiedener ‚Screening-Wirte' erweitert das Expressionspotential, wodurch eine größere Anzahl und Vielfalt an bioaktiven Molekülen identifiziert werden kann [110, 118, 124, 218].

3.1.1 Konstruktion von Shuttle-Vektoren der pEBP10er-Serie

Im folgenden Abschnitt wird die Konstruktion von Shuttle-Vektoren beschrieben. Der erste Shuttle-Vektor, der Regionen zur Replikation in den drei Wirten *E. coli, B. subtilis* und *Pseudomonas putida* vereinigt, ist pEBP10. Dieser Shuttle-Vektor repliziert in *E. coli* sowie in *P. putida* episomal (Replikationsursprünge: ColE1 und minR') und in *B. subtilis* integriert er ins Chromosom. Auf der Basis von pEBP10 wurden verschiedene Derivate erzeugt, die zusammen die pEBP10er-Serie bilden.

3.1.1.1 Ursprungsplasmid pWE21

Ausgangspunkt für die Konstruktion des Vektors pEBP10 war pWE21 (Abb. 4), ein *E. coli - B. subtilis* Shuttle-Vektor [Henning, H. 2006, nicht publiziert]. pWE21 (9.488 Bp) basiert auf dem Cosmid pWE15 (Amp^R, ColE1, *cos*, P_{T7}), kodiert aber zusätzlich ein Chloramphenicol- [219] und ein Spectinomycin-Resistenzgen [220], *gfpmut3* [215, 216], homologe Sequenzen zur Integration in das nicht essenzielle α-Amylasegen (GenBank: V00101.1) von *B. subtilis* sowie einen mit Xylose-induzierbaren Promotor [221, 222].

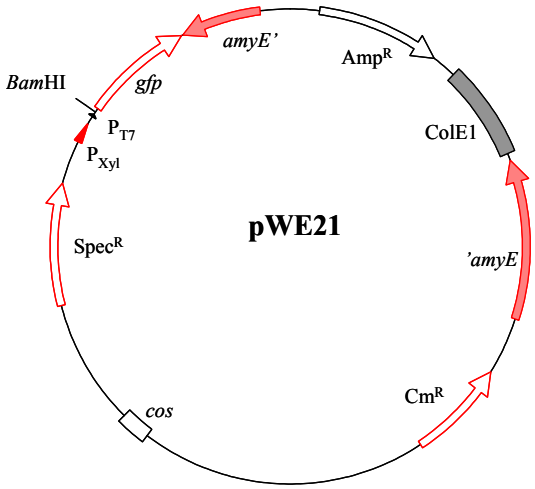


Abb. 4 Schematische Darstellung von pWE21. Genetische Elemente des Ursprungsvektors pWE15 sind in ‚schwarz' und ‚neu eingefügte' Elemente in ‚rot' gekennzeichnet. Amp^R: Ampicillin-Resistenzgen. *amyE'* und *'amyE*: 5'- und 3'-Region des α-Amylasegens von *B. subtilis*. Cm^R: Chloramphenicol-Resistenzgen. ColE1: *colicinogenic factor* E_1 Replikationsursprung. *cos*: *cohesive end site*. *gfp*: Gen des grün-fluoreszierenden Proteins (*gfpmut3*). P_{T7}: T7 RNA Polymerase-induzierbarer Promotor. P_{Xyl}: Xylose-induzierbarer Promotor. $Spec^R$: Spectinomycin-Resistenzgen.

Während pWE21 in *E. coli* als episomaler Vektor im Cytoplasma vorliegt, integriert er über homologe Rekombination in das *Bacillus subtilis* Chromosom. Die Integration von Fremd-DNA in das Gen der α-Amylase (*amyE*) ist etabliert [16, 223-225] und insbesondere für die Plasmid-Stabilität großer Vektoren von Vorteil [226-228], da in *B. subtilis* häufig sowohl strukturelle als auch segregative Plasmid-Instabilität auftritt [20, 223, 229-231].

3.1.1.2 Klonierung von pEBP10

Die Modifizierung von pWE21 erfolgte durch die Insertion oder den Austausch von Sequenzen über mehrere Zwischenkonstrukte (Abb. 5). Dazu wurde die Zielsequenz über PCR (2.18.1) amplifiziert, im Plasmid pUC18 vervielfältigt (2.20.2) und nach der Überprüfung durch Sequenzierung (2.21) in den Zielvektor inseriert bzw. gegen eine bestehende Sequenz ausgetauscht (2.20.3).

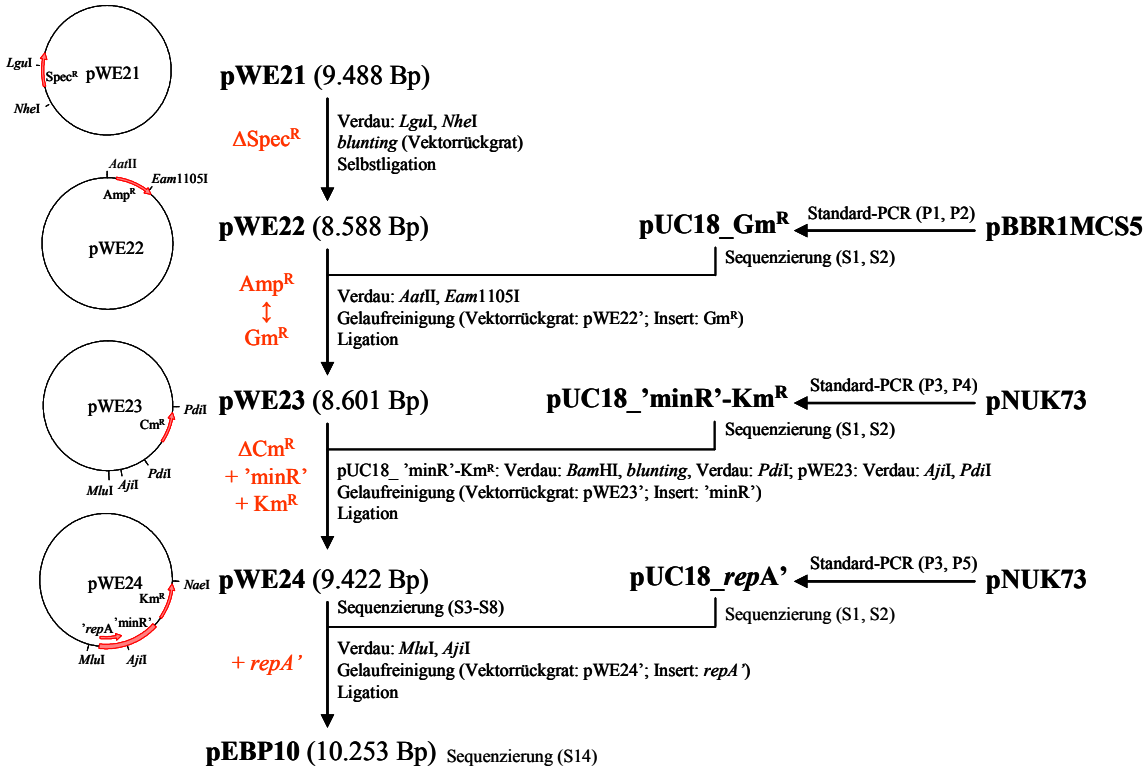


Abb. 5 Schematische Darstellung der Klonierung von pEBP10 auf Basis von pWE21. Detaillierte Information zu den angewendeten Methoden und den verwendeten Restriktionsenzymen sind im Abschnitt Materialien und Methoden zu finden. In ‚roter Schrift' sind die Veränderungen im Genotyp gekennzeichnet. Δ: Deletion. ↕: Austausch. +: Insertion. ': verkürzte Sequenz. Amp^R: Ampicillin-Resistenzgen. Cm^R: Chloramphenicol-Resistenzgen. Km^R: Kanamycin-Resistenzgen. minR': verkürzte minimale Region. P: PCR Primer. *repA*: Gen des Replikationsproteins. S: Sequenzierprimer. $Spec^R$: Spectinomycin-Resistenzgen.

Zuerst wurde das Spectinomycin-Resistenzgen aus pWE21 deletiert, wodurch pWE22 entstand. Anschließend wurde die Ampicillin-Resistenz gegen eine Gentamycin-Resistenz ausgetauscht (pWE23). Eine DNA-Sequenz, genannt ‚verkürzte minimale Region' (minR'), welche die Plasmidreplikation in Pseudomonaden durch einen Replikationsursprung und ein Replikationsprotein (*repA* Gen) vermittelt, sowie ein Kanamycin-Resistenzgen wurden über PCR mit den Primern P3 und P4 aus pNUK73 amplifiziert. Die Kontrolle des Amplifikats über AGE zeigte ein kleineres PCR-Produkt ('minR'-Km^R) als erwartet. Es wurde dennoch in pUC18 kloniert. Bei den Restriktionsanalysen der isolierten Vektoren (pUC18_'minR'-Km^R) weißer *E. coli* DH5α Klone fand keine Hydrolyse mit dem Enzym *Mlu*I statt. Dies war ein weiterer Hinweis auf einen Fehler bei der PCR, da die *Mlu*I-Schnittstelle über den Primer P3 hätte eingeführt werden müssen. Die Sequenzierung bestätigte, dass die 5'-Region der ‚verkürzten minimalen Region' (minR') nicht korrekt amplifiziert worden war. Das PCR-Produkt war um knapp 1,1 Kb verkürzt. Theoretisch war nicht zu erklären, wieso Primer P3 nicht korrekt gebunden hatte. Deshalb wurde erst 'minR'-Km^R mit dem Vektorrückgrat von pWE23 ligiert (pWE24) und anschließend die

5'-Region des Replikationsproteins (*repA*') nachträglich in pWE24 eingefügt, wodurch minR' wieder vollständig hergestellt wurde und pEBP10 (Abb. 6) entstand.

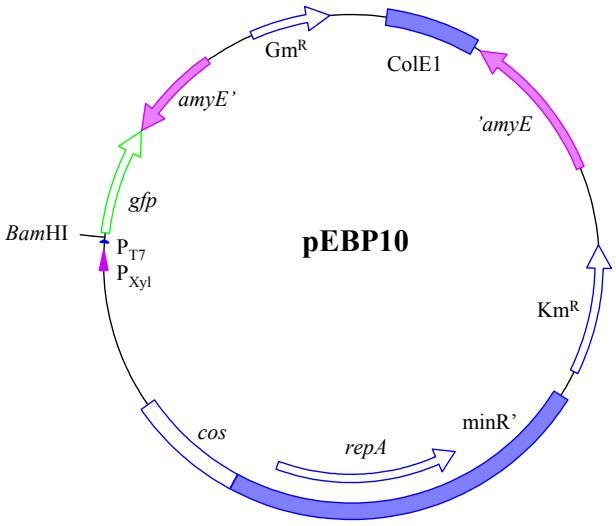


Abb. 6 Schematische Darstellung von pEBP10. Genetische Elemente für *B. subtilis* sind in ‚lila' und Elemente für *E. coli* und Pseudomonaden in ‚blau' gekennzeichnet. *amyE*' und '*amyE*: 5'- und 3'-Region des α-Amylasegens von *B. subtilis*. ColE1: *colicinogenic factor* E_1 Replikationsursprung. *cos*: *cohesive end site*. *gfp*: Gen des grün-fluoreszierenden Proteins (*gfpmut3*). Gm^R: Gentamycin-Resistenzgen. Km^R: Kanamycin-Resistenzgen. minR': ‚verkürzte minimale Region' mit Replikationsprotein (*repA* Gen). P_{T7}: T7 RNA Polymerase-induzierbarer Promotor. P_{Xyl}: Xylose-induzierbarer Promotor.

pEBP10 (10.253 Bp) ist der erste Shuttle-Vektor, der Regionen zur Replikation in den drei Wirten *E. coli*, *B. subtilis* und *Pseudomonas* Spezies vereint.

3.1.1.3 Analyse und Annotation der ‚verkürzten minimalen Region' minR'

Bei der Sequenzierung vom Zwischenkonstrukt pWE24 (Sequenzierprimer 3-8) fiel auf, dass die Sequenz von minR' im Bereich des Replikationsproteins (*repA* Gen) gegenüber der Referenzsequenz von pNUK73 (GenBank: AB084167) eine Insertion von acht Basenpaaren enthielt. Die Sequenzierung wurde mehrmals wiederholt, wobei sich jedes Mal die Insertion bestätigte. Eine Insertion von acht Basen in einem Gen führt zu einem *frameshift* bei der Translation und damit unmittelbar zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins. Die Insertion in der ‚verkürzten minimalen Region' müsste somit massive Auswirkungen haben. Da unklar war, ob die Insertion durch eine fehlerhafte PCR bei der Amplifikation entstanden war, oder schon im Ursprungsvektor pNUK73 existierte, wurde auch pNUK73 (S5, S6, S9-S13) sequenziert. Bei den Sequenzierungen bestätigte sich die Insertion in der Sequenz zwischen Base 378 und 379 (Abb. 7). Das Plasmid ist demnach 5.136 Bp und nicht 5.128 Bp groß.

Abb. 7 Schematische Darstellung von pNUK73. Schematische Darstellung von pNUK73 sowie der Sequenz der Insertion von acht Basen im *orf* (5'-Region) des Replikationsproteins (*repA* Gen). Bei der Insertionssequenz (‚rot' gekennzeichnet) handelt es sich um eine Duplikation der vorigen acht Basenpaare, gekennzeichnet durch die unterstrichene Linie. ColE1: *colicinogenic factor* E_1 Replikationsursprung. minR': ‚verkürzte minimale Region'.

Bei der Insertion von acht Basenpaaren handelt es sich um einen *short tandem repeat*. Eine Insertion von acht Nukleotiden in einem *orf* bewirkt einen *frameshift* bei der Translation, wodurch RepA betroffen sein sollte.

Da der Datenbankeintrag von pNUK73 (GenBank: AB084167) aus dem Jahr 2002 stammte, könnte bei der damaligen Sequenzierung die Duplikation nicht erkannt worden sein. Die Insertion könnte aber auch bei der Vektorkonstruktion entstanden sein und nur im Falle von pNUK73, nicht aber bei dem parentalen, kryptischen Plasmid pNI10 existieren. Würde die publizierte Sequenz von pNUK73 auf der Sequenzierung von pNI10 basieren, wäre die Insertion bei pNUK73 nicht aufgefallen. Da pNI10 zur Überprüfung der Sequenz nicht zur Verfügung stand, wurde stattdessen das Plasmid pNI105 [130, 131] sequenziert (Sequenzierprimer S10). Dieses basiert genau wie pNUK73 auf dem parentalen Plasmid pNI10. Bei pNI105 und daher wahrscheinlich auch bei pNI10 ist die Insertion der acht Basen im *orf* (5'-Region) des Replikationsproteins nicht vorhanden.

Da der Shuttle-Vektor pEBP10 auf pWE24 basiert, besitzt auch dieser die Insertion. Dennoch war es möglich, *P. putida* KT2440 mit pEBP10 zu transformieren. pEBP10 muss daher für ein funktionales Replikationsprotein kodieren. Drei Möglichkeiten zur Erklärung sind denkbar. (*i*) Das annotierte Gen kodiert für kein Replikationsprotein und dieses wird durch einen anderen *orf* innerhalb von minR' kodiert. (*ii*) Die Translation des Replikationsproteins startet am annotierten Translationsstart und ein funktionales Replikationsprotein mit einer veränderten Aminosäuresequenz entsteht. (*iii*) Das Replikationsprotein hat einen anderen Translationsstart als den annotierten und die

Translation führt entweder zu einem Protein mit einer ähnlichen AS-Sequenz oder zu einem komplett anderen aber funktionalen Protein.

P. putida KT2440 konnte mit pEBP10, nicht aber mit pWE24, transformiert werden. Ein Hauptunterschied zwischen beiden Vektoren ist die Deletion einer 1,1 Kb großen Region im 5'-terminalen Bereich der ‚verkürzten minimalen Region', welche demnach für die Replikation von entscheidender Bedeutung ist. Höchstwahrscheinlich kodiert das annotierte Gen für das Replikationsprotein und kein anderer *orf* innerhalb von minR'. Die Funktionalität von pEBP10 in *P. putida* KT2440 ist daher nicht durch Möglichkeit (*i*) (s.o.) erklärbar.

Sowohl pNI105 als auch pNUK73 replizieren in *Pseudomonas* Spezies und beide Plasmide müssen daher für funktionale Replikationsproteine kodieren. Läge in beiden Plasmiden der Translationsstart wie annotiert bei Nukleotid 320 (Möglichkeit (*ii*)), hätte bei pNUK73 die Insertion der acht Basenpaare im *orf* von *repA* und der *frameshift* bei der Tanslation keinen Einfluss auf die Funktionalität. Dies wurde auf Basis der publizierten Sequenz und der durch Sequenzierung korrigierten Sequenz von pNUK73 *in silico* analysiert. Nimmt man für die publizierte Sequenz von pNUK73 für RepA den annotierten Translationsstart bei Nukleotid 320 an, entsteht ein Replikationsprotein von 471 AS, nachfolgend $RepA_{320}$ genannt. Nach der Insertion der acht Basenpaare zwischen Basenpaar 378 und 379 von pNUK73 würde ein Protein mit nur 99 AS entstehen, läge der Translationsstart weiterhin bei Nukleotid 320. Es ist fraglich, ob dieses stark verkürzte Protein noch Funktionalität besitzt.

Am wahrscheinlichsten ist es daher, dass die Translation von RepA einen anderen Startpunkt hat (Möglichkeit (*iii*)). Läge der Translationsstart nämlich für die korrigierte Sequenz bei Nukleotid 346, entstünde ein Protein von 465 AS, nachfolgend $RepA_{346}$ genannt. $RepA_{320}$ (publizierte Sequenz und Annotation, 471 AS) bzw. $RepA_{346}$ (korrigierte Sequenz und Annotation, 465 AS) sind über nahezu die gesamte Sequenz identisch (Abb. 8) und variieren nur N-terminal um wenige Aminosäuren: Der N-Terminus (AS 1-17) von $RepA_{320}$ besteht aus den Aminosäuren VKAPDSKSKTAGRGADS und der N-Terminus (AS 1-11) von $RepA_{346}$ aus den Aminosäuren NRWSGRRLGKY.

```
RepA320   18 GSTRNLLPPQDLRAKLQANRAERYDLLASARALFLHEGKREGLLHPQDWHRTAKCKWTPV 77
RepA346   12 GSTRNLLPPQDLRAKLQANRAERYDLLASARALFLHEGKREGLLHPQDWHRTAKCKWTPV 71

RepA320   78 AGMVGVHASREHGSAFYSGVMNCGSVWACPVCAAKVQERRREEVAKAVTWADAQGLQAAM 137
RepA346   72 AGMVGVHASREHGSAFYSGVMNCGSVWACPVCAAKVQERRREEVAKAVTWADAQGLQAAM 131

RepA320  138 VTLTFPHYAWQQLAVLLEQQKTALKYLREGSPWTRFKKATGYQGLIRSLELTHGQNGWHP 197
RepA346  132 VTLTFPHYAWQQLAVLLEQQKTALKYLREGSPWTRFKKATGYQGLIRSLELTHGQNGWHP 191

RepA320  198 HTHELWFVDAGTDADTMKKTVLERWKTSCARAGLLDLDNADQVAAFEAHAIDVKGWCTAS 257
RepA346  192 HTHELWFVDAGTDADTMKKTVLERWKTSCARAGLLDLDNADQVAAFEAHAIDVKGWCTAS 251

RepA320  258 DYLAKQDDSRHWGVDAEIAKASTKAGRAKGKHPFALLTLFQDGDRKAGHRFLDYAAAMKG 317
RepA346  252 DYLAKQDDSRHWGVDAEIAKASTKAGRAKGKHPFALLTLFQDGDRKAGHRFLDYAAAMKG 311

RepA320  318 KRQLSWSAGLKAKVGVIEQSDEEVAEEQRDDADLLGHLEIEQWKLIRQAGLRAKVLDLAE 377
RepA346  312 KRQLFWSAGLKAKVGVIEQSDEEVAEEQRDDADLLGHLEIEQWKLIRQAGLRAKVLDLAE 371

RepA320  378 SNGGWVAIQHLLRGLLNGGLSMTHSNQDLTPEDEGLPIFVSDEQEALPLPGFVTRETHRS 437
RepA346  372 SNGGWVAIQHLLRGLLNGGLSMTHSNQDLTPEDEGLPIFVSDEQEALPLPGFVTRETHRS 431

RepA320  438 SKAVIRQKIATAMTEDRSGNDPAIQGKRSSNAES 471
RepA346  432 SKAVIRQKIATAMTEDRSGNDPAIQGKRSSNAES 465
```

Abb. 8 Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Replikationsproteine $RepA_{320}$ und $RepA_{346}$. Die AS-Sequenz der beiden Replikationsproteine wurden über BLAST miteinander verglichen. In ‚roter Schrift' ist eine Veränderung der Sequenz gekennzeichnet. $RepA_{320}$: hypothetisches Replikationsprotein mit annotierten Translationsstart bei Base 320 von pNUK73 (GenBank: AB084167). $RepA_{346}$: Replikationsprotein mit Translationsstart bei Base 346 von pNUK73 mit veränderter Nukleotidsequenz.

Die Sequenz von pNI105 war von dieser Veränderung nicht betroffen. Weder die Sequenz noch die Annotation musste verändert werden. Dadurch ergaben sich für pNI105 und pNUK73 unterschiedliche Replikationsproteine, die allerdings über 96% identisch waren und nur N-terminal variierten.

Die Translation von RepA startet mit größter Wahrscheinlichkeit in pNUK73 bei Nukleotid 346 und nicht bei Nukleotid 320. Dadurch ergeben sich für pNI105 bzw. pNI10 und pNUK73 unterschiedliche Replikationsproteine.

3.1.1.4 Klonierung von pEBP12

Die einzige singuläre Restriktionsschnittstelle zwischen den Promotoren (P_{Xyl} und P_{T7}) und dem Reporter *gfpmut3* von pEBP10 war eine *Bam*HI Schnittstelle. Eine MCS mit einer zentralen *Bam*HI Schnittstelle wäre sinnvoller, denn eine einzige singuläre Restriktionsschnittstelle kann aus vielen Gründen nachteilig sein. Sollen heterologe Gene in pEBP10 eingefügt und in den drei Wirten exprimiert werden, müssen die Gene in korrekter Orientierung zu den Promotoren des Vektors ausgerichtet sein. Durch die singuläre *Bam*HI Schnittstelle verläuft die Insertion von Fremd-DNA ungerichtet. Theoretisch tragen 50% der rekombinanten Plasmide der Klone ein Insert in entgegen gesetzter Orientierung relativ zu den Vektor-Promotoren, wodurch bei induzierter Genexpression der nicht kodierende DNA-Strang transkribiert wird. Zusätzlich können Gene mit interner *Bam*HI Schnittstelle

nur bedingt in pEBP10 inseriert werden. Metagenomische DNA wird typischerweise mit einem *four base cutter* Restriktionsenzym hydrolysiert. *Bsp*143I (*Sau*3AI Isoschizomer) hat die Erkennungssequenz GATC und erzeugt DNA mit kompatiblen Enden zu *Bam*HI. Allerdings wird bei der Ligation von Vektor und metagenomischer Insert-DNA oft die *Bam*HI Schnittstelle zerstört. Somit können die rekombinanten Plasmide weder komfortabel analysiert noch die Insert-DNA wieder aus pEBP10 isoliert werden.

Aus diesen Gründen wurde ein Polylinker in pEBP10 eingefügt, wodurch pEBP12 entstand (Abb. 9). Der Polylinker wurde so entworfen, dass möglichst viele, singuläre Restriktionsschnittstellen innerhalb einer kurzen DNA-Sequenz lagen. Zusätzlich wurden jeweils zwei Schnittstellen für zwei verschiedene Restriktionsenzyme (*Swa*I, *Srf*I) *upstream* und *downstream* der *Bam*HI Schnittstelle festgelegt. Dies ermöglicht die Analyse der Insert-DNA in einem Restriktionsverdau unter Verwendung eines einzigen Enzyms. pEBP10 wurde präparativ mit *Bam*HI verdaut (2.15.2), dephosphoryliert (2.15.5) und nach der Hybridisierung des Polylinkers (2.15.1) mit diesem ligiert (2.15.6). Nach Vermehrung der Plasmide in *E. coli* wurde der Erhalt von pEBP12 (10.311 Bp) über Restriktionsanalysen und Sequenzierung (Sequenzierprimer S15) bestätigt.

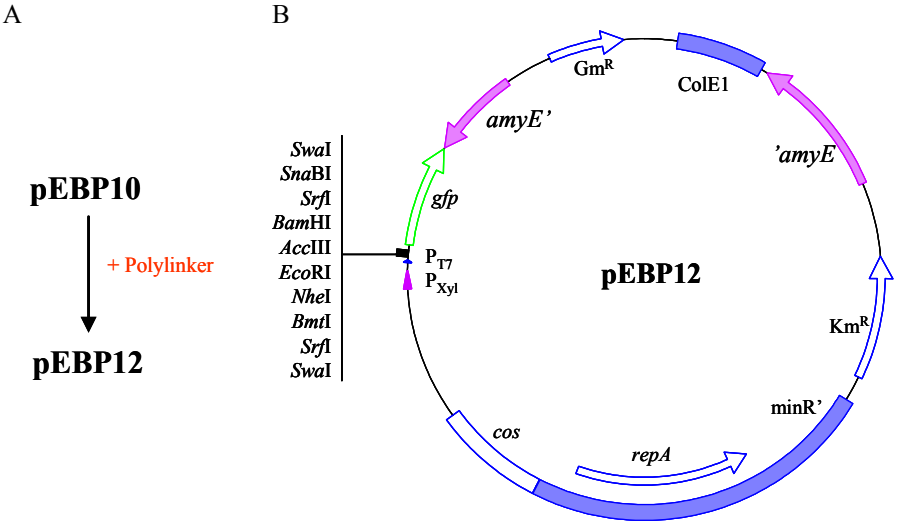


Abb. 9 Schematische Darstellung von pEBP12 sowie dessen Klonierung auf Basis von pEBP10. Detaillierte Information siehe Text. A: Klonierungsschema. In ‚roter Schrift' ist die Veränderung im Genotyp gekennzeichnet. B: Schematische Darstellung von pEBP12. Genetische Elemente für *B. subtilis* sind in ‚lila' und Elemente für *E. coli* und Pseudomonaden in ‚blau' gekennzeichnet. *amyE*' und '*amyE*: 5'- und 3'-Region des α-Amylasegens von *B. subtilis*. ColE1: *colicinogenic factor* E1 Replikationsursprung. *cos*: *cohesive end site*. *gfp*: Gen des grün-fluoreszierenden Proteins (*gfpmut3*). Gm^R: Gentamycin-Resistenzgen. Km^R: Kanamycin-Resistenzgen. minR': ‚verkürzte minimale Region' mit Replikationsprotein (*repA* Gen). P_{T7}: T7 RNA Polymerase-induzierbarer Promotor. P_{Xyl}: Xylose-induzierbarer Promotor.

E. coli DH5α und *P. putida* KT2440 wurden mit pEBP12 transformiert und über Gentamycin und Kanamycin selektiert. Anschließend wurden Flüssigkulturen angezogen und die Plasmid-DNA isoliert. Alle analysierten Plasmide hatten ein korrektes

Restriktionsmuster. *B. subtilis* TEB1030 wurde mit pEBP12 und dem Ursprungsvektor pWE21 transformiert. Während die Selektion mit Chloramphenicol im Falle von pWE21 zu Transformanden führte, konnten im Falle von pEBP12 keine Kolonien erhalten werden. Das Experiment wurde mehrmals mit variierenden Kanamycin-Konzentrationen zur Selektion wiederholt. Bis zu einer Konzentration von 4 µg/mL Kanamycin entstanden auch bei der Wasserkontrolle Kolonien auf den Agarplatten. Ab 5 µg/mL konnten keine Kolonien mehr erhalten werden. Da pWE21 und pEBP12 identische Sequenzen (*amyE*' und '*amyE*) zur Integration in das *B. subtilis* Chromosom tragen und die Transformation parallel durchgeführt wurde, sollte weder die Transformation an sich noch die Integrationssequenzen für das Scheitern der Transformation im Falle von pEBP12 verantwortlich sein. Ein Hauptunterschied der genetischen Elemente von pEBP12 und pWE21 sind für *B. subtilis* die Resistenzgene zur Selektion der Transformanden.

Prinzipiell ist es möglich *B. subtilis* nach der Transformation mit integrativen Vektoren über Kanamycin zu selektieren, wobei unter anderem chromosomal-kodierte Aminoglykosid-3'-Phosphotransferasen (APH) eine Kanamycin-Resistenz vermitteln [224, 225]. Die APH Subfamilie (EC 2.7.1.95) gehört zur Superfamilie der Kinasen, wobei Aminoglykosid-Antibiotika durch eine ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-Hydroxygruppe des Aminohexan-Rings inaktiviert werden [232]. Allerdings stammte das Gen der APH von pEBP12 (bzw. pNUK73) ursprünglich aus dem *E. coli* Plasmid pUC4K bzw. von dem Transposon Tn*903* [233-236]. Eine Vielzahl von Genen Gram-negativer Bakterien wird nicht in *B. subtilis* exprimiert, wobei sowohl die Transkription, durch unzureichende Erkennung der ‚Gram-negativen' Promotoren durch die *B. subtilis* RNA Polymerasen, als auch die Translation, durch ineffiziente Bindung der Ribosomen an die Shine-Dalgarno Sequenz oder durch Codon Bias, limitierend wirken [5, 94, 211, 237]. Es ist daher möglich, dass die APH von pEBP12 in *B. subtilis* keine Kanamycin-Resistenz vermittelte.

pEBP12 replizierte in *E. coli* und *P. putida,* während keine *B. subtilis* Transformanden erhalten werden konnten. Dies war mit größter Wahrscheinlichkeit nicht auf die DNA Aufnahme und die homologe Rekombination mit dem Chromosom, sondern auf die anschließende Selektion, zurückzuführen. Die chromosomal-kodierte Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase von pEBP12 vermittelte in *B. subtilis* keine Kanamycin-Resistenz.

3.1.1.5 Klonierung von pEBP14

Ohne weitere Analysen durchzuführen, wurde die Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase gegen die Kanamycin-Nukleotidyltransferase von pUB110 (GenBank: M19465.1) ausgetauscht, da *B. subtilis* mit dem episomalen Vektor pUB110 transformiert und mit Kanamycin-Konzentrationen ≥ 50 µg/mL selektiert werden kann. Kanamycin-Nukleotidyl-transferasen (EC 2.7.7.-) katalysieren die Übertragung von Nukleotiden auf Kanamycin [238], wodurch dieses die Proteinsynthese nicht mehr inhibieren kann [239]. Zuerst wurde eine singuläre Restriktionsschnittstelle für das Enzym *Bcu*I zwischen minR' und Km^R über *overlap extension* PCR (2.18.3) in pEBP12 eingefügt (pEBP13) und dann wurde das Resistenzgen ausgetauscht, wordurch pEBP14 entstand (Abb. 10).

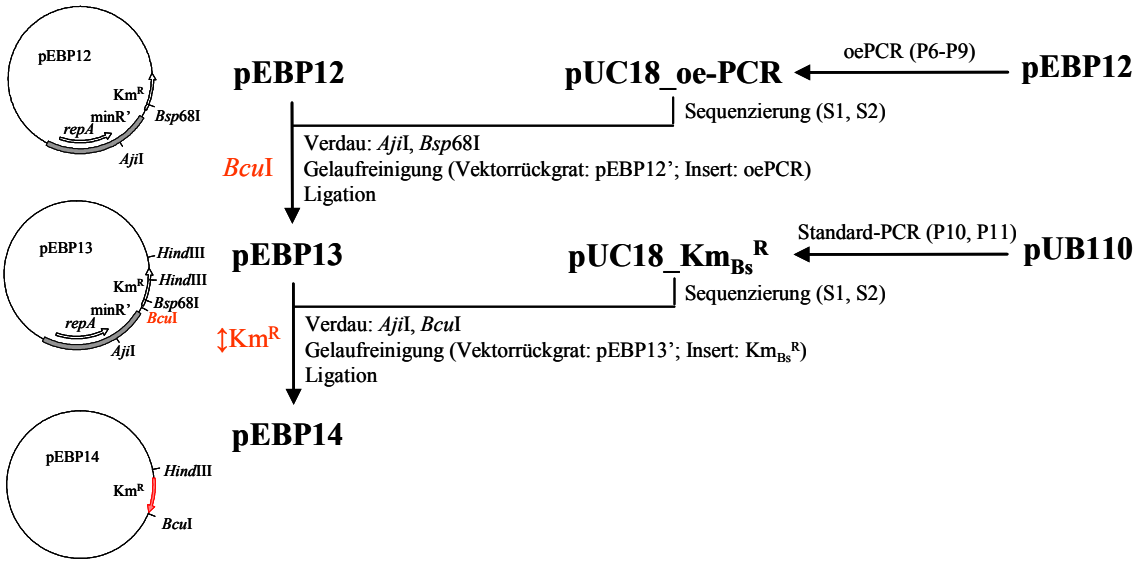


Abb. 10 Schematische Darstellung der Klonierung von pEBP14 auf Basis von pEBP12. Für detaillierte Information zu den angewendeten Methoden und den verwendeten RE siehe Materialien und Methoden. In ‚roter Schrift' ist die Veränderung im Genotyp gekennzeichnet. ↕: Austausch. *Bcu*I: eingefügte Schnittstelle für das Enzym *Bcu*I. Km^R: Kanamycin-Resistenz-gen. minR': verkürzte minimale Region. oePCR: *overlap extension* PCR. P: PCR Primer. *repA*: Gen des Replikationsproteins. S: Sequenzierprimer.

Nach der erfolgreichen Konstruktion von pEBP14 in *E. coli* DH5α wurde die Funktionalität des Shuttle-Vektors in *P. putida* und in *B. subtilis* überprüft. Im Falle von *P. putida* KT2440 konnten Transformanden erhalten werden, deren Plasmide ein korrektes Restriktionsmuster aufwiesen. Allerdings wurden bei der Transformation von *B. subtilis* TEB1030 nur Transformanden mit den Kontrollvektoren pWE21 und pAC6 [127] erhalten, nicht aber mit pEBP14. Das Experiment wurde analog zur Transformation mit pEBP12 mehrmals wiederholt, wobei die zur Selektion eingesetzte Kanamycin-Konzentration variiert wurde (2,5-10 µg/mL). Bis zu einer Kanamycin-Konzentration von 4 µg/mL bildeten sich auch bei der Wasserkontrolle Kolonien, während ab 5 µg/mL Kanamycin keine Kolonien mehr entstanden. Um auszuschließen, dass die partiellen Sequenzen des

α-Amylasegens von pEBP14 mutiert waren und deswegen die Transformation nicht stattfinden konnte, wurde pEBP14 sequenziert (Primer S16-S18). Die Sequenzen von *'amyE* und *amyE'* war abgesehen von drei Nukleotiden fehlerfrei. Da schon eine homologe Sequenz von 70 Basen Rekombinationsereignisse ermöglicht [240, 241], sollten drei substituiert Nukleotidpaare innerhalb von '*amyE* (~ 1 Kb) bzw. *amyE*'(~ 0,6 Kb) keinen Einfluss haben.

Möglicherweise inaktiviert eine chromosomal-kodierte und daher wahrscheinlich nur moderat exprimierte Kanamycin-Nukleotidyltransferase das Antibiotikum Kanamycin nicht ausreichend, das an verschiedenen Stellen am Ribosom binden [232, 242] und dort zu Übersetzungsfehlern (*mistranslation*) und/oder zur vorzeitigen Termination der mRNA führen kann [243]. Wird die Kanamycin-Nukleotidyltransferase allerdings durch ein episomales Plasmid kodiert, ist die Gendosis gesteigert und dadurch auch das Expressionsniveau, wodurch die Bindung von Kanamycin an die Ribosomen verhindert werden kann.

pEBP14 replizierte in *E. coli* und *P. putida*. Transformanden konnten über Gentamycin und über Kanamycin selektiert werden. Der Austausch der Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase gegen eine Kanamycin-Nukleotidyltransferase hingegen ermöglichte nicht die Selektion von *B. subtilis* Transformanden. Dieses Resistenzgen aus pUB110 vermittelt anscheinend nur in episomalen Plasmiden Kanamycin-Resistenz.

3.1.1.6 Klonierung und Charakterisierung von pEBP18

Die Selektion von *B. subtilis* durch ein chromosomal-kodiertes Kanamycin-Resistenzgen führte weder auf Basis der Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase des Transposons Tn*903* (3.1.1.4) noch durch die Kanamycin-Nukleotidyltransferase aus pUB110 (3.1.1.5) zu Transformanden. Da aber *B. subtilis* nach der Transformation mit pWE21 oder pAC6 zuverlässig über Chloramphenicol selektiert werden kann, wurde die Selektion der *B. subtilis* Transformanden über Kanamycin verworfen und eine Chloramphenicol-Resistenz in pEBP14 eingefügt. Um den Vektor nicht zu vergrößern und die Anzahl der Resistenzgene so gering wie möglich zu halten, wurde das Kanamycin-Resistenzgen von pEBP14 gegen eine Chloramphenicol-Resistenz ausgetauscht (pEBP17, Abb. 11).

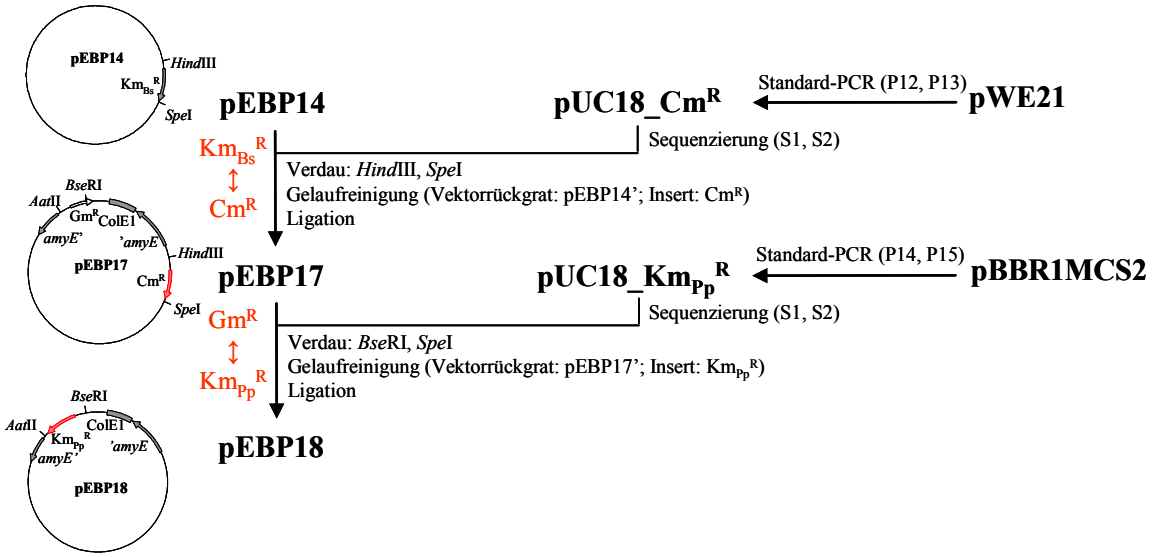


Abb. 11 Schematische Darstellung der Klonierung von pEBP18 auf Basis von pEBP14. Für detaillierte Information zu den angewendeten Methoden und verwendeten RE siehe Materialien und Methoden. In ‚roter Schrift' ist die Veränderung im Genotyp gekennzeichnet. ↕: Austausch. *amyE*' und '*amyE*: 5'- und 3'-Region des α-Amylasegens von *B. subtilis*. Bs: *Bacillus subtilis*. ColE1: *colicinogenic factor* E1 Replikationsursprung. Cm^R: Chloramphenicol-Resistenzgen. GmR: Gentamycin-Resistenzgen. Km^R: Kanamycin-Resistenzgen. P: Primer der PCR. Pp: *Pseudomonas putida*. S: Sequenzierprimer.

Die Chloramphenicol-Resistenz konnte nicht an Stelle der Gentamycin-Resistenz platziert werden, da bei der Rekombination mit dem Chromosom die ‚interne' Region zwischen den beiden partiellen Sequenzen des α-Amylasegens (ColE1 *ori* und Gm^R) verloren gehen kann [16, 227]. Nur bei einer *Campbell-type* Integration, die zusätzlich zu einer Duplikation von homologen Sequenzen führt, würde die ‚interne Region' erhalten bleiben [244, 245]. Im Falle der erwünschten doppelt-homologen Rekombination wird diese ersetzt [18].

Gene von *B. subtilis* werden normalerweise in *E. coli* exprimiert [2, 211]. Auch das Chloramphenicol-Resistenzgen, das ursprünglich aus dem *Staphylococcus aureus* Plasmid pC194 [219, 246] stammte, vermittelte in *E. coli* Antibiotika-Resistenz. *P. putida* KT2440 wurde nach der Transformation mit pEBP17 zuverlässig über Gentamycin selektiert. Da aber der Expressionsstamm *P. putida* KT2440T7 zusätzlich eine intrinsische Gentamycin-Resistenz kodiert [147], ist die Selektion von *P. putida* KT2440T7 pEBP17 über Gentamycin nicht möglich. Auch die Selektion über Chloramphenicol ist nicht optimal, da Pseudomonaden durch eine gering-permeable äußere Membran und ein ausgeprägtes Efflux-System in Gegenwart hoher Chloramphenicol-Konzentrationen wachsen können [247, 248]. Daher wurde zusätzlich noch das Gentamycin-Resistenzgen gegen eine Kanamycin-Resistenz ausgetauscht, wodurch pEBP18 (10.706 Bp) entstand (Abb. 11, Abb. 12). Die Vermehrung der rekombinanten DNA erfolgte in *E. coli* DH5α.

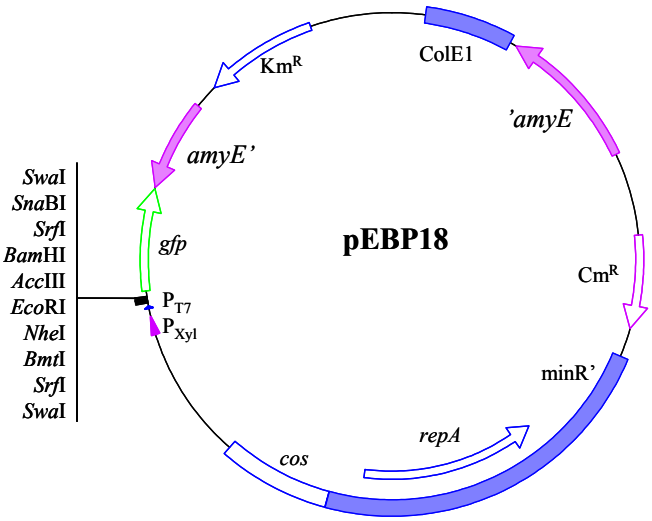


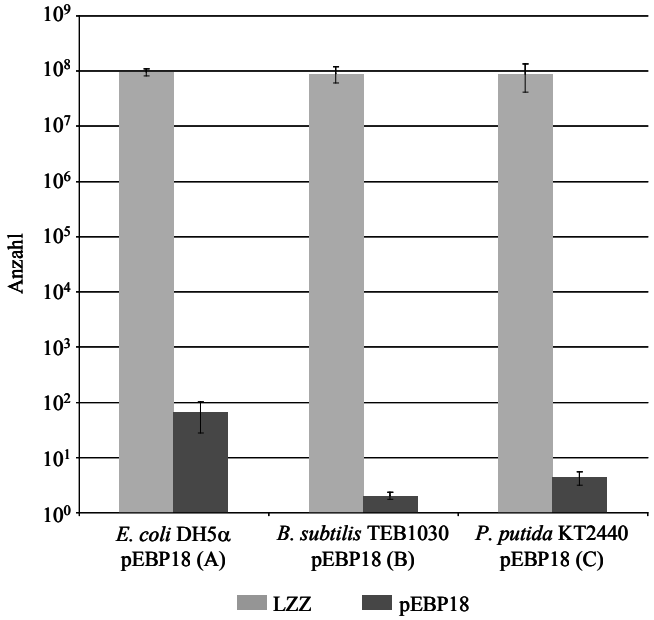
Abb. 12 Schematische Darstellung von pEBP18. Genetische Elemente für *B. subtilis* sind in ‚lila' und Elemente für *E. coli* und Pseudomonaden in ‚blau' gekennzeichnet. *amyE*' und '*amyE*: 5'- und 3'-Region des α-Amylasegens von *B. subtilis*. Cm^R: Chloramphenicol-Resistenzgen. ColE1: *colicinogenic factor* E_1 Replikationsursprung. *cos*: *cohesive end site*. *gfp*: Gen des grün-fluoreszierenden Proteins (*gfpmut3*). Km^R: Kanamycin-Resistenzgen. minR': ‚verkürzte minimale Region' mit Replikationsprotein (*repA* Gen). P_{T7}: T7 RNA Polymerase-induzierbarer Promotor. P_{Xyl}: Xylose-induzierbarer Promotor. Für Informationen zu den angegebenen RE siehe Materialien und Methoden.

Nachdem pEBP18 erhalten werden konnte, wurde die Funktionalität in den drei Wirten überprüft. Dazu wurden *E. coli* DH5α, *P. putida* KT2440 und *B. subtilis* TEB1030 mit pEBP18 transformiert und selektiert (2.23). Anschließend wurden einige Gram-negative Transformanden in Flüssigkultur angezogen, die Plasmide isoliert (2.14.1) und über Restriktions-analyse (2.15.2, 2.16) kontrolliert. *B. subtilis* Transformanden wurden auf Stärkeplatten hinsichtlich ihrer Amylase-Aktivität (2.12.1) untersucht. Die Integration von pEBP18 ins Chromosom Amylase-negativer Klone wurde mittels PCR überprüft (2.18.2). Korrekte Klone wurden kryokonserviert (2.9).

pEBP18 ist der erste funktionale Shuttle-Vektor, der gleichzeitig in den Wirten *E. coli*, *B. subtilis* und *Pseudomonas* Spezies genutzt werden kann.

Nachdem Funktionalität von pEBP18 in allen drei Wirten bestätigt werden konnte, wurde die Plasmid-Kopienzahl in der exponentiellen Wachstumsphase über RT-PCR bestimmt (2.19). Dazu wurden *E. coli* DH5α pEBP18, *P. putida* KT2440 pEBP18 und *B. subtilis* TEB1030 pEBP18 in Flüssigkultur bis zu einer OD_{600} von 1 angezogen. Anschließend wurde aus den Organismen Gesamt-DNA isoliert. pEBP18 wurde über das Reportergen *gfpmut3* und das Chromosom über den Sigmafaktor *rpoD* (*E. coli*, *P. putida*) bzw. *sigA* (*B. subtilis*) quantifiziert. Aus der Menge und der Größe von Plasmid und Chromosom wurde die Plasmid-Kopienzahl pro Zelle berechnet [165]. Zusätzlich wurde durch

Plattierung serieller Verdünnung der Kulturen auf selektiven Agarplatten die Lebendzellzahl pro OD_{600} für jeden Organismus ermittelt (Abb. 13).



Wirt	LZZ/OD_{600}	pEBP18/Zelle
A	$9{,}6 \pm 1{,}5 \times 10^7$	65 ± 38
B	$9{,}1 \pm 3 \times 10^7$	2
C	$8{,}8 \pm 4{,}7 \times 10^7$	4 ± 1

Abb. 13 Analyse der Plasmid-Kopienzahl von pEBP18 in der exponentiellen Wachstumsphase in *E. coli* DH5α, *P. putida* KT2440 und *B. subtilis* TEB1030. Die Plasmid-Kopienzahl wurde in der exponentiellen Wachstumsphase über RT-PCR bestimmt. Zusätzlich wurde für jeden Organismus die LZZ pro OD_{600} durch Plattierung serieller Verdünnungen der Kulturen auf selektiven Agarplatten ermittelt. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer Dreifachbestimmungen von drei (A, C) bzw. zwei (B) unabhängigen Kulturen A: *E. coli* DH5α pEBP18. B: *B. subtilis* TEB1030 pEBP18. C: *P. putida* KT2440 pEBP18. LZZ: Lebendzellzahl. OD_{600}: optische Dichte gemessen bei 600 nm.

Alle drei Wirte hatten während des exponentiellen Wachstums eine ähnliche LZZ von ungefähr 1×10^8 *cfu* pro OD_{600}. Hingegen lag pEBP18 in den drei Organismen in unterschiedlicher Kopienzahl vor. pEBP18 ist in *E. coli* DH5α ein *high copy number* Vektor, wobei die Kopienzahl mit 65 ± 38 Plasmiden pro Chromosom bestimmt werden konnte. In *P. putida* KT2440 existierte pEBP18 mit drei bis fünf Molekülen pro Bakterienchromosom und war somit ein *low copy number* Vektor [13-15]. Während pEBP18 in *E. coli* und Pseudomonaden als episomales Plasmid vorlag, integrierte er in das *B. subtilis* Chromosom über homologe Rekombination und sollte daher in identischer Kopienzahl wie das Chromosom vorliegen. Allerdings wurde die Kopienzahl über RT-PCR mit zwei Molekülen pro Chromosom bestimmt. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Unterschied liegt im Aufbau des Experiments. Die Bestimmung der Plasmid-Kopienzahl wurde in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer $OD_{600} = 1$ durchgeführt. Während des exponentiellen Wachstums sind die Bakterien vital und die Zellteilung erfolgt zyklisch mit hoher Geschwindigkeit. Das Gen der α-Amylase, in das pEBP18 integriert war, liegt am Anfang des *B. subtilis* Chromosoms bei 28° [201, 249].

Das *housekeeping* Gen *sigA* hingegen ist bei 222° [201] kodiert. Daher ist es durchaus möglich, dass bei einer OD_{600} = 1 der Teil des Chromosoms, in den pEBP18 integriert war, schon repliziert war, wodurch pEBP18 relativ zu *sig*A in doppelter Kopienzahl vorliegen würde.

Alle drei Wirte hatten während des exponentiellen Wachstums eine ähnlich Lebendzellzahl von ungefähr 1×10^8 *cfu* pro OD_{600}. pEBP18 lag in *E. coli* DH5α als *mid copy number* Vektor mit einer Kopienzahl von 65 ± 38 Plasmiden pro Chromosom und in *P. putida* KT2440 als *low copy number* Vektor mit drei bis fünf Molekülen pro Bakterienchromosom vor. In *B. subtilis* TEB1030 integriert pEBP18 in das nicht-essenzielle α-Amylasegen und lag daher in identischer Kopienzahl wie das Chromosom vor.

3.1.2 Konstruktion von Vektoren der pEBP20er-Serie

Alle pEBP-Vektoren der 10er-Serie (pEBP10 bis pEBP18) replizieren in *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida*. Es wurde angenommen, dass die Replikation dieser Vektoren in *P. putida* durch ein 2,3 Kb großes Fragment, genannt ‚verkürzte minimale Region' (minR'), kodiert wird. Dieses Fragment stammt ursprünglich aus dem kryptischen Plasmid pNI10 von *Pseudomonas fulva* IF-4, dessen Kopienzahl mit 30 bis 40 Molekülen pro Zelle bestimmt wurde [130, 131]. Es ist publiziert, dass diese ‚verkürzte minimale Region' aus einem Replikationsprotein (*repA* Gen) und einem Replikationsursprung (*ori*) besteht und dass pNI10-Derivate nicht nur in *Pseudomonas* Spezies, sondern auch in *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* und *Proteus mirabilis* replizieren [130]. Die Replikation und die Kopienzahl der pEBP-Vektoren der 10er-Serie sollte demnach in *E. coli* sowohl durch minR' als auch durch den *colicinogenic factor* E_1 Replikationsursprung (ColE1) gesteuert werden. Da nicht bekannt war, inwieweit sich beiden Replikationsurspünge positiv oder negativ beeinflussen, sollte der ColE1 *ori* eliminiert werden, wodurch Vektoren der pEBP20er-Serie entstehen sollten.

3.1.2.1 Elimination des ColE1 *ori* auf Basis von pEBP10, pEBP14 und pEBP18

Die Elimination des ColE1 *ori* wurde auf Basis von pEBP10, pEBP14 und pEBP18 durchgeführt (Abb. 14). Dazu wurden die Plasmide pEBP10 und pEBP14 präparativ mit dem Restriktionsenzym *Bsp*TI verdaut, die Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und anschließend erfolgte eine partielle Hydrolyse mit *Eam*1105I. pEBP18 wurde nur präparativ mit *Bsp*TI verdaut.

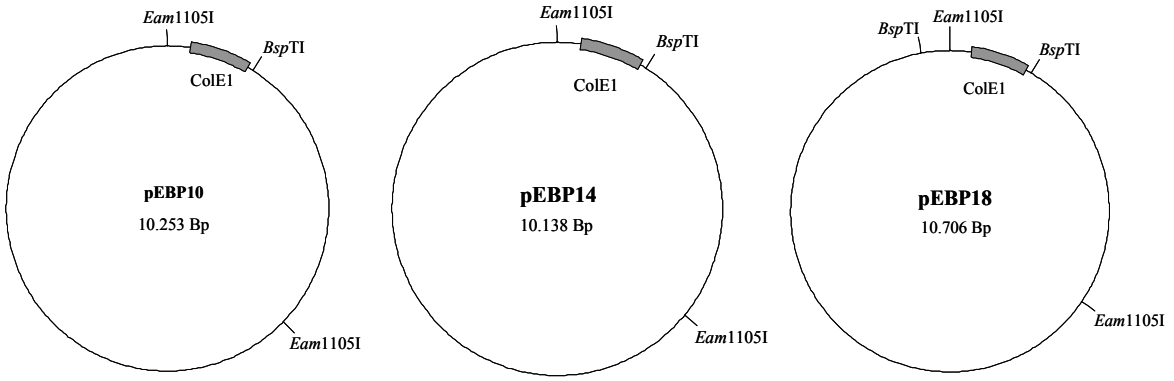


Abb. 14 Schematische Darstellung von pEBP10, pEBP14 und pEBP14. Bp: Basenpaare. ColE1: *colicinogenic factor* E1 Replikationsursprung. Für Informationen siehe Materialien und Methoden.

Anschließend wurde das Vektorrückgrat gereinigt und religiert. Nach der Transformation von *E. coli* DH5α oder *P. putida* KT2440 waren die erzielten Transformationseffizienzen jedes Mal sehr niedrig und die isolierten Plasmide der Klone erwiesen sich stets als die parentalen Plasmide der pEBP10er-Serie (nicht dargestellt). Obwohl die Experimente mehrmals wiederholt wurden, konnten keine Plasmide ohne *colicinogenic factor* E_1 Replikationsursprung erhalten werden.

Auch war es nicht möglich, Shuttle-Vektoren ausschließlich auf Basis der ‚verkürzten minimalen Region' von pNUK73 zu konstruieren. So sollte die Fusion von minR' mit dem episomalen Replikon von pUB110 [132, 229, 250] zu Shuttle-Vektoren der pEBP30er-Serie führen [213]. Die Experimente wurden mehrmals wiederholt. Die Effizienzen der Transformation von *E. coli* DH5α oder *P. putida* KT2440 mit Ligationsansätzen waren jedes Mal gering und nach der Plasmidisolierung wurden ausschließlich die parentalen Plasmide pEBP15 und pEBP16 [213] oder komplett neu strukturierte Plasmide erhalten, die immer den ColE1 *ori* enthielten. Korrekte Plasmide, die auf der ‚verkürzten minimalen Region' ohne ColE1 *ori* basierten, konnten nicht erhalten werden [213]. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass die ‚verkürzte minimale Region' (minR') von pNUK73 und pEBP10-Derivaten zwar für ein funktionales Replikationsprotein, nicht aber für einen Replikationsursprung kodiert. Die Replikation der Plasmide würde demnach in *E. coli* ausschließlich durch den *colicinogenic factor* E_1 Replikationsursprung erfolgen und in *P. putida* über ColE1 in Kombination mit dem Replikationsprotein von minR'. Dafür spricht auch, dass pEBP18 in *P. putida* KT2440 mit nur drei bis fünf Plasmiden pro Zelle vorliegt und nicht die für pNI10-Derivate typische Plasmidkopienzahl von 30-40 Plasmid-Molekülen pro Zelle erreicht [130, 131]. Das prinzipiell eine Kombination aus ColE1 *ori* und Replikationsprotein die Plasmidreplikation in *Pseudomonas* Spezies ermöglicht, konnte mehrfach demonstriert werden [251-253].

Nach der Insertion eines ‚stabilisierenden Fragments' in pBR322 replizierte das Plasmid pRO1614 nicht nur in *E. coli*, sondern auch in *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* und *Klebsiella pneumoniae* [253]. pUCP Plasmide wie z.B. pUCP18 (GenBank: U07164.1) und pUCP19 [254] besitzen ebenfalls dieses ‚stabilisierende Fragment'. Obwohl weder eine Übereinstimmung auf DNA- noch auf Protein-Ebene zwischen den Replikationsproteinen aus pNUK73 (471 AS) und pUCP18 (277 AS) besteht, scheinen beide Proteine die Replikation von Plasmiden mit ColE1 *ori* in *Pseudomonas* Spezies zu ermöglichen.

Die ‚verkürzte minimale Region' (minR') von pNUK73 kodierte höchstwahrscheinlich für ein funktionales Replikationsprotein (RepA), nicht aber für einen *ori*. Die Replikation von pNUK73 und Plasmide der pEBP10er-Serie erfolgte in *E. coli* potentiell durch den *colicinogenic factor* E_1 Replikationsursprung und in *P. putida* durch eine Kombination von ColE1 *ori* und RepA analog zu pUCP-Plasmiden. Die Deletion des ColE1 *ori* war in pEBP10-Derivaten nicht möglich und Shuttle-Vektoren konnten nicht ausschließlich auf Basis von minR' konstruiert werden.

3.1.2.2 *in silico* Sequenzvergleiche der pNI10-Derivate

Die durchgeführten Experimente (3.1.2.1) ließen vermuten, dass minR' von pNUK73 möglicherweise nicht für einen Replikationsursprung kodierte. Daher wurden die Sequenzen der Plasmide pNUK73, pNI105 und des Ursprungsplasmids pNI10 *in silico* miteinander verglichen (Abb. 15).

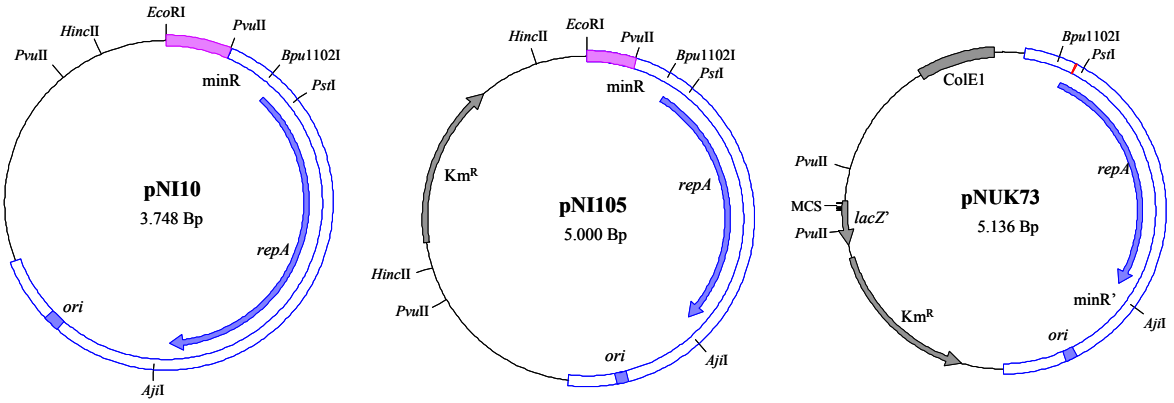


Abb. 15 Schematische Darstellung von pNI10, pNI105 und pNUK73. Die ‚verkürzte minimale Region' minR' mit Replikationsprotein (*repA* Gen) und Replikationsursprung (*ori*) ist ‚blau' gekennzeichnet. Die ‚minimale Region' minR von pNI10 und pNI105 ist im Vergleich zu pNUK73 5'-terminal um 238 Basenpaare vergrößert. Diese Region ist ‚lila' gekennzeichnet. minR' von pNUK73 hat eine Insertion von acht Basen im *orf* des Replikationsproteins (*repA* Gen). Die Position ist in der Plasmidkarte ‚rot' markiert. Bp: Basenpaare. ColE1: *colicinogenic factor* E1 Replikationsursprung. Km^R: Kanamycin-Resistenzgen. *lacZ*': 5'-Fragment der β-Galaktosidase mit *multiple cloning site* (MCS). Für Informationen zu den Restriktionsenzymen siehe Materialien und Methoden.

Das kryptische Plasmid pNI10 aus *Pseudomonas fulva* IF-4 [130] ist 3.748 Bp groß und kodiert für ein Replikationsprotein (*repA* Gen) und für einen Replikationsursprung (*ori*). Weitere Elemente zur Replikation in *Pseudomonas* Spezies sind nicht bekannt, wobei ein Fragment von 2.592 Bp als ‚minimale Region' (minR) annotiert wurde [131]. Das Plasmid pNI105 basiert auf dem Ursprungsvektor pNI10, kodiert aber zusätzlich ein Kanamycin-Resistenzgen aus pUC4K [233, 235], das in die *Hinc*II-Schnittstelle inseriert wurde [131]. minR' von pNUK73 ist im Vergleich zu minR von pNI105 um 238 Nukleotide am 5'-Terminus verkürzt. Außerdem existiert eine Insertion von acht Basen im *orf* des Replikationsproteins (3.1.1.3). pNUK73 besitzt neben dem Kanamycin-Resistenzgen aus pUC4K noch zusätzlich einen *colicinogenic factor* E_1 Replikationsursprung und das 5'-Fragment der β-Galaktosidase mit MCS zur Blau-Weiß-Selektion von entsprechenden Wirtsstämmen über Komplementation.

Unter der Annahme, dass die ‚verkürzte minimale Region' minR' von pNUK73 und pEBP10-Derivaten zwar für ein Replikationsprotein nicht aber für einen Replikationsursprung kodiert, sind drei Szenarien denkbar. (*i*) Der Replikationsursprung ist theoretisch innerhalb von minR' bzw. innerhalb der kodierenden Sequenz des Replikationsproteins kodiert, wird aber durch die Insertion von acht Basenpaaren zerstört. (*ii*) Der Replikationsursprung existiert nur im Falle von minR und nicht in minR', da er innerhalb der 238 Nukleotide liegt, um die minR im Gegensatz zu minR' größer ist. (*iii*) Die ‚minimale Region' ist generell falsch annotiert und der Replikationsursprung ist außerhalb lokalisiert.

3.1.2.3 Elimination des ColE1 *ori* auf Basis von pEBP191

Die ‚verkürzte minimale Region' (minR') von pEBP10, pEBP14 und pEBP18 basierte auf dem 2,3 Kb großen Fragment von pNUK73 und war daher im Vergleich zur ‚minimalen Region' (minR) von pNI10 und pNI105 um 238 Nukleotide am 5'-Ende der Region verkürzt. Um zu untersuchen, ob der Replikationsursprung innerhalb dieser 238 Nukleotide liegt, wurde pEBP191 konstruiert (Abb. 16, Abb. 18).

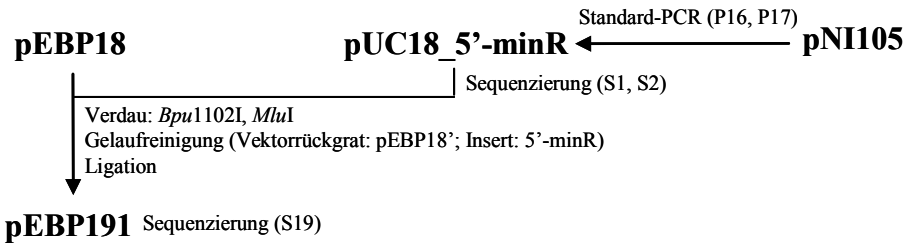


Abb. 16 Schematische Darstellung der Klonierung von pEBP191. Für detaillierte Informationen zu den angewendeten Methoden und verwendeten RE siehe Materialien und Methoden. P: PCR Primer. S: Sequenzierprimer.

Da die Klonierung über die Schnittstellen *Bpu*1102I und *Mlu*I durchgeführt wurde, war das eingefügte Fragment zusätzlich um 146 Basenpaare *upstream* der ‚minimalen Region' vergrößert, wodurch sich für pEBP191 eine Gesamtgröße von 11.090 Bp ergab. Zur Eliminierung des ColE1 *ori* wurde pEBP191 präparativ mit *Bsp*TI verdaut und nach Aufreinigung des Vektorrückgrats religiert. Nach der Transformation von *E. coli* DH5α und *P. putida* KT2440 mit dem Ligationsansatz wurden nur rekombinante Plasmide isoliert, die noch die Sequenz des *colicinogenic factor* E_1 Replikationsursprungs besaßen. Die Sequenz des ColE1 *ori* konnte nicht aus pEBP191 eliminert werden. Daher sollte der Replikationsursprung von pNI105 nicht innerhalb der 238 Nukleotide liegen, um die minR im Gegensatz zu minR' größer ist.

Allerdings haben pEBP191 und pEBP18 eine Insertion von acht Basen im *orf* des Replikationsproteins. Obwohl Funktionalität des Replikationsproteins besteht, könnte durch die Insertion der Replikationsursprung zerstört werden, würde er genau an dieser Stelle lokalisiert sein. Um dies zu analysieren könnte der Vektor pEBP192 konstruiert werden (Abb. 17).

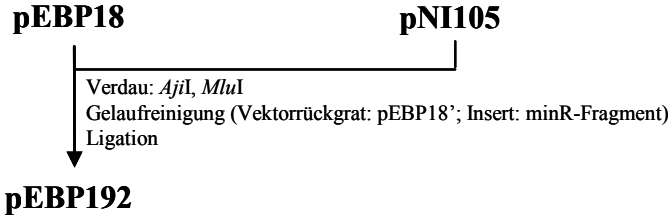


Abb. 17 Schematische Darstellung der (hypothetischen) Klonierung von pEBP192. Für detaillierte Informationen zu RE und Methoden siehe Materialien und Methoden.

Ließe sich der ColE1 *ori* auf Basis von pEBP192 deletieren, läge der *ori* in der 5'-Region des *repA* Gens und würde durch die Insertion der acht Basen zerstört werden. Allerdings wurde diese Untersuchung aus Zeitgründen nicht verfolgt. Die Plasmide pEBP18, pEBP191 und pEBP192 sind noch einmal schematisch in Abb. 18 visualisiert.

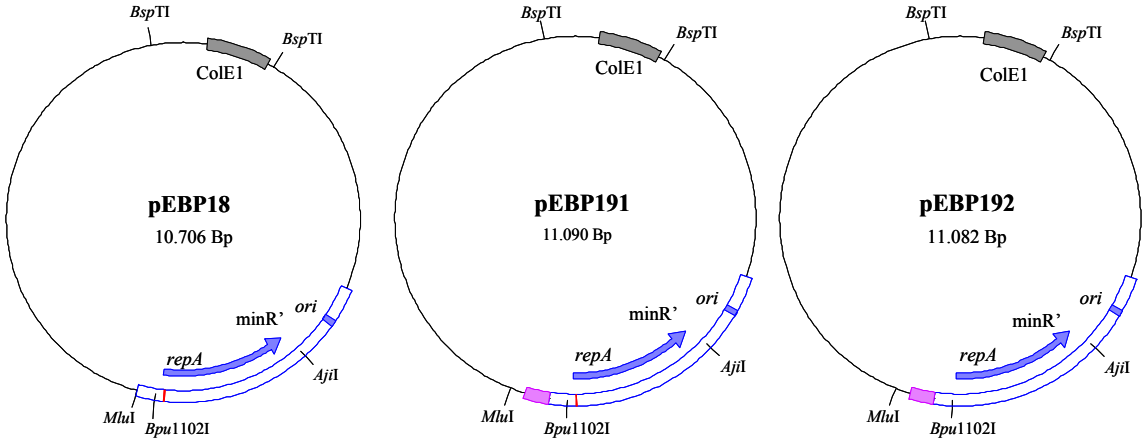


Abb. 18 Schematische Darstellung von pEBP18, pEBP191 und pEBP192. Die ‚verkürzte minimale Region' minR' mit Replikationsprotein (*repA* Gen) und Replikationsursprung (*ori*) ist ‚blau' gekennzeichnet. Die ‚minimale Region' minR von pNI10 und pNI105 ist im Vergleich zu pEBP18, dessen ‚verkürzte minimale Region' auf pNUK73 basiert, um 238 Nukleotide vergrößert. Diese Region ist ‚lila' gekennzeichnet. minR' von pNUK73 bzw. pEBP18 hat eine Insertion von acht Basen im *orf* des Replikationsproteins (*repA* Gen). Die Position ist in der Plasmidkarte ‚rot' markiert. Bp: Basenpaare. ColE1: *colicinogenic factor* E1 Replikationsursprung. Für Informationen zu den Restriktionsenzymen siehe Materialen und Methoden.

Die ‚verkürzte minimale Region' minR' von pNUK73 und pEBP10-Derivaten kodierte höchstwahrscheinlich keinen Replikationsursprung. Die Vergrößerung von minR' um 238 Nukleotiden am 5'-Terminus hatte keinen Einfluss. pNUK73 und pEBP10-Derivate sollten demnach in *E. coli* über ColE1 und in *P. putida* analog zu pUCP-Plasmide über ColE1 und RepA replizieren. Die ‚minimale Region' minR von pNI10 bzw. pNI105 besitzt keine Insertion im *orf* von *repA*. Ob daher der Replikationsursprung in der kodierenden Sequenz von *repA* liegt und in minR' durch die Insertion zerstört wurde, oder ob der *ori* außerhalb lokalisiert ist, konnte nicht geklärt werden.

3.1.2.4 Elimination des ColE1 *ori* auf Basis von pEBP193

In *E. coli* DH5α und in *P. putida* KT2440 ist der Vektor pNI105 funktional. Er muss zwingend einen Replikationsursprung besitzen. Das Plasmid pNI105 hat im Vergleich zu pNUK73 bzw. pEBP10-Derivaten *downstream* von minR bzw. minR' ein Fragment von 906 Nukleotiden. Um zu überprüfen, ob der *ori* innerhalb dieser 906 Basenpaare liegt, wurde der Vektor pEBP193 konstruiert (Abb. 19).

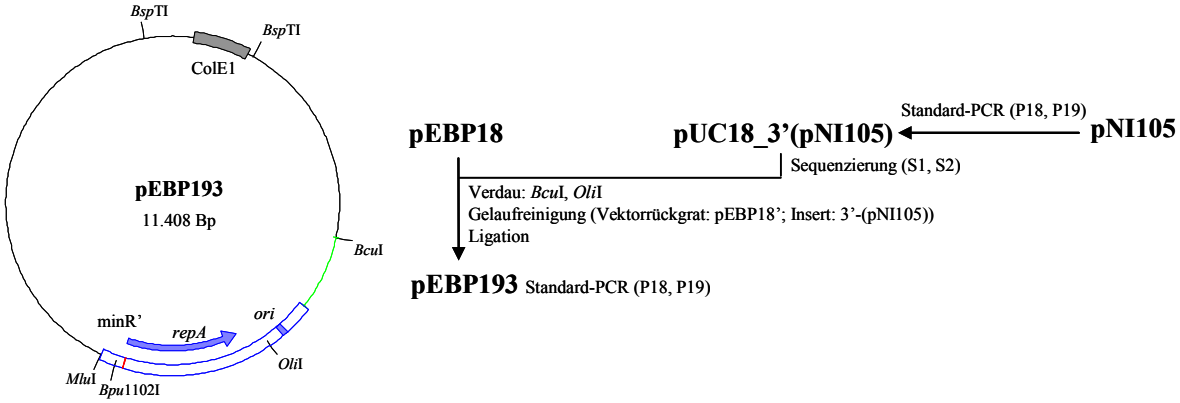


Abb. 19 Schematische Darstellung von pEBP193 sowie dessen Klonierung. Für detaillierte Informationen zu den angewendeten Methoden und verwendeten RE siehe Materialien und Methoden. Die ‚verkürzte minimale Region' minR' mit Replikationsprotein (*repA* Gen) und hypothetischem Replikationsursprung (*ori*) sind ‚blau' gekennzeichnet. Die Insertion von acht Basen im *orf* des Replikationsproteins ist in der Plasmidkarte ‚rot' markiert. Das *Oli*I/*Bcu*I Fragment wurde aus pNI105 amplifiziert und nach Vermehrung in pUC18 in pEBP18 inseriert. Dadurch wurde minR' am 3'-Terminus um 906 Nukleotide vergrößert. Diese Nukleotide sind durch eine ‚grüne Linie' kennzeichnet. Bp: Baseenpaare. ColE1: *colicinogenic factor* E1 Replikationsursprung. P: PCR Primer. S: Sequenzierprimer.

Die Plasmide von *E. coli* DH5α Klonen wurden über eine Standard-PCR (2.18.1) mit den Primern P18 und P19 überprüft, wobei pNI105 als Positiv- und pEBP18 als Negativkontrolle mitgeführt wurde. Nur im Falle von pEBP193 und pNI105 sollten PCR Produkte von knapp 1,4 Kb entstehen. Es konnten insgesamt sechs korrekte Plasmide (Abb. 20, Spur 1 bis 6) identifiziert werden.

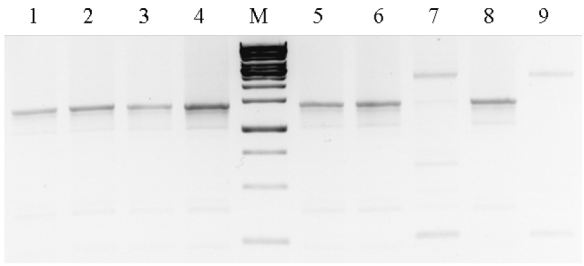


Abb. 20 Analyse der PCR Produkte einer Standard-PCR zur Identifizierung von pEBP193 über AGE. Für detaillierte Information zu den angewendeten Methoden siehe Materialien und Methoden. 5 µL PCR Produkt einer Standard-PCR (Primern P18 und P19) wurden über AGE (1% (w/v) Agarose, TBE, 150 V, 20 min) visualisiert. 1-7: pEBP193 aus *E. coli* DH5α Klon 1-7. 8: pNI105 (Positivkontrolle). 9: pBEP18 (Negativkontrolle). M. *1 Kb DNA Ladder*.

Anschließend wurde die Deletion des ColE1 *ori* durch präparativen Verdau von pEBP193 mit *Bsp*TI und Religation des Vektorrückgrats durchgeführt, wodurch der Vektor pEBP24 entstehen sollte. Nach der Transformation von *E. coli* DH5α mit dem Ligationsansatz waren die Transformationseffizienzen gering, aber es konnten Klone identifiziert werden, deren Plasmide nach einem Verdau mit *Bsp*TI nicht mehr die charakteristische Bande des ColE1 *ori* zeigten (nicht dargestellt). Zwei dieser Plasmide wurden mit den

Sequenzierprimern S20, S22 und S23 sequenziert. Die Bindestellen der Primer im parentalen Vektor pEBP193 bzw. in pEBP24 sind schematisch in Abb. 21 dargestellt.

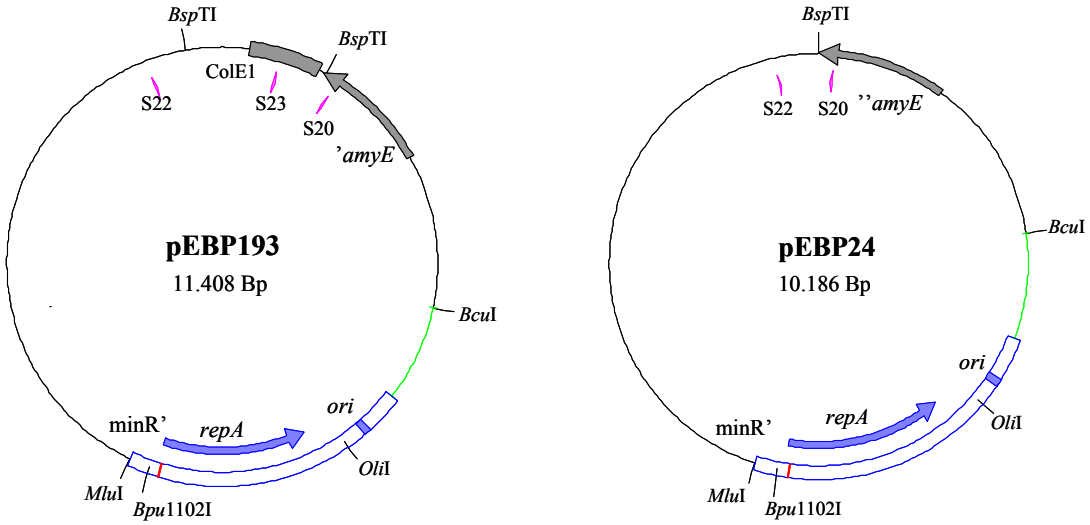


Abb. 21 Schematische Darstellung von pEBP193 bzw. pEBP24. Die ‚verkürzte minimale Region' minR' mit Replikationsprotein (*repA* Gen) und Replikationsursprung (*ori*) sind ‚blau' gekennzeichnet. Die Insertion von acht Basen im *orf* von *repA* ist in der Plasmidkarte ‚rot' markiert. Die ‚grüne Linie' kennzeichnet die 906 Basenpaare, um die minR' am 3'-Terminus vergrößert ist. Die Bindestellen der Sequenzierprimer S20, S22 und S23 sind ‚pink' gekennzeichnet. '*amy*E: 3'-Region des α-Amylasegens von *B. subtilis*. ''*amyE*: verkürzte 3'-Region des α-Amylasegens von *B. subtilis*. Die Sequenz ist im Vergleich zu '*amyE* aus pEBP193 durch den *Bsp*TI-Verdau um 20 Nukleotide verkürzt. Bp: Basenpaare. ColE1: *colicinogenic factor* E1 Replikationsursprung. Für detaillierte Informationen siehe Text oder Materialien und Methoden.

Die Sequenzierung beider Plasmide lieferte zwar identische Ergebnisse, aber nur bei der Verwendung des Primers S23, wobei S23 nicht in pEBP24 binden kann. Es handelte sich allerdings auch nicht um die Sequenz des parentalen Vektors pEBP193. Ein Teil des ColE1 *ori* war erhalten geblieben, während benachbarte Regionen komplett neu strukturiert waren. Auch die Durchsuchung der *online* Datenbank *Nucleotide collection* über BLAST lieferte nur im Bereich des ColE1 *ori* Homologie zu vielen Vektoren. Die restliche Sequenz war komplett unbekannt. pEBP24 konnte nicht erhalten werden.

Die Deletion des ColE1 *ori* in pEBP193 war nicht möglich, wobei nach Transformation von *E. coli* DH5α mit Ligationsansatz weder der parentale Vektor pEBP193 noch pEBP24, sondern strukturell komplett neu organisierte Plasmide erhalten wurden. Die 906 Basenpaare *downstream* von minR des Vektors pNI105 kodieren höchstwahrscheinlich keinen Replikationsursprung.

3.1.2.5 Fazit

Der Vektor pNI105 repliziert sowohl in *E. coli* als auch in *P. putida* und muss daher zwingend für einen Replikationsursprung kodieren. Dieser scheint weder *upstream* noch *downstream* der verkürzten minimalen Region minR' lokalisert zu sein, denn sonst wäre nach der Insertion dieser Regionen in pEBP18 die Deletion des ColE1 *ori* auf Basis von pEBP191 oder pEBP193 möglich gewesen.

Der größte Unterschied zwischen minR' von pNUK73 sowie aller pEBP10-Derivate und minR von pNI10 bzw. pNI105 ist eine Insertion von acht Nukleotiden. Diese Insertion befindet sich nur in minR' und liegt dort im 5'-Terminus von *repA*, wodurch der Leserahmen von RepA bei der Translation verändert wird und der Translationsstart von RepA in minR' neu annotiert werden musste (3.1.1.3). Es ist daher denkbar, dass sich der Replikationsursprung genau an der Stelle der Insertion befindet und durch diese zerstört wurde. Dass prinzipiell der Replikationsursprung innerhalb der kodierenden Sequenz eines Replikationsproteins lokalisiert sein kann, ist beispielsweise vom *Staphylococcus aureus* Plasmid pT181 bekannt. Im Falle von pT181 ist der Replikationsursprung direkt am 5'-Terminus der kodierenden Sequenz des essenziellen Replikationsproteins RepC lokalisiert [255-257]. Dadurch können weder Shuttle-Vektoren ausschließlich auf Basis von minR' konstruiert noch der ColE1 *ori* bei pEBP10-Derivaten eliminiert werden. Für weitere Analysen könnte beispielsweise pEBP192 konstruiert werden (3.1.2.3).

3.2 Entwicklung eines effizienten Protokolls zur Elektroporation von *Pseudomonas putida* KT2440

Sollen Organismen genetisch manipuliert werden, sind Techniken, die das Einbringen von Fremd-DNA in die Zellen ermöglichen, essenziell. *B. subtilis* wird typischerweise über die Ausnutzung seiner natürlichen Kompetenz oder Protoplastierung transformiert, aber auch Transduktion oder Konjugation finden Anwendung [177, 258-262]. Auch die Transformation von *E. coli* ist etabliert. ‚Standard-Methoden' wie chemische Transformation, Elektroporation, Konjugation oder Transduktion [140, 263-266] sind weit verbreitet, aber auch Sonoporation (Ultraschall-vermittelte DNA-Aufnahme) [267] oder Chemoporation [268] kommen zum Einsatz.

Pseudomonaden können über Konjugation transformiert werden, wobei ein Donor (Spenderzelle), der einen Pilus ausbilden kann, mobilisierbare DNA und ein Rezipient

(Empfängerzelle) benötigt werden [1, 269, 270]. Die Shuttle-Vektoren der pEBP-Serie besitzen keinen Transfer-Replikationsursprung und sind nicht mobilisierbar, wodurch sie nicht über Konjugation übertragen werden können. Pseudomonaden können auch über chemische Transformation oder Elektroporation [172, 265, 271, 272] genetisch manipuliert werden, wobei die erzielten Transformationseffizienzen oft nicht mit *E. coli* Transformationen vergleichbar sind. Dies ist für routinemäßige Vermehrung rekombinanter DNA-Moleküle unproblematisch. Sollen allerdings Genbanken in *Pseudomonas putida* KT2440 erzeugt werden, wird eine große Anzahl von Klonen benötigt und ein effizientes Transformationsprotokoll ist eine Grundvoraussetzung. Daher wurden verschiedene Protokolle zur Transformation von *P. putida* KT2440 getestet.

Zuerst wurde die chemische Transformation von *P. putida* KT2440 unter Verwendung von Protokollen zur Transformation von *E. coli*, *P. aeruginosa* and *P. putida* [172, 271] durchgeführt, wobei keine Klonen erhalten werden konnten (Ergebnisse nicht dargestellt).

Anschließend wurden verschiedene Protokolle zur Elektroporation getestet (Tab. 15), die ursprünglich zur Transformation von *E. coli* und Pseudomonaden entwickelt worden waren. Bei der Elektroporation von *P. putida* KT2440 wurden zwar Transformanden erhalten, jedoch wurden die publizierten Transformationseffizienzen nicht erzielt (Ergebnisse nicht dargestellt).

Tab. 15 Getestete Protokolle zur Elektroporation von *Pseudomonas putida* KT2440. *P. putida* KT2440 wurde unter Anwendung der in Tab. 15 aufgeführten Elektroporationsprotokolle transformiert, die für unterschiedliche γ-Proteobakterien publiziert waren (Organismus). Die Wachstumsphase gibt den Zeitpunkt der Zellernte für die Präparation der Zellen an. OD_{600}: Optische Dichte der Kultur gemessen bei 600 nm. Zellen/mL: Zellzahl pro Milliliter vor der Elektroporation. *cfu*/µg DNA: publizierte Transformationseffizienz für den jeweiligen Organismus. Stationär: Verwendung einer Übernachtkultur. ?: keine Angabe.

Organismus	Wachstumsphase	Elektroporations-puffer	Zellen/mL	cfu/µg DNA (publiziert)	Referenz
E. coli DH5α	mittel-logarithmisch (OD_{600} = 0,5-1)	10% (w/v) Glycerin	> 3 x 10^{10}	10^9-10^{10}	[273]
P. putida PpY101	früh-logarithmisch (OD_{600} = 0,26-0,38)	300 mM Saccharose	10^9	1,1 *x* 10^5	[274]
P. aeruginosa PA103	früh-logarithmisch (OD_{600} = 0,3-0,5)	300 mM Saccharose	10^{11}	10^7-10^8	[275]
P. putida KT2440	spät-logarithmisch (OD_{600} = 1-2)	1 mM HEPES	?	10^7	[276]
P. aeruginosa PAO1	stationär	300 mM Saccharose	10^{10}-10^{11}	10^8-10^{11}	[179]
P. putida IF-3 und IF-8	stationär	300 mM Saccharose, 5 mM KH_2PO_4	5-8 *x* 10^{10}	3,6 *x* 10^6 und 2 *x* 10^5	[277]

Die höchste Transformationseffizienz von *P. putida* KT2440 wurde bei der Verwendung von Saccharose-Lösung als Elektroporationspuffer erzielt. Die Substitution von 300 mM Saccharose durch 150 mM Sorbitol und 150 mM Mannitol [278] oder durch 10% (w/v) Glycerin [273] verbesserte nicht die Effizienz (Ergebnisse nicht dargestellt). Da neben dem Puffer auch die Wachstumsphase der Zellen und die Feldstärke während der Elektroporation die Transformationseffizienz beeinflussen, wurde die Transformation von *P. putida* KT2440 mit dem Modell-Plasmid pBBR1MCS2 [128] untersucht. Dazu wurden vitale Zellen in EM-Medium mit 0,5% (w/v) Glukose, entweder über Nacht oder bis zu einer OD_{600} = 2, angezogen. Nach dreimaligem Waschen der Zellen in Saccharose-Lösung wurde eine Konzentration von 10^9-10^{10} Zellen pro Milliliter eingestellt. 130 µL Aliquots der kompetenten Zellen wurden bei verschiedenen Feldstärken unter Verwendung von 2 mm Elektroporationsküvetten und 20-30 ng pBBR1MCS2 elektroporiert. Nach der Regeneration der Zellen in EM1-Medium für 2 h bei 30°C und der Plattierung auf EM1-Medium mit und ohne Antibiotikum wurden Transformationseffizienz und Transformationsrate berechnet. Die Transformationseffizienz wurde als Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (*cfu*) pro Mikrogramm pBBR1MCS2 definiert (2.23.1). Die Transformationsrate, die Anzahl der Zellen die ein Plasmid aufnehmen, berechnete sich aus der Transformationseffizienz dividiert durch die Lebendzellzahl nach der Elektroporation (2.23.2). Die Transformationseffizienzen und Transformationsraten der Experimente sind in Abb. 22 dargestellt.

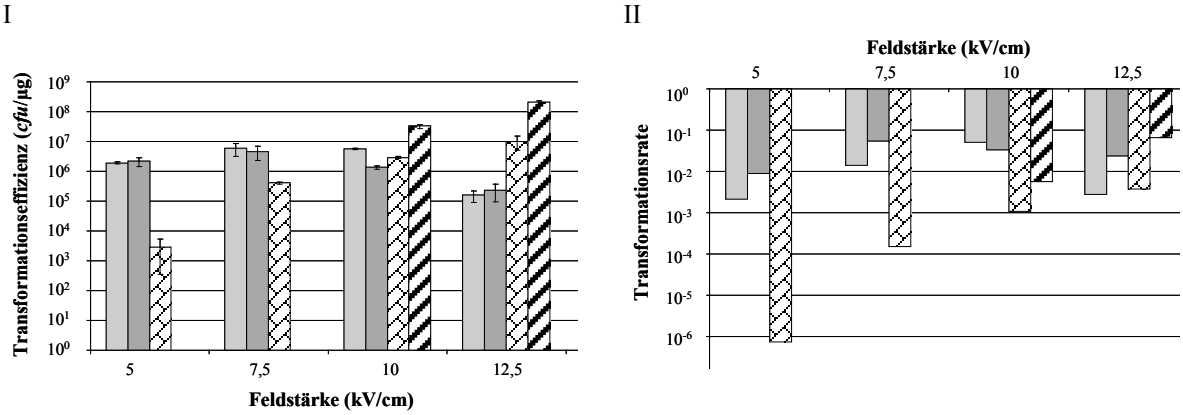


Abb. 22 Transformation von *P. putida* KT2440 mit pBBR1MCS2 durch Elektroporation. *P. putida* KT2440 wurde mit 20-30 ng pBBR1MCS2 über Elektroporation bei verschiedenen Feldstärken (5-12,5 kV/cm) transformiert. Anschließend wurde die Transformationseffizienz (I) und die Transformationsrate (II) bestimmt. Die Transformationseffizienz wurde als Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (*cfu*) pro Mikrogramm pBBR1MCS2 definiert und die Transformationsrate als Verhältnis von Transformationseffizienz zur Lebendzellzahl nach der Elektroporation. Abb. 22 zeigt die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten der Elektroporation spät-logarithmisch gewachsener (hell- und dunkelgrauer Balken) und stationär gewachsener (schraffierte Balken) *P. putida* KT2440. Die Fehlerbalken geben die Standard-Abweichung an.

Die optimale Feldstärke für die Elektroporation war von der Wachstumsphase abhängig und es bestand ein Zusammenhang zwischen der Wachstumsphase und der Fähigkeit der Zellen hohe Feldstärken zu überleben. Mit zunehmender Kultivierungsdauer verändern sich Permeabilität und Komposition von Membranen [88, 92] und wahrscheinlich sind diese für das unterschiedliche Verhalten der Zellen verantwortlich. Spät-logarithmisch gewachsene Zellen wurden bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm vermehrt abgetötet, während ein größerer Anteil der Zellen im stationären Wachstum diese Feldstärke überlebte. Hingegen konnten spät-logarithmisch gewachsene Zellen besser bei niedrigen Feldstärken transformiert werden. Wahrscheinlich war eine Feldstärke von 5 kV/cm zu gering, um effizient DNA in Zellen mit stationärer Wachstumsphase einzubringen. So ergab sich für spät-logarithmisch gewachsene Zellen bei 7,5-10 kV/cm eine max. Transformationseffizienz und für Zellen mit stationärer Wachstumsphase bei 10-12,5 kV/cm. Generell konnten die höchsten Transformationseffizienzen von 0,1-2 x 10^8 *cfu*/µg unter Verwendung von Zellen aus einer Übernachkultur erzielt werden. *P. putida* KT2440 verhielt sich daher nicht wie *E. coli* sondern ähnlich wie andere Pseudomonaden. Erstens konnte *P. putida* KT2440 am effizientesten in der stationären Wachstumsphase über Elektroporation transformiert werden [179, 277]. Zweitens reduzierte das Einfrieren von kompetenten Zellen signifikant die Transformationseffizienz (Ergebnis nicht dargestellt) [275]. Das optimierte und detailliert-beschriebene Transformationsprotokoll ist im Abschnitt Materialien und Methoden (2.23.7) festgehalten.

3.3 Heterologe Expression von Reportergenen mit pEBP18

Die Fähigkeit von Organismen zur funktionalen Expression von Biokatalysatoren variiert [119-121], wobei effiziente Transkription und Translation [87-89] die Expression beeinflussen. Faktoren wie Promotorerkennung, Transkription-Elongation und -Termination [89, 279, 280], Ribosomenbindung an die Shine-Dalgarno Sequenz, Translation-Initiation, -Elongation (*codon usage*) und -Termination [5, 88, 281, 282] spielen eine entscheidende Rolle, aber auch die Faltung des Biokatalysators in eine aktive Konformation, Chaperone und Cofaktoren [90-92], sowie posttranslationale Modifizierungen oder Prozessierungen [89, 93, 94]. Da im Vorfeld unbekannt ist, welcher Biokatalysator wie gut in einem bestimmten Wirt exprimiert wird, können Shuttle-Vektoren eingesetzt werden, um die Expression parallel in verschiedenen Wirten zu studieren und dabei von den Besonderheiten der jeweiligen Wirte zu profitieren [66, 110, 118, 283].

Der Shuttle-Vektor pEBP18 wurde als Expressionsplasmid konstruiert, dessen Funktionalität in verschiedenen Wirten durch die induzierbare Expression von Modellproteinen validiert wurde. Eine Fluoreszenz-optimierte Variante des grün-fluoreszierenden Proteins der Qualle *Aequorea victoria* GFPmut3 [215], nachfolgend nur GFP genannt, fungierte als Transkriptionsreporter. Das Gen wurde *downstream* der MCS durch pEBP18 kodiert. Die Verwendung von grün-fluoreszierenden Proteinen als Biomarker ist etabliert und weit verbreitet [284, 285], da sie sehr stabil sind, in Anwesenheit von Sauerstoff autokatalytisch eine intrinsische Fluoreszenz ausbilden und normalerweise bei deren Expression nicht das Zellwachstum beeinflussen [216, 282, 286].
Als lipolytische Reporter wurden die *Bacillus subtilis* Lipase A (LipA) sowie die *Fusarium solani pisi* Cutinase (Cut) gewählt. Lipasen (EC 3.1.1.3) sind biotechnologisch relevante Enzyme, die von einer Vielzahl von Organismen produziert werden und chemo-, regio- und enantioselektive Reaktionen vermitteln [154, 287, 288]. In wässriger Umgebung spalten sie Triacylglyceride in Glycerin und freie Fettsäuren, während in Abwesenheit von Wasser Veresterungen katalysiert werden [289]. Natürlicherweise wird LipA von *B. subtilis* am Ende des exponentiellen Wachstums produziert [290, 291] und Sec-abhängig, trotz N-terminalem *twin-arginine* Konsensusmotiv [292, 293], ins extrazelluläre Medium sekretiert [294], um Nährstoffe zu erschließen [295]. Cutinasen zählen zur Klasse der Serin-Esterasen und nehmen eine Schlüsselrolle im Infektionsprozess von höheren Pflanzen durch pathogene Pilze ein, indem sie Cutin, ein cuticuläres Polymer, abbauen. Die Cutinase von *Fusarium solani pisi* hat ein bemerkenswert breites Substratspektrum und katalysiert sowohl die Hydrolyse von Triacylglyceriden und Estern als auch Synthesereaktionen (Esterifizierung und Transesterifizierung) [296].

Nach der Insertion der beiden lipolytischen Reportergene in die *Bam*HI-Schnittstelle von pEBP18 und der Transformation und Selektion der Wirte mit den rekombinanten Plasmiden wurde die Expression der Proteine in *B. subtilis* TEB1030 über Xylose und in *E. coli* BL21 (DE3) und *P. putida* KT2440T7 über IPTG induziert und auf Tributyrin-Agarplatten (2.12.4) sowie in Flüssigkultur (2.24-2.27) analysiert. Über das Programm *Clone Manager* wurden die Reportergene *gfpmut3*, *lipA* und *cut in silico* translatiert und die Molekulargewichte über das *ExPASy pI/Mw tool* vorhergesagt (2.2). GFP ist mit 238 AS das größte der drei Proteine und hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 26,9 kDa. Die Cutinase ist um 23 AS kürzer (215 AS) und um 4,6 kDa leichter (22,3 kDa). Die unprozessierte *B. subtilis* Lipase A ist 212 AS groß und 22,8 kDa schwer. Wird

allerdings das Sekretionssignal durch die Signalpeptidase SPase I gespalten [292, 293], entsteht ein um 31 AS verkürztes, ‚reifes' Protein von nur 19,3 kDa [290, 294].

3.3.1 Insertion der Reportergene in pEBP18

Das Gen der *Bacillus subtilis* Lipase A (LipA) wurde über eine Kolonie-PCR (2.18.2) mit den Primern P20 und P21 (2.6) aus *B. subtilis* Marburg 168 [123] amplifiziert. Die kodierende Sequenz der *Fusarium solani pisi* Cutinase wurde über Standard-PCR (2.18.1) mit den Primern P22 und P23 (2.6) ohne Epr (*extracellular serine protease*) Sekretionssignal aus dem Vektor pBSMul3_*cut_ssEpr* [129] vervielfältigt. Die Gene wurden inklusive Shine-Dalgarno Sequenz amplifiziert, wobei über die Oligonukleotide *upstream* und *downstream* der Gene Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI eingeführt wurden. Die PCR Produkte wurden gemäß der Methode zur Standard Klonierung von PCR Produkten (2.20.2) in pUC18 kloniert. Nach der Bestätigung der korrekten Sequenz durch eine Sequenzierung mit den Oligonukleotiden S1 und S2 (2.6) erfolgte die Subklonierung der Reportergene (2.20.3) in den *Bam*HI-geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pEBP18. Nach der Transformation von *E. coli* DH5α mit dem Ligationsansatz, wurden die Transformanden auf selektivem Vollmedium und Tributyrin-Agar angezogen. *E. coli* DH5α besitzt kein Gen der T7 RNA Polymerase und T7 RNA Polymerase-induzierbare Promotoren werden von bakteriellen RNA Polymerasen nicht erkannt [142, 297]. Dennoch konnte *E. coli* DH5α pEBP18_*lipA* durch die Bildung von Hydrolysehöfen auf Tributyrin-Agar identifiziert werden, wobei pEBP18_*lipA* zusätzlich nach einer Plasmidisolierung durch zwei Standard-PCRs (S24, P20 sowie S24, P21) überprüft wurde. *E. coli* DH5α pEBP18_*cut* erzeugte keine Hydrolysehöfe auf Tributyrin-Agar, aber korrekte rekombinante Plasmide wurden nach deren Isolierung über Restriktionsanalyse und Sequenzierung mit den Primern S15 und S21 identifiziert. Welche Vektorsequenz letztlich die Hintergrund-Aktivität in *E. coli* DH5α pEBP18_*lipA* hervorrief, wurde nicht untersucht. Gleichwohl scheint eine Hintergrund-Aktivität von Vektoren der pEBP10er-Serie gelegentlich in *E. coli*-Stämmen aufzutreten, da manchmal bei Plasmid-Isolierungen gelbe Zellpellets der Übernachtkulturen durch die Expression von GFP beobachtet werden konnten.

3.3.2 Heterologe Expression in *E. coli* BL21 (DE3)

Die heterologe Expression der beiden lipolytischen Reporter und von GFP wurde mit *E. coli* BL21 (DE3) untersucht. Dieser *E. coli*-Stamm verfügt über ein ‚T7-System' und kodiert chromosomal das Gen der T7 RNA Polymerase unter Kontrolle eines mit IPTG induzierbaren *lacUV5*-Promotors. Da der *lacUV5*-Promotor typischerweise nicht komplett reprimiert ist wenn kein T7 Lysozym oder Lac-Repressor (*lacI*, *lacI*^{q}) koexprimiert wird, kann es auch in Abwesenheit des Induktors IPTG zu einer schwachen Expression der T7 RNA Polymerase kommen [142, 297-299]. Zuerst wurde *E. coli* BL21 (DE3) mit pEBP18, pEBP18_*lipA* und pEBP18_*cut* transformiert (2.23.4) und auf selektiven Vollmedium angezogen.

Einige Transformanden wurden auf selektiven Tributyrin-Agar, allerdings ohne Induktor, überpickt und ÜN kultiviert. Die Tributyrin-Platte wurde dann bei 4°C gelagert und täglich kontrolliert (Abb. 23).

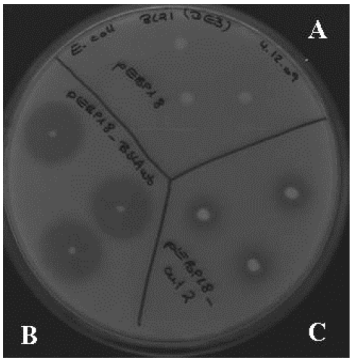


Abb. 23 Heterologe Expression der *Bacillus subtilis* Lipase A (LipA) und der Cutinase (Cut) von *Fusarium solani pisi* in *E. coli* BL21 (DE3) auf Tributyrin-Agar. *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit pEBP18 (A), pEBP18_*lipA* (B) und pEBP18_*cut* (C) transformiert, selektiert und auf Tributyrin-Agar ohne Induktor angezogen. Die Dokumentation erfolgte nach Lagerung der Platten für 15 Tage im Kühlschrank. Abb. 23 wurde in ‚Graustufen' abgebildet und die Kontraste wurden mit *Adobe Photoshop Elemtents 7* verstärkt.

Der Kontrollstamm *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18 erzeugte auch nach 15 Tagen keine Hydrolysehöfe auf Tributyrin-Agar. Ohne Induktion des ‚T7-Systems' wurden sowohl LipA als auch Cut aktiv in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert, wobei LipA größere Hydrolysehöfe auf Tributyrin-Agar erzeugte. Die lipolytische Aktivität trat erst nach mehreren Tagen im Kühlschrank auf. Die schwache Expression wurde wahrscheinlich sowohl durch die Hintergrund-Aktivität von pEBP18 in *E. coli*-Stämmen hervorgerufen (3.3.1), als auch durch das nicht komplett reprimierte ‚T7-System' von *E. coli* BL21 (DE3).

Zur Analyse der heterologen Expression (2.24-2.27) wurden Flüssigkulturen angezogen und die Genexpression und Proteinsynthese wurde mit 100 µM IPTG induziert. Die Probennahme erfolgte unmittelbar vor (0 h) sowie 4 h und 20 h nach der Induktion. Zuerst wurde die Expression von GFP durch eine Fluoreszenzmessung (2.25.1) photometrisch nachgewiesen (Abb. 24).

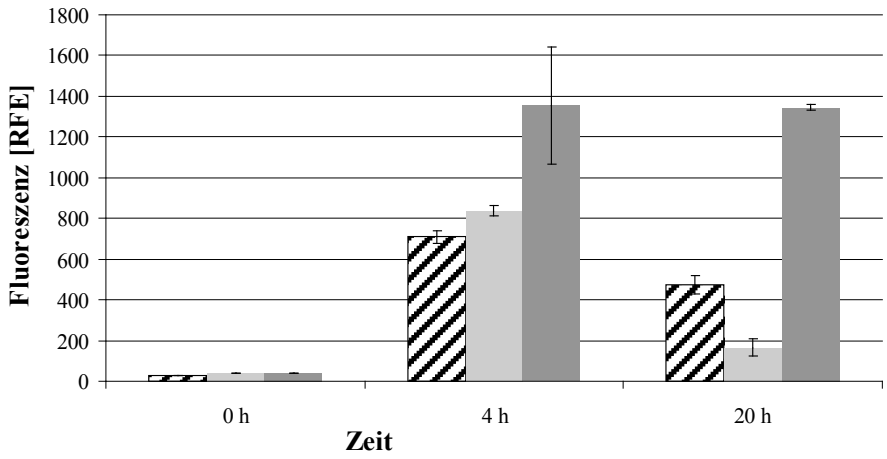


Abb. 24 Photometrische Messung der GFP-Fluoreszenz in verschiedenen *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen. Die GFP-Fluoreszenz wurde unmittelbar vor (0 h) sowie 4 h und 20 h nach Induktion der T7 RNA Polymerase-abhängigen Expression photometrisch bestimmt. Die gemessene Fluoreszenz ist in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angegeben, wobei das Diagramm den Mittelwert und die Standard-Abweichung einer Doppelbestimmung zeigt. Schwarz schraffiert: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18. Hellgrau: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18_*lipA*. Dunkelgrau: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18_*cut*.

Vor der Induktion fand eine geringe GFP Expression statt, die wahrscheinlich auf den unvollständig-reprimierten und chromosomal-kodierten *lacUV5*-Promotor von *E. coli* BL21 (DE3) zurückführen ist (s.o.). Die T7 RNA Polymerase-abhängigen Expression konnte in *E. coli* BL21 (DE3) mit 100 µM IPTG induziert werden und eine unterschiedlich starke GFP-Fluoreszenz der drei Stämme wurde nach 4 h und 20 h Expression am Photometer gemessen. Im Falle von *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18_*lipA* war die Fluoreszenz im Vergleich zum Kontrollstamm *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18 nach 20 h drastisch reduziert. Dies könnte durch die Überexpression der Lipase verursacht worden sein. *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18_*cut* fluoreszierte nach 4 h und 20 h deutlich stärker als die beiden anderen Stämme. Faktoren wie Promotorerkennung und Transkriptions-Initiation, Bindung der Ribosomen an die Shine-Dalgarno Sequenz, *codon usage* etc. sollten in den drei Stämmen ähnlich sein. Da GFP sehr stabil ist und nur langsam degradiert wird, könnte die unterschiedliche Fluoreszenz auf variierende Expression, beispielsweise durch unterschiedliche Transkriptstabilitäten, zurückzuführen sein. mRNA Degradierung ist ein zentraler Regulationsmechanismus in Zellen, der die Genexpression direkt durch die mRNA-Konzentration beeinflusst [300, 301]. Die Halbwertszeiten von mRNAs werden sowohl durch die 5'-UTR als auch die 3'-UTR bestimmt [87, 89]. Sie betragen in *E. coli* im Durchschnitt zwei bis vier Minuten [300, 302], wobei einzelne mRNA-Moleküle Halbwertszeiten von einigen Sekunden bis über einer Stunde aufweisen [300, 301]. Die 3'-UTR, die in allen drei Stämmen ähnlich sein sollte, bestimmt weniger durch die Länge des Transkripts, sondern vielmehr durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen, sog. *hairpin*-

oder *stem loop*-Strukturen, maßgeblich die exonukleolytische Degradierung [300, 302]. 5'-Exonukleasen sind in Prokaryoten nicht identifiziert [303, 304], aber die Fähigkeit der 5'-UTR zur Ausbildung von Sekundärstrukturen erhöht signifikant die Halbwertszeiten von mRNA-Molekülen [300, 305-307]. Zusätzlich scheint der Phosphorylierungsstatus des 5'-Terminus, genauer gesagt die Umwandlung des Triphosphats in ein Monophosphat, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Degradierung der mRNA durch die Endonuklease RNaseE zu sein [301, 304]. So konnten die Halbwertszeit vieler instabiler mRNAs in *E. coli* beispielsweise durch die Fusion mit *ompA* 5'-UTR signifikant erhöht werden [300, 302]. Außerdem existiert, zumindest in manchen Organismen, eine positive Korrelation zwischen mRNA Stabilität und Bindung von Ribosomen an die Shine-Dalgarno Sequenz bzw. Translation der mRNA, möglicherweise durch Beeinflussung des Kontakts von 5'-UTR und RNaseE oder durch die Blockierung von internen Schnittstellen [303, 304, 308, 309].

Da die GFP-Fluoreszenz aber auch direkt von korrekter Proteinkonformation und Aktivierung des Chromophors abhängig ist [286, 310], könnte die unterschiedlich starke Fluoreszenz der drei Stämme auf verschiedene Mengen an löslichem Protein zuückzuführen sein. Daher wurde die GFP Expression über eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot untersucht (Abb. 25).

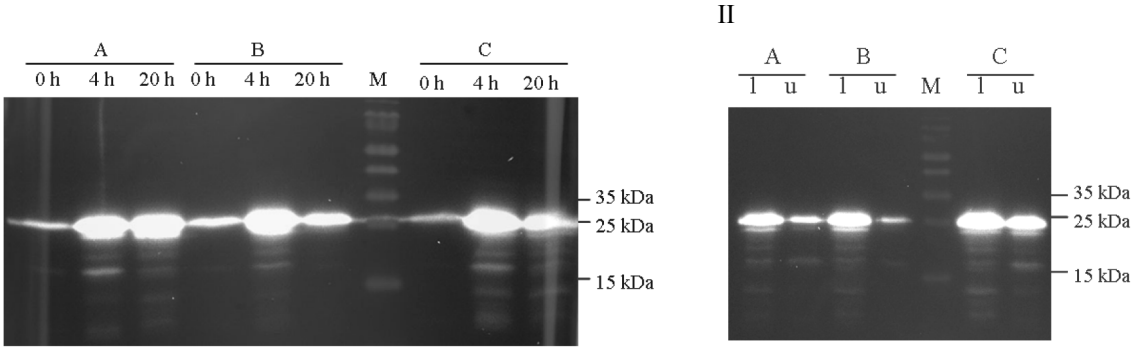


Abb. 25 Nachweis von GFP im GZE verschiedenen *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen über einen Western Blot. I: Intrazelluläres GFP wurde unmittelbar vor (0 h) sowie 4 h und 20 h nach Induktion der Expression nachgewiesen. II: 4 h nach Induktion exprimiertes GFP wurde zusätzlich auf die Bildung von *inclusion bodies* untersucht. Für den Western Blot wurde GFP durch einen polyklonalen Erstantikörper markiert und anschließend das Signal des Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers mit dem *Imaging System Stella 3200* und der *AIDA Software* visualisiert. A: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18. B: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18_*lipA*. C: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18_*cut*. M: *PageRuler Prestained Protein Ladder*. l: lösliche Fraktion. u: unlösliche Fraktion. kDa: Kilodalton. Abb. 25 I und II wurden mit *Adobe Photoshop Elemtents 7* in ‚Graustufen' dargestellt.

Nach 4 h Expression lag GFP teilweise als unlösliches Protein vor. Die Bildung von *inclusion bodies* im Cyto- oder Periplasma wird durch ein Ungleichgewicht von *in vivo* Protein-Aggregation und -Solubilisierung hervorgerufen [87] und triff häufig auf, wenn die Expression durch einen starken Promotor erfolgt [311]. GFP wird in *E. coli* häufig als

teilweise unlösliches Protein exprimiert, wobei die Bildung von löslichem Protein beispielsweise durch eine Veränderung der *codon usage* oder durch Mutagenese der cytoplasmatischen Chaperone GroEL/ES gesteigert werden kann [286, 310].

Die Aktivität der lipolytischen Proteine wurde über die Umsetzung von farblosen *para*-Nitrophenylbutyrat (pNPB) zu gelben *para*-Nitrophenolat und Buttersäure photometrisch gemessen (Abb. 26).

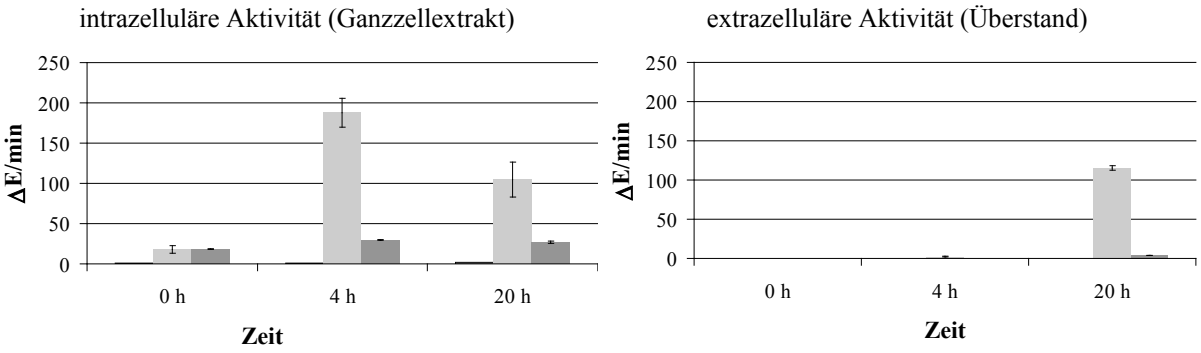


Abb. 26 Photometrische Messung der lipolytischen Aktivität in verschiedenen *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen. Die lipolytische Aktivität der *Bacillus subtilis* Lipase A und der *Fusarium solani pisi* Cutinase wurde durch die Umsetzung von farblosen pNPB zu gelben *para*-Nitrophenolat und Buttersäure photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Aktivität unmittelbar vor (0 h) sowie 4 h und 20 h nach Induktion der Expression gemessen. Die Substratumsetzung ist als Änderung der Absorption pro Minute (ΔE/min) angegeben. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standard-Abweichung einer Doppelbestimmung. Schwarz schraffiert: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18. Hellgrau: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18_*lipA*. Dunkelgrau: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18_*cut*.

Der Kontroll-Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18 hatte zu keinem Zeitpunkt messbare lipolytische Aktivität. Sowohl LipA als auch Cut wurden als aktive Enzyme in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Zum Zeitpunkt der Induktion sowie vier Stunden danach waren beide Enzyme nur intrazellulär messbar (Abb. 26). Nach 20 h hingegen konnte LipA, sowohl im Ganzzellextrakt als auch im extrazellulären Medium, nachgewiesen werden. Nur sehr wenige Proteine, wie beispielsweise Toxine, Hämolysin oder andere Virulenzfaktoren werden von pathogenen *E. coli* ins extrazelluläre Medium sekretiert [92, 311]. LipA besitzt zwar ein Tat-Sekretionssignal und wird vermutlich ins Periplasma translokiert, aber die Sekretion ins extrazelluläre Medium ist unwahrscheinlich und würde zusätzlich Signalsequenzen von PhoA, PelB, OmpA/C/F/T etc. erfordern [311]. In vitalen Zellen stellt die äußere Membran eine wichtige Permeabilitätsbarriere dar, die den Eintritt von toxischen Molekülen in Gram-negative Bakterien erschwert, gleichzeitig aber auch die Freisetzung von Proteinen ins extrazelluläre Medium [92, 238]. Mit zunehmender Kultivierungsdauer und physiologischen Veränderung der Zellen nimmt die Permeabilität der äußeren Membran zu und periplasmatische Proteine können ins Medium strömen

[311]. Die Freisetzung von intrazellulären und periplasmatischen Proteinen könnte aber auch durch die Autolyse von abgestorbenen Zellen hervorgerufen worden sein.

LipA hatte im pNPB-Test eine höhere Aktivität als die Cutinase. Ob letztendlich LipA stärker exprimiert wurde oder nur das Substrat *p*-Nitrophenylbutyrat effizienter umsetzte, wurde nicht geklärt. Allerdings wurde die Expression zusätzlich über SDS-PAGE visualisiert (Abb. 27).

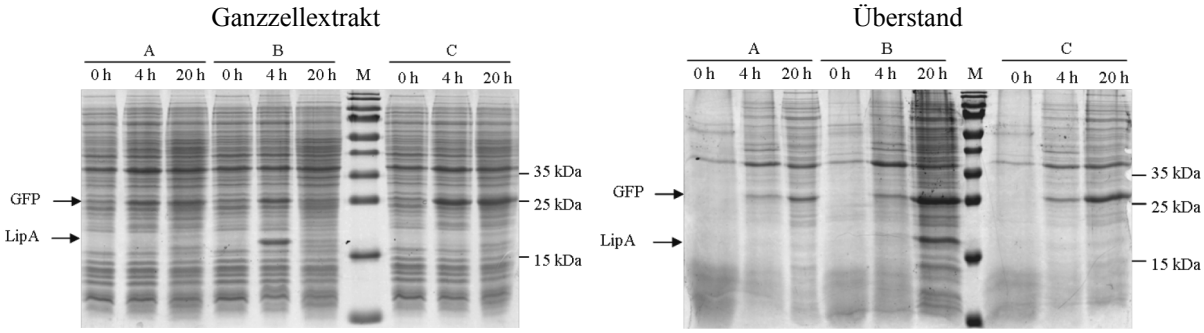


Abb. 27 SDS-PAGE von Ganzzellextrakt und Überstand verschiedener *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen. Die Proteinexpression der Zellen wurde unmittelbar vor (0 h) sowie 4 h und 20 h nach Induktion Expression über SDS-PAGE visualisiert. Dazu wurden 0,1 OD_{600} zur Analyse des Ganzzellextraktes und Überstand von 2 OD_{600} eingesetzt. Die Dokumentation der Gele erfolgte nach Coomassie-Färbung mit dem *Imaging System Stella 3200* und der *AIDA Software*. Die Aufnahmen wurden mit *Adobe Photoshop Elemtents 7* in ‚Graustufen' dargestellt. A: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18. B: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18*_lipA*. C: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18*_cut*. M: *PageRuler Prestained Protein Ladder*. kDa: Kilodalton.

In *E. coli* BL21 (DE3) wurden GFP und LipA so stark exprimiert, dass beide Proteine in der SDS-PAGE sichtbar wurden. Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung wanderte GFP bei ca. 25 kDa, dies entspricht dem vorhergesagten Molekulargewicht von 26,9 kDa (3.3). Für das Preprotein von LipA wurde ein Molekulargewicht von 22,8 kDa und für das ‚reife' Protein von 19,3 kDa vorhergesagt. Das Wanderverhalten von LipA im SDS-Gel etwas oberhalb der 15 kDa Bande des Protein-Molekulargewicht Standards spricht daher für eine Prozessierung durch SPase I und für eine Translokation ins Periplasma.
Die Proben der Übernachtkulturen zeigten viele intrazelluläre Proteine im Überstand, wahrscheinlich durch eine Autolyse der Zellen und eine erhöhte Permeabilität der äußeren Membran während der langen Kultivierungsdauer. Der Nachweis von LipA im Überstand durch die Umsetzung von pNPB nach 20 h Expression (Abb. 26) ist daher vermutlich nicht auf Sekretion zurückzuführen. Auch schien LipA tatsächlich stärker exprimiert zu werden als die Cutinase, deren Expression nicht durch die SDS-PAGE visualisiert werden konnte.

GFP, die *Bacillus subtilis* Lipase A und die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* wurden aktiv in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Das T7 RNA Polymerase-abhängige System war erwartungs-gemäß nicht komplett reprimiert. Die Expression konnte mit IPTG induziert werden. pEBP18 eignet sich zur heterologen Expression von Protein in *E. coli* BL21 (DE3).

3.3.3 Heterologe Expression in *P. putida* KT2440T7

Pseudomonas putida KT2440T7 verfügt analog zu *E. coli* BL21 (DE3) über ein ‚T7-System'. Das Gen der T7 RNA Polymerase wird unter Kontrolle eines mit IPTG induzierbaren *lacUV5*-Promotors chromosomal-kodiert [147]. Nach Transformation von *P. putida* KT2440T7 (2.23.7) mit pEBP18, pEBP18_*lipA* und pEBP18_*cut* wurden die Transformanden zuerst auf selektiven Agar-Platten (Vollmedium) angezogen.

Einige Klone wurden auf selektiven Tributyrin-Agar ohne Induktor überpickt, ÜN kultiviert, bei 4°C gelagert und täglich auf die Expression der lipolytischen Reporter überprüft (Abb. 28).

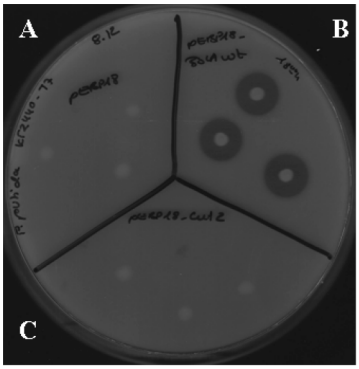


Abb. 28 Heterologe Expression der *Bacillus subtilis* Lipase A (LipA) und der Cutinase (Cut) von *Fusarium solani pisi* in *P. putida* KT2440T7 auf Tributyrin-Agar. *P. putida* KT2440T7 wurde mit pEBP18 (A), pEBP18_*lipA* (B) und pEBP18_*cut* (C) transformiert, selektiert und auf Tributyrin-Agar ohne Induktor angezogen. Die Dokumentation erfolgte nach Lagerung der Platten für 11 Tage im Kühlschrank. Abb. 28 wurde in ‚Graustufen' abgebildet und die Kontraste wurden mit *Adobe Photoshop Elemtents 7* verstärkt.

Der Kontrollstamm *P. putida* KT2440T7 pEBP18 erzeugte keine Hydrolysehöfe auf Tributyrin-Agar. Auch konnte aktive Cutinase von *Fusarium solani pisi* nicht über Tributyrin-Agar nachgewiesen werden. Die Bildung von Hydrolysehöfen trat nur im Falle der *Bacillus subtilis* Lipase A nach mehreren Tagen im Kühlschrank auf. Da sich kein Induktor im Tributyrin-Agar befand, ist die schwache Expression höchstwahrscheinlich auf den nicht komplett reprimierten und chromosomal-kodierten *lacUV5*-Promotor zurückzuführen. In Abwesenheit von chromosomal- oder episomal-kodiertem und exprimiertem Lac-Repressor kommt es in ‚T7-Systemen' von *Pseudomonas* Spezies zur Bildung von T7 RNA Polymerase [312-315].

Die Expression der Reporterproteine wurde in Flüssigkultur unmittelbar vor (0 h) sowie 4 h und 20 h nach der Induktion der Expression mit IPTG analysiert. Zuerst wurde GFP

sowohl photometrisch über eine Fluoreszenzmessung (Abb. 29) als auch über einen Western Blot (Abb. 30) in den Zellen nachgewiesen.

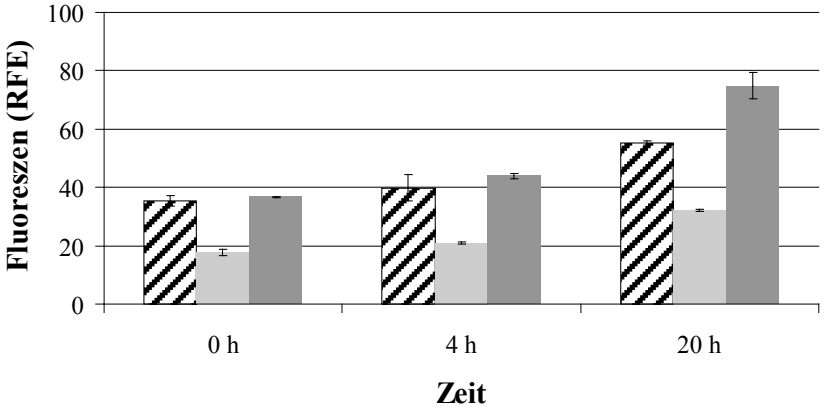


Abb. 29 Photometrische Messung der GFP-Fluoreszenz in verschiedenen *P. putida* KT2440T7-Stämmen. Die GFP-Fluoreszenz wurde unmittelbar vor (0 h) sowie 4 h und 20 h nach Induktion der T7 RNA Polymerase-abhängigen Expression photometrisch bestimmt. Die gemessene Fluoreszenz ist in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angegeben, wobei das Diagramm den Mittelwert und die Standard-Abweichung einer Doppelbestimmung zeigt. Schwarz schraffiert: *P. putida* KT2440T7 pEBP18. Hellgrau: *P. putida* KT2440T7 pEBP18_*lipA*. Dunkelgrau: *P. putida* KT2440T7 pEBP18_*cut*.

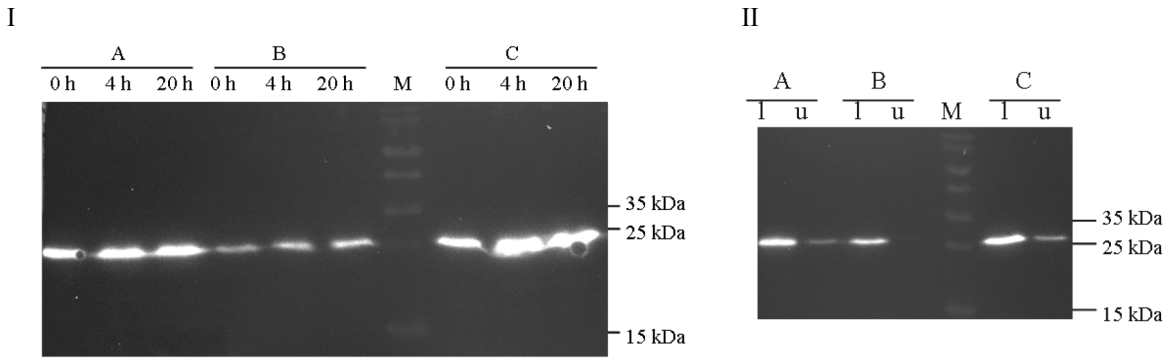


Abb. 30 Nachweis von GFP im GZE verschiedenen *P. putida* KT2440T7-Stämmen über einen Western Blot. I: Intrazelluläres GFP wurde unmittelbar vor (0 h) sowie 4 h und 20 h nach Induktion der T7 RNA Polymerase-abhängigen Expression nachgewiesen. II: Die GFP Expression nach 4 h wurde zusätzlich auf die Bildung von unlöslichem GFP untersucht. Für den Western Blot wurde GFP durch einen polyklonalen Erstantikörper markiert und anschließend das Signal des Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers mit dem *Imaging System Stella 3200* und der *AIDA Software* visualisiert. A: *P. putida* KT2440T7 pEBP18. B: *P. putida* KT2440T7 pEBP18_*lipA*. C: *P. putida* KT2440T7 pEBP18_*cut*. M: *PageRuler Prestained Protein Ladder*. l: lösliche Fraktion. u: unlösliche Fraktion. kDa: Kilodalton. Abb. 30 I und II wurden mit *Adobe Photoshop Elemtents 7* in ‚Graustufen' dargestellt.

Vor der Induktion fand eine deutliche GFP Expression statt, die sich mit größter Wahrscheinlichkeit auf den unvollständig-reprimierten und chromosomal-kodierten *lacUV5*-Promotor von *P. putida* KT2440T7 zurückführen lässt. Die gemessene Fluoreszenz war im Vergleich zu *E. coli* BL21 (DE3) erhöht (3.3.2). Ob tatsächlich eine stärkere Expression vor der Induktion stattfand, oder ob mehr GFP in einer aktiven Konformation gebildet und somit stärkere Fluoreszenz gemessen werden konnte, wurde nicht analysiert. Nach 4 h und 20 h Expression war die gemessene GFP-Fluoreszenz der Pseudomonaden deutlich schwächer als die Fluoreszenz der korrespondierenden *E. coli*

BL21 (DE3)-Stämme (Abb. 24). In den drei *P. putida* KT2440T7-Stämmen variierte die GFP-Fluoreszenz. Der Stamm pEBP18_*lipA* fluoreszierte am geringsten, obwohl zumindest 4 h nach Induktion der Expression kaum unlösliches GFP nachweisbar war (Abb. 30). Da im Allgemeinen die gemessene Fluoreszenz mit der Menge an korrekt gefaltetem GFP korreliert [310], könnte tatsächlich eine geringere Menge von GFP gebildet worden sein, möglicherweise durch die Koexpression der Lipase (Abb. 31), die zusätzlich den Translationsapparat belastete. Der Stamm pEBP18_*cut* hatte die stärkste GFP-Fluoreszenz nach 20 h, vielleicht durch die größte Stabilität des polycistronischen Transkripts (siehe dazu 3.3.2).

Die Aktivität der beiden lipolytischen Reporter in *P. putida* KT2440T7 wurde durch die Umsetzung von farblosen *para*-Nitrophenylbutyrat zu gelben *para*-Nitrophenolat und Buttersäure photometrisch gemessen (Abb. 31).

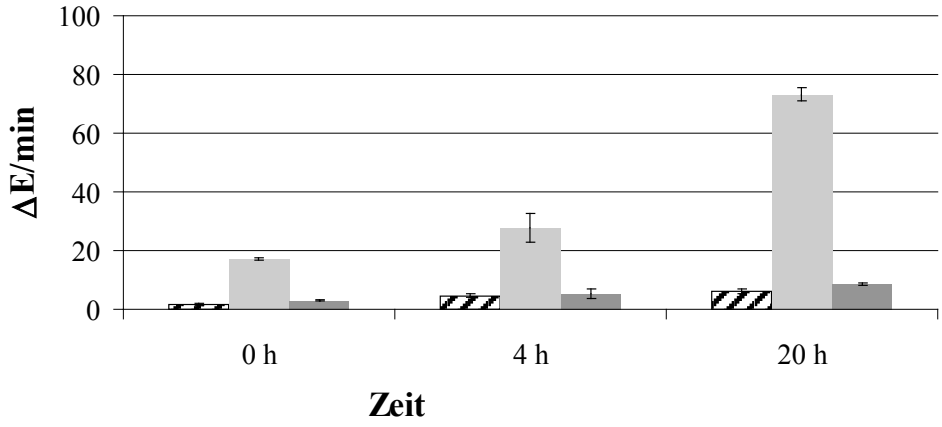


Abb. 31 Photometrische Messung der intrazellulären lipolytischen Aktivität in verschiedenen *P. putida* KT2440T7-Stämmen. Die lipolytische Aktivität von LipA und Cut wurde durch die Umsetzung von farblosen *para*-Nitrophenylbutyrat zu gelben *para*-Nitrophenolat und Buttersäure photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Aktivität unmittelbar vor (0 h) sowie 4 h und 20 h nach Induktion der Expression gemessen. Die Substratumsetzung ist als Änderung der Absorption pro Minute (ΔE/min) angegeben. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standard-Abweichung einer Doppelbestimmung. Schwarz schraffiert: *P. putida* KT2440T7 pEBP18. Hellgrau: *P. putida* KT2440T7 pEBP18_*lipA*. Dunkelgrau: *P. putida* KT2440T7 pEBP18_*cut*.

Lipolytische Aktivität konnte in den Kulturüberständen der drei *P. putida* KT2440T7-Stämme zu keinem Zeitpunkt gemessen werden (Ergebnis nicht dargestellt). Signifikante intrazelluäre, lipolytische Aktivität war weder im Kontrollstamm *P. putida* KT2440T7 pEBP18 noch in *P. putida* KT2440T7 pEBP18_*cut* nachweisbar. Das Ergebnis war analog zum Tributyrin-Agar Test (Abb. 28). Da aber *P. putida* KT2440T7 pEBP18_*cut* GFP exprimierte (Abb. 29, Abb. 30), muss Transkription stattgefunden haben. Es ist nicht ungewöhnlich, dass Proteine ohne *leader*-Sequenzen nicht oder nur schlecht in einem heterologen Wirt exprimiert werden [129, 281]. Ob die Translation der Cutinase gestört

war, oder ob die Cutinase zwar exprimiert aber sofort wieder degradiert worden war, wurde nicht analysiert.

Die *Bacillus subtilis* Lipase A wurde als aktives Enzym durch *P. putida* KT2440T7 pEBP18_*lipA* exprimiert und nicht ins extrazelluläre Medium freigesetzt. Die Permeabilität der äußeren Membran von *P. putida* scheint, im Gegensatz zu *E. coli* [311], auch bei längerer Kultivierungsdauer nicht zuzunehmen. Es wäre auch denkbar, dass noch nicht so viele Zellen abgestorben und lysiert waren. Im Vergleich zur Expression in *E. coli* BL21 (DE3) war generell die Aktivität der Reporter reduziert, möglicherweise durch die geringere Gendosis (3.1.1.6). Die schwächere Expression spiegelte sich auch in der SDS-PAGE wider, da die Überexpression der Reporter nicht sichtbar wurde (Ergebnis nicht dargestellt).

GFP und die *Bacillus subtilis* Lipase A wurden aktiv in *P. putida* KT2440T7 exprimiert, wobei der Promotor induzierbar, das T7 RNA Polymerase-abhängige System aber nicht komplett reprimiert war.

3.3.4 Expression in *B. subtilis* TEB1030

B. subtilis TEB1030 wurde mit pEBP18, pEBP18_*lipA* und pEBP18_*cut* transformiert und selektiert (2.23.6). Anschließend wurde die Integration der Vektoren ins *B. subtilis* Chromosom über doppelt-homologe Rekombination kontrolliert (2.12.1). Amylase-negative Klone wurden zusätzlich über PCR überprüft (2.18.2) und konserviert (2.9). Anschließen wurden sie auf selektiven Tributyrin-Agar mit und ohne Induktor überpickt, ÜN kultiviert und bei 4°C gelagert. Obwohl *B. subtilis* TEB1030 ein Lipase-defizienter Stamm (Δ*lip*A, Δ*lip*B) ist, traten bei der Kultivierung auf Tributyrin-Agar typischerweise nach 48 h kleine Hydrolysehöfe auf. Daher wurde die Expression der lipolytischen Reporter schon nach 36 h überprüft (Abb. 32).

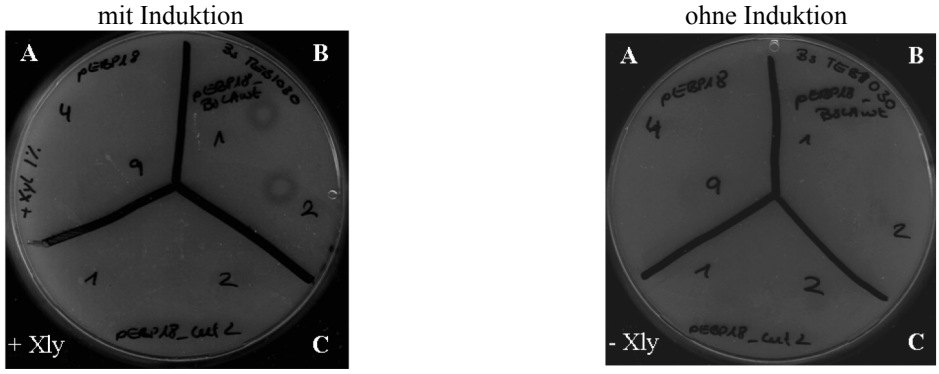


Abb. 32 Heterologe Expression der *Bacillus subtilis* Lipase A (LipA) und der Cutinase (Cut) von *Fusarium solani pisi* in *B. subilis* TEB1030 auf Tributyrin-Agar. *B. subtilis* TEB1030 wurde mit pEBP18 (A), pEBP18_*lipA* (B) und pEBP18_*cut* (C) transformiert, selektiert und auf Tributyrin-Agar mit und ohne Induktor angezogen. + Xyl: Platten wurden mit 1% (w/v) Xylose versetzt. - Xyl: Platten ohne Xylose. Die Dokumentation erfolgte nach Anzucht der Organismen ÜN und Lagerung der Platten für weitere 24 Stunden im Kühlschrank. Abb. 32 wurde in ‚Graustufen' abgebildet und die Kontraste wurden mit *Adobe Photoshop Elemtents 7* verstärkt.

Der Kontrollstamm *B. subtilis* TEB1030 pEBP18 erzeugte keine Hydrolysehöfe auf Tributyrin-Agar. Auch die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* (Cut) konnte nicht über Tributyrin-Agar nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist analog zu voran gegangenen Untersuchungen, in denen die die Cutinase ohne Signalsequenz nicht in *B. subtilis* exprimiert werden konnte [129]. Nur LipA wurde aktiv gebildet, wobei die Expression mit Xylose induziert wurde. Ohne Induktor entstanden keine Hydrolysehöfe.

Die Expression wurde in Flüssigkultur unmittelbar vor sowie 4 h und 20 h nach der Induktion der Expression mit 1% (w/v) Xylose analysiert. GFP konnte weder photometrisch noch über einen Western Blot nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Prinzipiell ist der Nachweis von (Fluoreszenz-optimierten) GFP-Varianten aber in *Bacillus* Spezies möglich [284, 316, 317]. Nach der Integration eines für *gfpmut1* kodierenden Plasmids in das *B. subtilis* Chromosom konnte GFPmut1 über die Induktion eines Xylose-abhängigen Promotors aktiv exprimiert werden [221]. Allerdings werden bei der Expression von Fluoreszenzreportern in *B. subtilis* zwei Phänomene beobachtet. Zum einen kann die Gendosis eine detektierbare Fluoreszenz beeinflussen und die Expression von Fluoreszenzreportern lag teilweise unterhalb der Nachweisgrenze, wenn sie chromosomal-kodiert wurden [318]. Zusätzlich ist die Inititation der Translation kritisch und die Fusion kurzer, N-terminaler Sequenzen stark exprimierter Proteine an die Fluoreszenzreporter steigerte signifikant deren Expression [281, 282, 318].
In den *B. subilis* TEB1030-Stämmen wurde GFP chromosomal-kodiert und es besaß keine N-terminale *leader*-Sequenz. Wahrscheinlich wurde *gfpmut3* ausgehend vom Xylose-induzierbaren Promotor transkribiert, nicht aber in detektierbaren Mengen translatiert. Zur

Analyse der Transkription wurde eine *real time* PCR (2.18.4) durchgeführt und die Transkriptmenge der *gfpmut3* mRNA quantifiziert (Abb. 33).

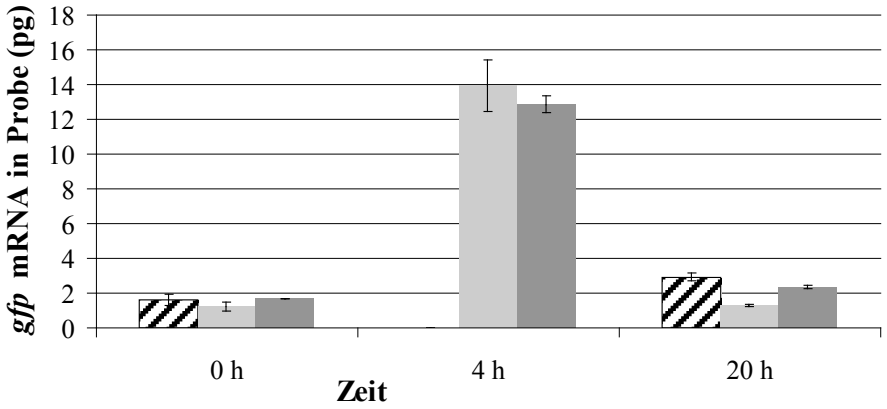


Abb. 33 Nachweis der Transkription von *gfpmut3* während der Expression in verschiedenen *B. subtilis* TEB1030-Stämmen. Unmittelbar vor (0 h) sowie 4 h und 20 h nach Induktion der Expression mit 1% (w/v) Xylose wurden Proben genommen, die mRNA isoliert und 240 ng als *template* in die reverse Transkription eingesetzt. In der RT-PCR wurde dann die cDNA als *template* verwendet. Als Primer dienten *gfp-fw* und *gfp-bw*. Die Abbildung stellt die unterschiedlichen RNA-Konzentrationen in den jeweiligen Proben da. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standard-Abweichung einer Doppelbestimmung. Schwarz schraffiert: *B. subtilis* TEB1030 pEBP18. Hellgrau: *B. subtilis* TEB1030 pEBP18_*lipA*. Dunkelgrau: *B. subtilis* TEB1030 pEBP18_*cut*. Die RNA-Konzentration zum Zeitpunkt 4 h von *B. subtilis* TEB1030 pEBP18_*lipA* wurde nicht bestimmt.

Vor der Induktion der Genexpression mit Xylose fand eine geringe Transkription statt, die wahrscheinlich eine Hintergrund-Aktivität widerspiegelt. Wie viele andere Operons im Kohlenstoff-Stoffwechsel unterliegt der Xylose-Promotor einer starken Katabolit-Repression und ist in Abwesenheit von Kohlenstoff-Quellen wie Glukose, Fruktose, Salicin etc. nicht komplett reprimiert [319]. Obwohl *B. subtilis* keine Xylose-spezifische Permease besitzt, kann Xylose langsam über AraE Proteine aufgenommen werden, und durch die Bindung an den XlyR Repressor und dessen Freisetzung vom Operator Genexpression induzieren [319, 320]. Somit war 4 h nach der Induktion die Menge an *gfpmut3* mRNA in *B. subtilis* TEB1030 pEBP18_*lipA* und pEBP18_*cut* ungefähr um den Faktor 10 erhöht. *B. subtilis* kodiert neben dem Xylose-Promotor von pEBP18 auch ein natürliches *xyl*-Operon und alle Proteine zum Abbau von Xylose [320-322], wodurch möglicherweise 20 h nach Induktion die Xylose komplett abgebaut war und die Transkription das Niveau vor der Induktion hatte. Es ist nicht optimal, wenn der Induktor durch den Wirt abgebaut werden kann und die Expression des natürlichen *xyl*-Operons belastet potentiell *B. subtilis* TEB1030 zusätzlich. Daher wäre die Verwendung eines Stamms, dessen *xyl*-Operon deletiert ist oder die Nutzung alternativer Promotoren denkbar, obwohl prinzipiell die Genexpression in *B. subtilis* TEB1030 pEBP18 und Derivaten mit Xylose induzierbar ist.

Die Aktivität der lipolytischen Proteine wurde über einen pNPB-Test sowohl im Ganzzellextrakt als auch im Überstand photometrisch bestimmt, wobei erwartungsgemäß keine Aktivität gemessen werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Cutinase wird ohne Signalpeptid typischerweise erst gar nicht in *B. subtilis* TEB1030 exprimiert [129]. LipA hingegen wird in *B. subtilis* TEB1030 zwar exprimiert und sekretiert, aber wenn die Expression in nährstoffreichem Medium, wie beispielsweise LB-Medium, stattfindet, ist LipA im Überstand inaktiv, möglicherweise durch die Reduzierung des pH-Werts des Mediums während der Kultivierung von pH 7 auf pH 5 bis pH 5,5. Findet die Expression allerdings in Minimal-Medium statt, kommt es zu keiner pH-Wert Veränderung und LipA verbleibt aktiv [141]. Ganzzellextrakt und Überstand wurde durch SDS-PAGE analysiert. Die Überexpression von Proteinen wurde nicht sichtbar (Ergebnis nicht dargestellt).

Die RT-PCR zeigte, dass der Xylose-abhängige Promotor in *B. subtilis* TEB1030 mit 1% (w/v) Xylose induziert wurde. Da die Gene der lipolytischen Proteine in die *Bam*HI-Schnittstelle von pEBP18 inseriert wurden und *gfpmut3* mRNA nachgewiesen werden konnte, muss polycistronisches Transkript gebildet worden sein. Das Experiment auf Tributyrin-Agar zeigte, dass LipA von *B. subtilis* TEB1030 pEBP18_*lipA* aktiv gebildet werden kann. Allerdings limitiert die Integration des Vektors ins *B. subtilis* Chromosom die Überexpression von Proteinen, wenn Toxizität des Genprodukts und Plasmid-Instabilität nicht berücksichtigt werden müssen [18, 44, 88, 245]. In solchen Fällen sind episomale Vektoren mit mittlerer oder hoher Kopienzahl, starken Promotoren und translationalen *leader*-Sequenzen zur Translation-Initiation oder Proteinsekretion für Überexpressionen sinnvoller und auch verfügbar [129, 188, 223, 317, 323, 324].

pEBP18 und Derivate integrierten über die partiellen Sequenzen des α-Amylasegens und doppelt-homologer Rekombination ins *B. subtilis* Chromosom. Der Xylose-abhängige Promotor ließ sich mit 1% (w/v) Xylose induzieren und die *Bacillus subtilis* Lipase A wurde aktiv in *B. subtilis* TEB1030 gebildet und über Tributyrin-Agar nachgewiesen.

3.3.5 Fazit

Der Shuttle-Vektor pEBP18 kodiert zwei induzierbare Promotoren *upstream* einer MCS. Er sollte daher in entsprechenden Stämmen als Expressionsplasmid verwendet werden können. Um dies zu untersuchen wurden die Gene der *Bacillus subtilis* Lipase A und der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* in korrekter Orientierung zu den Vektor-Promotoren in die MCS inseriert. *Downstream* der MCS war das Gen einer Fluoreszenz-optimierten

Variante von GFP kodiert, das als Transkriptionsreporter fungierte. Die Expression wurde in *E. coli* BL21 (DE3), *P. putida* KT2440T7 und *B. subtilis* TEB1030 untersucht.
In den beiden Gram-negativen Organismen wurde die Genexpression mit IPTG induziert, wobei die T7 RNA Polymerase-abhängigen Systeme erwartungsgemäß nicht komplett reprimiert waren. Nachweisbare Mengen von GFP und LipA wurden in beiden Wirten detektiert. Aktive Cutinase konnte nur in *E. coli* BL21 (DE3) nachgewiesen werden. In *B. subtilis* TEB1030 konnte die Genexpression mit Xylose induziert werden, wobei nur LipA nachweisbar war. Diese Analyse zeigte, dass die Modellproteine in verschiedenen Organismen unterschiedlich exprimiert wurden.

pEBP18 konnte in *E. coli* BL21 (DE3), *P. putida* KT2440T7 und *B. subtilis* TEB1030 als Expressionsplasmid verwendet werden. Die Genexpression war in allen drei Organismen über Vektor-kodierte Promotoren induzierbar. Die Annahme, dass die Synthese von unterschiedlichen Proteinen in verschiedenen bakteriellen Wirten variiert, bestätigte sich.

3.4 Metagenom-Analyse des Habitats ‚Schlachthof'

Wird eine Probe in einem Habitat entnommen und die mikrobielle Population, durch Plattierung serieller Verdünnung auf Agarplatten und durch Mikroskopie, analysiert, fällt auf, dass nur ein Bruchteil der Organismen (< 1%) kultivierbar ist. Dies wird im Allgemeinen als *great plate count anomaly* beschrieben [36]. Oft ist nur wenig über die Gene, Genome und enzymatischen Aktivitäten der unkultivierbaren Organismen bekannt [40, 43], wobei rDNA Sequenzanalysen oder die *shotgun* Sequenzierung ganzer mikrobieller Gemeinschaften verknüpft mit wirkungsvollen Algorithmen [64, 67, 83, 84, 325] maßgeblich zum Verständnis beigetragen haben [40, 45, 81]. Metagenom-Analysen können unterschiedlichste Fragestellungen haben, und dienen u.a. der Identifizierung von funktionellen Genen, der Analyse mikrobieller Diversität, dem Verständnis der Populationsdynamik einer Gemeinschaft oder der Rekonstruktion kompletter Genome unkultivierbarer Organismen [52, 64, 326-328].
Im Fokus dieser Arbeit stand die Identifizierung von Enzyme mit hydrolytischer Aktivität, wobei die heterologe DNA in pEBP18 inseriert und funktionsbasiert in *E. coli*, *P. putida* und *B. subtilis* analysiert werden sollte. Der Erfolg eines aktivitätsbasierten Screenings wird neben der Promotorerkennung und Synthese von mRNA im heterologen Wirt auch von einer aktiven Konformation des Biokatalysators und einem leistungsfähigen Assay zu dessen Nachweis bestimmt. Auch die Abundanz der Gene beeinflusst die

Detektionsfrequenz, denn je mehr unterschiedliche Zielgene durch das Metagenom kodiert werden, desto höher ist die Chance einen aktiven Klon in einem funktionsbasierten Screening einer Genbank zu identifizieren [58, 61, 69, 71, 72]. Die Wahrscheinlichkeit Organismen mit hydrolytischer Aktivität in einem Schlachthof zu finden, ist potentiell hoch, da dort das Nährstoffangebot aus Blut, Fetten, Fleisch-, Haut- und Haarabfällen besteht. Es handelt sich sozusagen um ein ‚natürlich angereichertes' Habitat.

3.4.1 Probennahme und Beschreibung

Die Probennahme erfolgte in einem Fleisch-verarbeitenden Betrieb (2.10.1) vor der täglichen Reinigung und Desinfektion. Insgesamt wurden vier Proben aus Räumen der Schweineschlachtung und zwei Proben aus Räumen der Rinderschlachtung entnommen (Tab. 16).

Tab. 16 Übersicht über die entnommenen Proben in den Räumen der Frenken Vieh- und Fleisch GmbH.

Ort der Probennahme	Art der Probe	Bezeichnung
Schweineschlachtung, Bodenabflusssieb	Flüssigkeit	P1
Schweineschlachtung, Bodenabflusssieb	Feststoff mit Flüssigkeit	P2
Schweineschlachtung, Abfluss ‚Blut'	Flüssigkeit	P3
Schweineschlachtung, Abfluss ‚Blut'	Feststoff (Biofilm)	P4
Zerlegung Rind, Bodenabflusssieb	Flüssigkeit	P5
Zerlegung Rind, Bodenabflusssieb	Feststoff (Biofilm)	P6

Nach der Entnahme wurden die Proben aufgearbeitet (2.10.2). Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation in Überstand und Pellet separiert. Die Überstände wurden direkt mikroskopiert, während feste Proben und die Zellpellets zuerst in Ringerlösung resuspendiert wurden. Anschließend wurde die Morphologie der Organismen unter dem Mikroskop bei Phasenkontrast dokumentiert (2.1, 2.11). Exemplarisch sind im nachfolgenden Abschnitt einige Bilder dargestellt. Da aus den Proben mehrere Mikrogramm DNA zur Konstruktion von Genbanken isoliert werden sollten, musste eine gewisse Zellmasse vorhanden sein. Daher wurden die Proben visuell beurteilt, ob sie überhaupt zur DNA Isolierung geeignet waren.

3.4.1.1 Probe P1

Nach der Aufarbeitung bildete Probe P1 einen rot-gefärbten Überstand und ein rötliches Pellet. Generell war die Zelldichte sehr gering. Es waren einige tierische Zellen und

Verunreinigungen, aber nur sehr wenige Bakterien, unter dem Mikroskop erkennbar (nicht dargestellt). Die Probe eignete sich nicht zur DNA Isolierung.

3.4.1.2 Probe P2

Probe P2 bestand nach der Aufarbeitung aus einem bröckeligen, rot-gefärbten Überstand und einem bräunlich-gefärbten Pellet. Vor allem große, bewegliche Spirillen waren erkennbar sowie einige wenige Kokken und Stäbchen (Abb. 34).

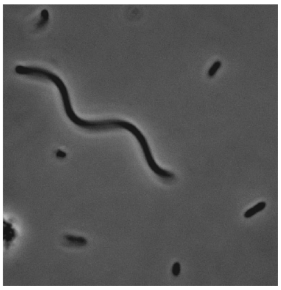


Abb. 34 Mikroskopische Darstellung von Zellen aus Probe P2. Die Organismen aus Probe P2 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Spirillen sind Gram-negative, helikale und polar-begeißelte Proteobakterien [1, 269, 270, 329], die typischerweise aus Graben- oder Kanalwasser, Teichen und Tümpeln isoliert werden können. Spirillen siedeln sich aber auch in Pferde- und Schweinemist an [330], wobei sie weniger aus frischen Tierexkrementen stammen, sondern in solchen nachzuweisen sind, die schon einige Zeit mit dem Stallboden in Kontakt waren [330]. Da Spirillen leicht von anderen Bakterien wie Pseudomonaden und Vibrios überwachsen werden [330], sind die Spirillen in Probe P2 wahrscheinlich nicht über einen längeren Zeitraum im Abfluss gewachsen und haben sich nicht an die Lebensbedingungen angepasst. Sie stammen tendenziell eher aus Mist aus dem Schweinestall, der am Morgen von den Schweinen eingetragen wurde. Dafür spricht auch, dass bei der täglichen Reinigung der Abfluss gründlich durchgespült und planktonische Zellen ausgewaschen und von Desinfektionsmitteln abgetötet werden [331, 332]. Obwohl die Zelldichte in Probe P2 für DNA Isolierungen für Genbanken ausreichend wäre, sollte die Isolierung eher aus einer Probe erfolgen, deren Mirkoorganismen sich an das Habitat ‚Schlachthof" angepasst haben.

3.4.1.3 Probe P3

Nach der Aufarbeitung wurde aus Probe P3 ein tiefrot-gefärbter Überstand und ein rötliches Pellet gewonnen. Neben einigen tierischen Zellen waren unter dem Mikroskop vor allem Stäbchen, einzeln oder als Paar, sowie einige Kokken und Streptokokken erkennbar. Die Bakterien waren sehr beweglich und die Dokumentation konnte erst nach

Zugabe von Essigsäure erfolgen (Abb. 35). Die Zelldichte in der Probe war gering, allerdings etwas höher als in Probe P1 oder P5.

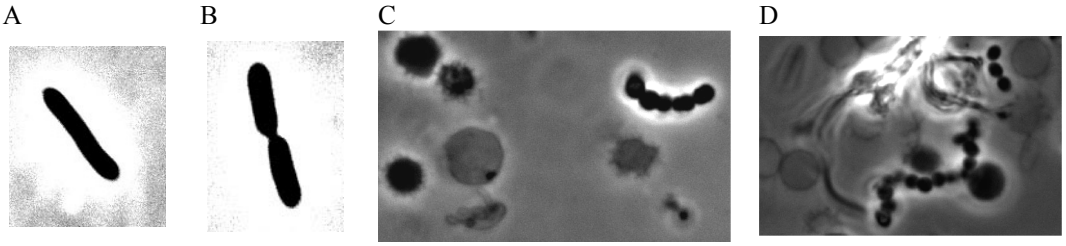


Abb. 35 Mikroskopische Darstellungen von Zellen aus Probe P3. Die Zellen aus Probe P3 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*. A: Stäbchen. B: Doppelstäbchen. C, D: tierische Zellen und Streptokokken.

3.4.1.4 Probe P4

An der Unterseite der Abdeckung des Blutabflusses in einem Raum der Schweineschlachtung befand sich ein Feststoff, der mit einem Spatel abgekratzt wurde und die Probe P4 bildete. Die Zelldichte in Probe P4 war hoch und die Bakterien waren sehr beweglich. Neben einigen Stäbchen wurde die Probe von Kokken oder Kurzstäbchen dominiert. Wenige tierische Zellen wurden isoliert.

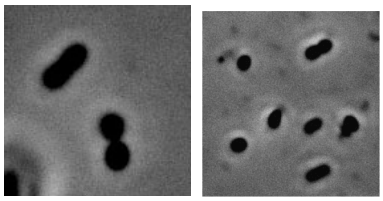


Abb. 36 Mikroskopische Darstellungen von Zellen aus Probe P4. Die Bakterien aus Probe P4 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*. Dargestellt sind Stäbchen und Kokken.

Bei den Bakterien aus Probe P4 handelte es sich höchstwahrscheinlich um Zellen eines Biofilms. Biofilme bestehen aus einer mikrobiellen Gemeinschaft an einer wässrigen Grenzfläche und einer sie umhüllenden Schleimmatrix, auch extrazelluläre, polymere Substanz oder Exopolysaccharid (EPS) genannt [332]. Charakteristisch für Biofilme sind das extrem langsame und heterogene Wachstum der Bakterien, sowie deren Unempfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Desinfektionsmitteln [332-334]. Vermutlich ist daher der Biofilm über einen längeren Zeitraum entstanden und die adhärierenden Zellen haben sich an die Umweltbedingungen angepasst. Somit sollte Probe P4 hervorragend geeignet sein, um DNA für Metagenombanken zu isolieren.

3.4.1.5 Probe P5

Probe P5 bildete nach der Aufarbeitung einen rot-gefärbten Überstand und ein rötliches Pellet. Generell war die Zelldichte sehr gering, nur wenige Stäbchen, einzeln oder als Paar, oder Kokken und Haufenkokken waren erkennbar (nicht dargestellt).

3.4.1.6 Probe P6

Aus dem Abflusssieb des Bodenabflusses eines Raums der Rinderzerlegung wurde ein Feststoff abgekratzt. Die Zelldichte in Probe P6 war hoch und die Bakterien waren sehr beweglich. Neben einigen tierischen Zellen waren vor allem Kokken, einzeln oder als Paar, sowie einige Stäbchen und Doppelstäbchen erkennbar.

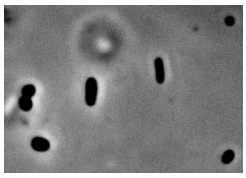


Abb. 37 Mikroskopische Darstellungen von Zellen aus Probe P6. Die Zellen aus Probe P6 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*. Dargestellt sind Stäbchen und Kokken.

Bei den isolierten Bakterien handelte es sich wahrscheinlich, genau wie bei den Bakterien aus Probe P4, um Zellen eines Biofilms, der über einen längeren Zeitraum entstanden war und dessen mikrobielle Gemeinschaft sich tendenziell an die Umweltbedingungen angepasst hatte. Die Zellen wurden direkt aus dem Abflusssieb des Bodenabflusses isoliert und die Bakterien waren täglich längere Zeit den Desinfektionsmitteln ausgesetzt. Obwohl adhärierende Zellen eines Biofilms als relativ unempfindlich gegenüber Desinfektionsmitteln beschrieben sind [335-337], erstaunte ihre hohe Vitalität. Probe P6 eignete sich, um DNA für Metagenombanken zu isolieren.

Aus den Räumen des Schlachthofs (Frenken Vieh- und Fleisch GmbH), bzw. aus Bodenabflüssen und -abflusssieben, konnten insgesamt sechs Proben isoliert werden. Nach der Aufarbeitung wurden die Proben mikroskopiert. Sie unterschieden sich neben der Zelldichte auch in der Morphologie der Mikroorganismen. Neben tierischen Zellen wurden Stäbchen und Kokken, einzeln oder als Paar, Streptokokken und Spirillen sichtbar. Da aus den Proben DNA zur Konstruktion von Genbanken isoliert werden sollte, sollte genug Ausgangsmaterial (Zellen) vorhanden sein. Nach mikroskopischer Beurteilung waren Probe P4 und P6 am Besten zur DNA Isolierung geeignet. Beide Proben bestanden aus einem bakteriellen Biofilm.

3.4.2 Anreicherung von kultivierbaren Organismen

Aus allen Proben wurden die kultivierbaren Organismen, sowohl in Flüssigkultur als auch auf Platte, angereichert.

3.4.2.1 Anreicherung von kultivierbaren Organismen in Flüssigkultur

Die Anreicherung in Flüssigkultur (2.10.3) erfolgte nach der Aufarbeitung der Proben (2.10.2). SHGB-Medium mit Olivenöl wurde mit dem Überstand der flüssigen Proben oder

etwas Zellpellet inokuliert und bei RT ohne Schütteln für 36 h inkubiert. Zusätzlich wurde etwas Überstand der flüssigen Proben ohne Zugabe von Medium unter gleichen Bedingungen kultiviert. Aus allen Proben ließen sich Organismen anreichern, erkennbar durch die zunehmende Trübung der Medien. Beispielhaft sind im nachfolgenden Abschnitt drei Anreicherungskulturen dargestellt (Abb. 38), die jeweils mit etwas Feststoff der Proben P3, P4 und P6 inokuliert wurden.

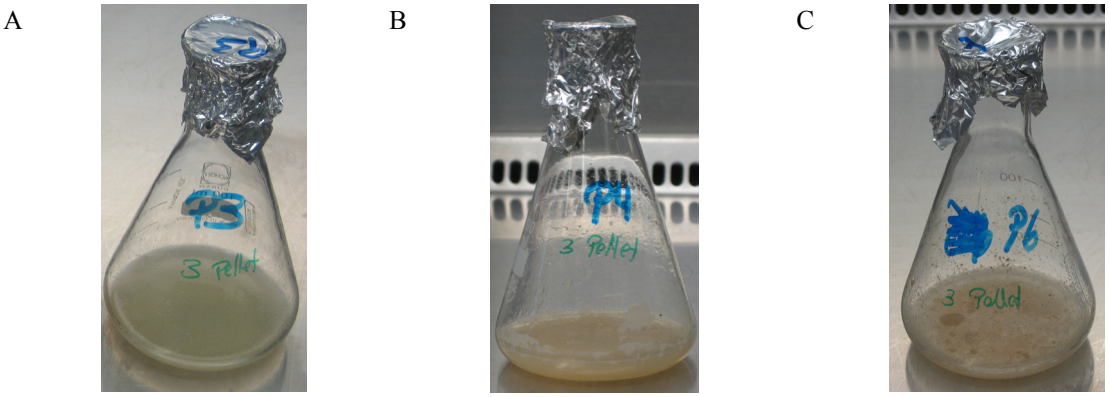


Abb. 38 Anreicherung von kultivierbaren Organismen aus Probe P3, P4 und P6 in Flüssigkultur. SHGB-Medium mit Olivenöl wurde mit etwas Feststoff aus Probe P3 (A), P4 (B) und P6 (C) nach deren Aufarbeitung inokuliert und für 36 h ohne Schütteln bei RT inkubiert.

Die Anreicherungskultur, welche mit etwas Feststoff aus Probe P3 inokuliert wurde, war gelblich-gefärbt und mit $OD_{600} = 2{,}8$ nur mäßig getrübt. Das Medium war homogen bewachsen. Auf der Oberfläche schwamm keine Kahmhaut. Die Anreicherungskultur von Probe P4 hingegen war mit $OD_{600} = 13{,}9$ stark bewachsen. Das Medium war gleichmäßig getrübt und auf dessen Oberfläche schwamm eine Kahmhaut, die sich auch an der Gefäßwand absetzte. Dieser Biofilm war sehr stabil und ließ sich durch Schwenken der Kultur weder zerstören noch von der Gefäßwand ablösen. Es schien eher, als würde sich der Biofilm durch das Schwenken an der Gefäßwand festsetzen. Von *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen ist bekannt, dass die Komposition des Lipopolysaccharids die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion an hydrophobe und hydrophile Oberflächen beeinflusst [338, 339]. Es wäre möglich, dass der Biofilm, der auf der Oberfläche der Kultur entstanden war, eine stärkere Präferenz zur Adhäsion an die Oberfläche des Silikaglases hatte und sich nach Kontakt mit der Glaswand dort anheftete. Die Anreicherungskultur aus Probe P6 war heterogen. Das Medium war nicht gleichmäßig getrübt und die Organismen aggregierten zu ‚Flocken'. Auf der Oberfläche schwamm ein Biofilm. Im Gegensatz zur Anreicherungskultur aus Probe P4 war der Biofilm nur schwach ausgeprägt. Die Trübung der Kultur ($OD_{600} = 10{,}6$) konnte aufgrund der Feststoffe nicht exakt bestimmt werden.

Nach der Kryokonservierung eines Aliquots jeder Flüssigkultur wurden die Zellen pelletiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Aus allen Proben konnten Mikroorganismen angereichert und Zellmaterial zur DNA Isolierung gewonnen werden. Der prozentuale Anteil der kultivierbaren Organismen wurde nicht bestimmt. Wahrscheinlich handelte es sich nur um einen Bruchteil der Biodiversität.

3.4.2.2 Anreicherung von kultivierbaren Organismen als Plattenkultur

Nach der Aufarbeitung der Proben (2.10.2), wurden diese seriell verdünnt und ein Aliquot jeder Verdünnungsstufe auf SHGB-Agar ausplattiert und für 10 Tage bei RT inkubiert (2.10.4). Die Platten wurden täglich kontrolliert und Kolonien mit unterschiedlicher Morphologie wurden vereinzelt (3.4.2.3). Exemplarisch sind zwei Plattenkulturen abgebildet (Abb. 39).

A B

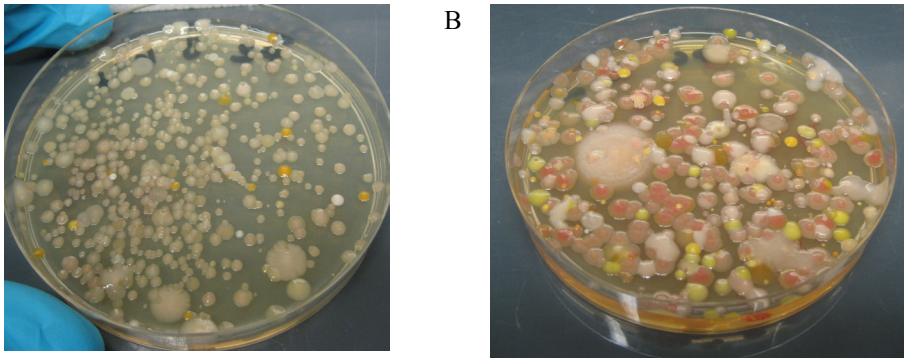


Abb. 39 Anreicherung von kultivierbaren Organismen des Schlachthofs als Plattenkulturen. Die Proben wurden seriell verdünnt und Aliquots verschiedener Verdünnungsstufen wurden auf SHGB-Medium ausplattiert und bei RT inkubiert. A: 100 µL Überstand von Probe P2 (10^{-2} verdünnt) nach vier Tagen Inkubation. B: 100 µL Probe P6 (10^{-5} verdünnt) nach acht Tagen Inkubation.

Neben einigen Schimmelpilzen, erkennbar an ihrem typischen Myzel, wurden Kolonien mit einem glatten oder gewellten Rand isoliert, die flach bis erhaben und oft feucht oder ‚schleimig' waren. Generell waren die Kolonien nur schwach bis mäßig pigmentiert, wobei die Pigmentierung erst mit zunehmender Kultivierungsdauer sichtbar wurde. Neben einigen weißen Kolonien, waren gelbliche, orange oder rötliche Färbungen erkennbar, wobei unpigmentierte Kolonien dominierten. Die Pigmentierung eines Organismus ist charakteristisch und kann sogar zu dessen Identifizierung verwendet werden [340]. Oft stehen Pigmentierung und Virulenz miteinander in Verbindung, und der Verlust der Pigmentierung von pathogenen *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen führte in den verwendeten Infektionsmodellen zu einer abgeschwächten Virulenz [340]. Pigmente können die Zelle außerdem vor UV-Strahlung [341], Oxidantien [342], extremer Hitze oder Kälte [343] oder mikrobiellen Substanzen [344], die von anderen

Organismen produziert werden, schützen, oder sie haben selbst antimikrobielle Aktivität [345]. Außerdem können Pigmente zur Aufnahme von Nährstoffen, wie z.B. Eisen [346], oder Energie in Form von Photosynthese [347, 348], dienen. Da die Organismen aus Bodenabflüssen in den Räumen des Schlachthofs isoliert wurden und weder Tageslicht oder extremer Hitze bzw. Kälte ausgesetzt waren, noch in Interaktion mit einem Wirt standen, ist die schwache Pigmentierung vieler Isolate nicht ungewöhnlich. Allerdings ist die Pigmentierung einiger Isolate sowie die ‚Schleimbildung' ein Hinweis auf potentielle Pathogenität.

Aus jeder Probe konnten Organismen angereichert werden. Neben einigen Schimmelpilzen wurden schwach- bis mäßig-pigmentierte Kolonien auf den Platten sichtbar. Kolonien mit weißer, gelblicher, oranger oder rötlicher Färbung waren erkennbar, wobei unpigmentierte Kolonien dominierten.

3.4.2.3 Vereinzelung der kultivierbaren Organismen der Plattenkulturen

Mindestens ein Isolat mit einzigartiger Morphologie, ausgewählt über Pigmentierung, Kolonieform und ‚Schleimbildung', wurde über drei fraktionierte Ausstriche vereinzelt (2.10.4). Zusätzlich wurde die hydrolytische Aktivität über Kultivierung auf Tributyrin-Agar und *skim milk*-Platten dokumentiert. Anschließend wurden die Organismen in Flüssigkulturen angezogen und mikroskopiert (2.11). Außerdem wurde deren ribosomale DNA analysiert (2.22) und ein Stammbaum zur phylogenetischen Klassifizierung erstellt [214]. Anhand der 16S rDNA wurden Isolate mit nahezu identischen Sequenzen (weniger als 1% Unterschied) in *Operational Taxonomic Units* (OTUs) zusammengefasst. In nachfolgenden Abschnitt werden die OTUs näher beschrieben.

Die erste *Operational Taxonomic Unit* (OTU 1) bestand aus sonnengelb-gefärbten Organismen, die in runden Kolonien mit einem glatten Rand wuchsen. Sie waren feucht und erhaben (Abb. 40, A). Mit zunehmender Kultivierungsdauer spreizte sich der Rand leicht auf, wobei dieser weniger stark pigmentiert war als das Zentrum der Kolonie (Abb. 40, B). Die Kolonien bildeten keine Hydrolysehöfe auf Tributyrin-Agar, zeigten jedoch teilweise kleine Hydrolysehöfe auf *skim milk*-Platten. Vielleicht handelte es sich um verschiedene Bakterienstämme. Unter dem Mikroskop waren bewegliche Stäbchen erkennbar, die ~ 0,5 *x* 2 µm groß waren (Abb. 40, C).

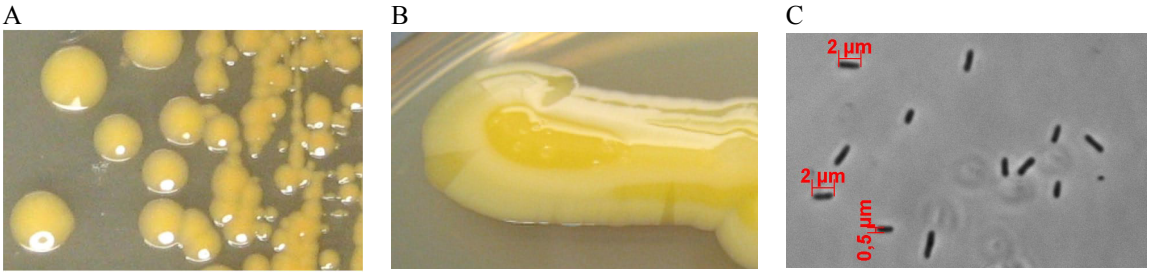


Abb. 40 ***Operational Taxonomic Unit* 1.** Fraktionierter Ausstrich von Kolonien von OTU 1 nach viertägiger (A) und nach 20-tägiger Inkubation (B) bei RT. C: Die Organismen aus OTU 1 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

OTU 2 bestand aus unpigmentierten Kolonien mit einen gewellten Rand (Abb. 41, A und B). Sie waren flach und feucht. Mit zunehmender Kultivierungsdauer sonderten sie in den Agar ein orange- bis braun-gefärbtes Pigment ab. Außerdem entwickelten sie einen unangenehmen, in der Nase beißenden, Geruch. Die Isolate bildeten teilweise Hydrolysehöfe auf Tributyrin-Agar. Unter dem Mikroskop waren bewegliche Kokken, einzeln oder als Paar, erkennbar, die einen Durchmesser von ca. 1 µm hatten (Abb. 41, C).

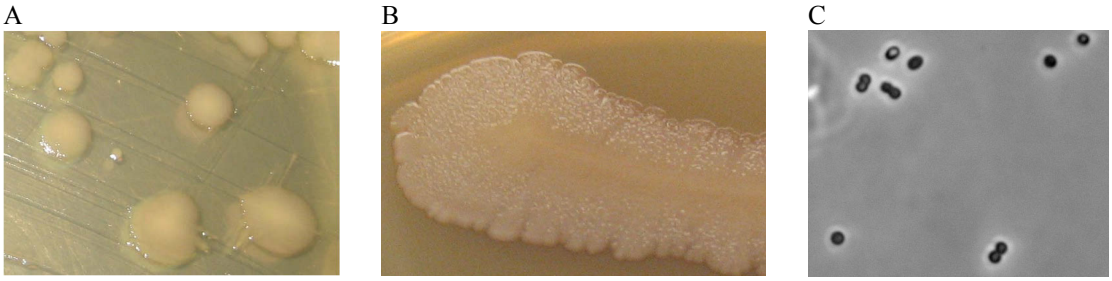


Abb. 41 ***Operational Taxonomic Unit* 2.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen aus OTU 2 nach viertägiger (A) und nach 20-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 2 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

OTU 3 bestand aus Kolonien, die rosa-gefärbt waren (Abb. 42, A und B). Sie hatten einen glatten Rand, waren feucht und erhaben. Die Isolate hatten schwache hydrolytische Aktivität auf *skim milk*-Agar. Unter dem Mikroskop waren vor allem Stäbchen (0,5 *x* 1,8 µm) erkennbar (Abb. 42, C). Allerdings waren die Präparate oft mit Kokken kontaminiert und es konnten selten Reinkulturen gewonnen werden.

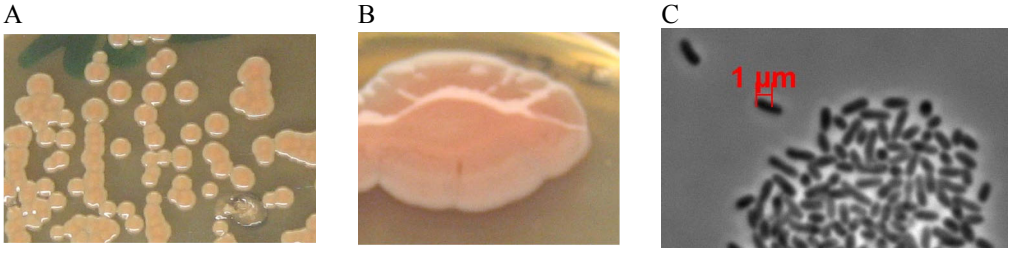


Abb. 42 ***Operational Taxonomic Unit* 3.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen aus OTU 3 nach viertägiger (A) und nach 19-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen aus OTU 3 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Flache und unpigmentierte Kolonien mit gewelltem Rand wurden in OTU 4 (Abb. 43, A und B) zusammengefasst, die mit zunehmender Kultivierungsdauer einen in der Nase stechenden Geruch entwickelten. Organismen aus OTU 4 bildeten keine Hydrolysehöfe. Unter dem Mikroskop waren Stäbchen (1 *x* 2-3 µm), teilweise als Paar oder in Viererketten, erkennbar (Abb. 43, C).

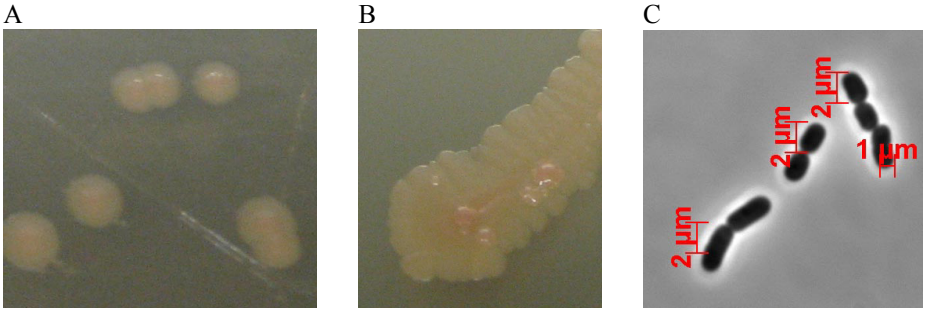


Abb. 43 ***Operational Taxonomic Unit* 4.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen aus OTU 4 nach fünftägiger (A) und nach 21-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen aus OTU 4 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

OTU 5 bestand aus eher flachen und unpigmentierten Kolonien mit einem gewellten Rand (Abb. 44, A und B). Da Plattenkulturen in Petrischalen typischerweise auf den Plattendeckel umgedreht wurden und OTU 5 massiv ein orange-gefärbtes Sekret absonderte, tropfte dieses auf den Plattendeckel (Abb. 44, C). Das Isolat roch süßlich, aber nicht unangenehm, und hydrolysierte weder Casein noch Tributyrin. Unter dem Mikroskop waren Kokken, i.d.R. einzeln oder als Paar, mit einem Durchmesser von 1 µm erkennbar. Das Präparat war mit Stäbchen (1 *x* 1,5-2 µm oder größer) kontaminiert (Abb. 44, D und E).

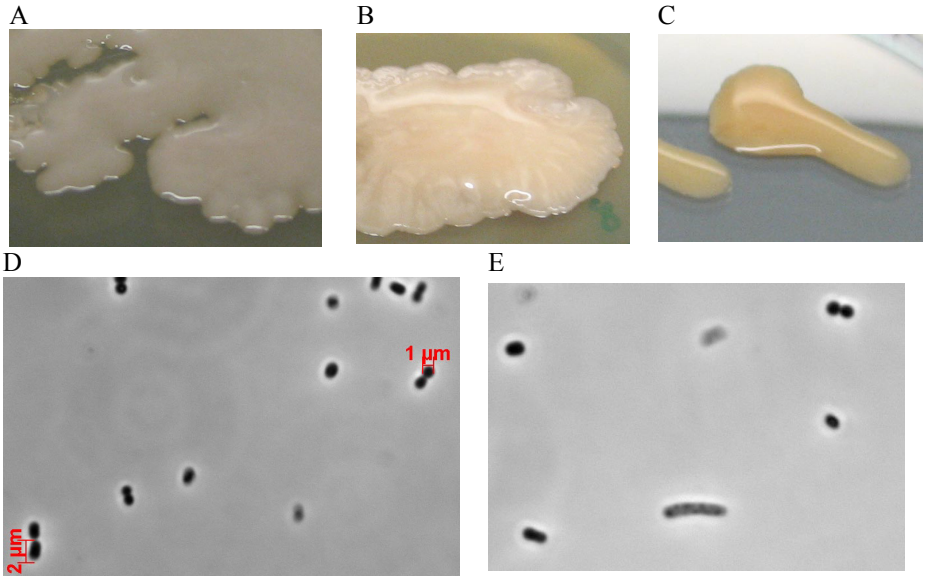


Abb. 44 ***Operational Taxonomic Unit* 5.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen aus OTU 5 nach fünftägiger (A) und nach 21-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Sekretabsonderung von OTU 5 auf dem Plattendeckel. D, E: Zellen von OTU 5 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Erhabene, runde und orange-pigmentierte Kolonien bildeten OTU 6 (Abb. 45, A und B). Sie waren feucht und mit zunehmender Kultivierungsdauer spreizte sich der Rand auf. Die Kolonien von OTU 6 bildeten keine Hydrolysehöfe auf Tributyrin-Agar, jedoch auf *skim milk*-Platten. Unter dem Mikroskop waren Stäbchen (0,5 *x* 2 µm) erkennbar (Abb. 45, C). Außerdem befanden sich größere Stäbchen im Präparat, wobei nicht zu erkennen war, ob es sich um Doppelstäbchen oder um eine Kontamination handelte (Abb. 45, D).

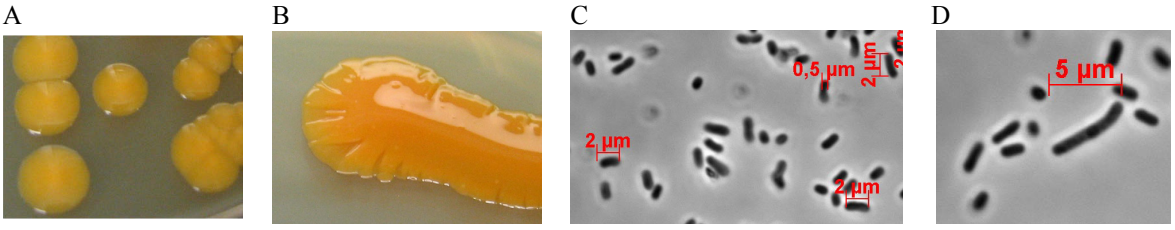


Abb. 45 ***Operational Taxonomic Unit* 6.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 6 nach fünftägiger (A) und nach 22-tägiger (B) Inkubation bei RT. C, D: Zellen aus OTU 6 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

OTU 7 bestand aus extrem ‚schleimigen' und unpigmentierten Kolonien, die ein gelb-gefärbtes Pigment in den Agar absonderten (Abb. 46, A und B) und mit zunehmender Kultivierungsdauer eine ‚rötliche' Färbung im Zentrum annahmen. Da die Petrischale während der Kultivierung auf den Plattendeckel umgedreht worden war und das Isolat massiv Sekret absonderte, tropfte dieses auf den Plattendeckel (Abb. 46, C). Außerdem roch das Isolat süßlich und unangenehm. Die Kolonien bildeten sowohl auf *skim milk*-Platten als auch auf Tributyrin-Agar Hydrolysehöfe. Unter dem Mikroskop waren

unbewegliche Stäbchen, einzeln oder als Paar, sichtbar, wobei die Zellen das Licht unterschiedlich brachen (Abb. 46, D). Es war nicht zu erkennen, ob es sich um eine Kontamination oder um Sporen handelte.

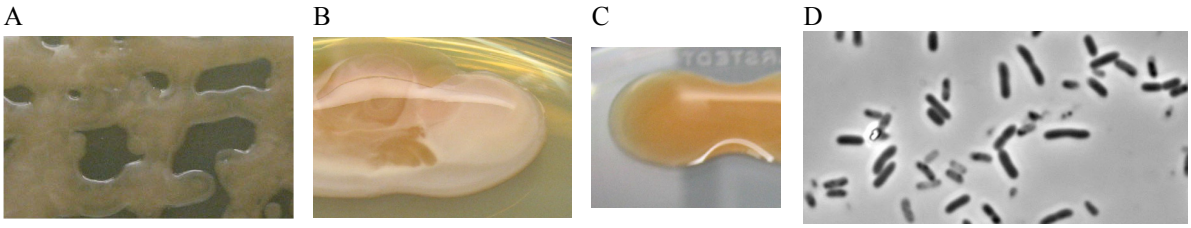


Abb. 46 ***Operational Taxonomic Unit* 7.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 7 nach fünftägiger (A) und nach 22-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Abgesondertes und auf den Plattendeckel getropftes Sekret nach 22-tägiger Inkubation von Zellen von OTU 7 bei RT. D: Zellen von OTU 7 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Isolate der *Operational Taxonomic Unit* 8 ähnelten sehr stark Kolonien von OTU 1. Die Isolate hydrolysierten weder Casein noch Tributyrin.

Unpigmentierte Kolonien mit glattem Rand bildeten OTU 9 (Abb. 47, A und B). Sie waren feucht, erhaben und rochen unangenehm. Die Kolonien bildeten nur auf *skim milk*-Platten Hydrolysehöfe. Unter dem Mikroskop waren bewegliche Stäbchen (1 *x* 2-3 µm), einzeln oder als Paar, sichtbar, wobei die Zellen das Licht unterschiedlich brachen (Abb. 47, C). Es war nicht zu erkennen, ob es sich um eine Kontamination oder um Sporen handelte.

Abb. 47 ***Operational Taxonomic Unit* 9.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 9 nach fünftägiger (A) und nach 23-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 9 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Die Kolonien von OTU 10 waren kalkweiß, rund und erhaben mit glattem Rand (Abb. 48, A und B). Sie waren trocken und entwickelten einen süßlichen, unangenehmen Geruch. Die Kolonien bildeten keine Hydrolysehöfe. Unter dem Mikroskop waren unbewegliche, große Zellen (2 *x* 5 µm) erkennbar (Abb. 48, C). Über eine 18S rRNA Analyse konnten die Organismen der Familie *Saccharomycetaceae* (Phylum: *Ascomycota*, Reich: *Fungi*) zugeordnet werden. Die nächste Verwandtschaft bestand zu den Hefen *Candida pseudolambica* str. NRRL Y-17318 (EF550373) und *Pichia jaroonii* AB436770 [214].

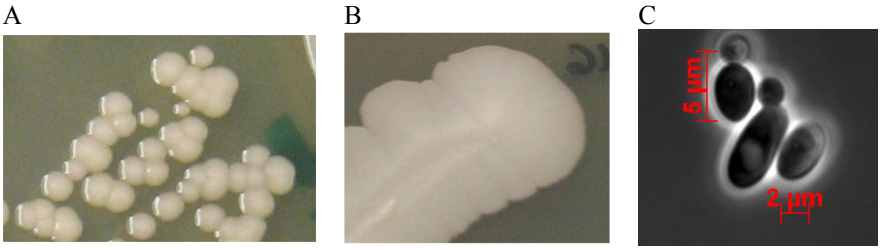


Abb. 48 ***Operational Taxonomic Unit* 10.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 10 nach viertägiger (A) und nach 20-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 10 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Unpigmentierte, platte Kolonien wurden in OTU 11 zusammengefasst (Abb. 49, A und B). Sie waren trocken und bildeten eine ‚blumenartige' Struktur aus. Die Kolonien hatten keine hydrolytische Aktivität. Unter dem Mikroskop waren sehr bewegliche Stäbchen (0,5 *x* 2 µm) zu erkennen, wobei die Zellen teilweise das Licht an den Zellpolen anders brachen als im Zellinneren (Abb. 49, C).

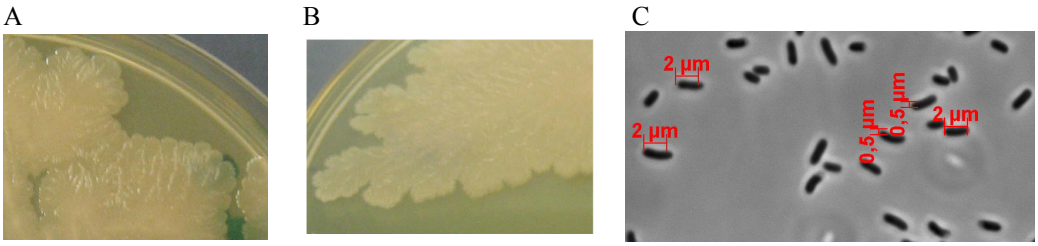


Abb. 49 ***Operational Taxonomic Unit* 11.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 11 nach viertägiger (A) und nach 23-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 11 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Unpigmentierte bis leicht orange-gefärbte Kolonien, die ein gelb-gefärbtes Pigment absonderten und unangenehm rochen, wurden in OTU 12 zusammengefasst (Abb. 50, A und B). Sie waren feucht, ‚schleimig' und bildeten keine Hydrolysehöfe. Unter dem Mikroskop waren sehr bewegliche Stäbchen, einzeln oder als Paar, zu erkennen. Die Zellen brachen das Licht an den Polen teilweise anders als im Zellinneren (Abb. 50, C).

Abb. 50 ***Operational Taxonomic Unit* 12.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 12 nach fünftägiger (A) und nach 22-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 12 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Isolate von OTU 13 ähnelten sehr stark Kolonien aus OTU 6, wobei manche Isolate Casein hydrolysierten.

Unpigmentierte, feuchte und erhabene Kolonien mit einem gewellten Rand bildeten OTU 14 (Abb. 51, A und B). Sie bildeten auf Tributyrin-Agar einen großen und auf *skim milk*-Agar einen extrem großen Hydrolysehof. Mit zunehmender Kultivierungsdauer rochen sie süßlich und unangenehm. Unter dem Mikroskop waren sehr bewegliche Stäbchen, einzeln oder als Paar, zu erkennen, die eine Größe von 1 *x* 2 µm hatten (Abb. 51, C).

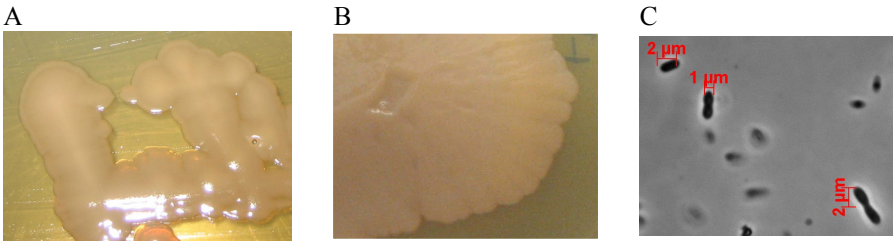


Abb. 51 ***Operational Taxonomic Unit* 14.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 14 nach achttägiger Inkubation (A) und nach 23-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 14 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Unpigmentierte, erhabene Kolonien, deren Rand gewellt war und die Ausläufer eher platt, wurden in OTU 15 zusammengefasst (Abb. 52, A und B). Die Kolonien waren feucht, ‚schleimig' und rochen unangenehm (beißend). Die Kolonien bildeten sowohl auf *skim milk*-Platten als auch auf Tributyrin-Agar Hydrolysehöfe. Unter dem Mikroskop waren unbewegliche Stäbchen (0,5 *x* 2 µm) erkennbar, die mit einigen sehr großen Stäbchen kontaminiert waren (Abb. 52, C).

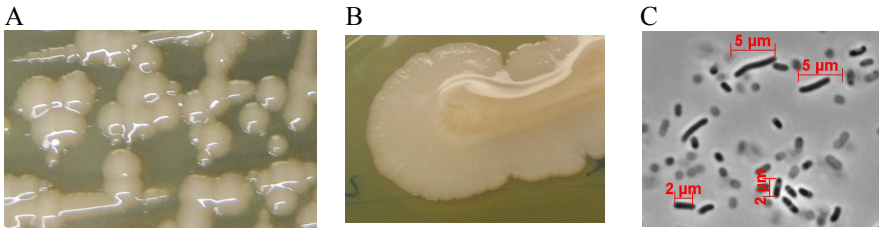


Abb. 52 ***Operational Taxonomic Unit* 15.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 15 nach achttägiger (A) und nach 23-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 15 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Orange-gefärbte Kolonien mit einem erhabenen Zentrum und flachen, gewellten Ausläufern bildeten OTU 16 (Abb. 53, A und B). Die Kolonien waren trocken und hydrolysierten nur Tributyrin. Sie waren von fester Konsistenz und die Zellen ließen sich nur schlecht in Ringerlösung suspendieren. Unter dem Mikroskop waren bewegliche

Stäbchen (1 *x* 2-3 µm) erkennbar, die an den Polen das Licht anders brachen als im Zentrum (Abb. 53, C).

Abb. 53 ***Operational Taxonomic Unit* 16.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 16 nach sechstägiger und nach 22-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 16 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

OTU 17 bestand aus zunächst unpigmentierten, feuchten Kolonien mit glatten Rand, die mit zunehmender Kultivierungsdauer eine ‚rosa' Färbung entwickelten, wobei der Rand weniger stark pigmentiert war als deren Zentrum (Abb. 54, A und B). Die Kolonien zeigten keine hydrolytische Aktivität. Unter dem Mikroskop waren bewegliche Stäbchen (1 *x* 1-2 µm) erkennbar, die teilweise an den Polen das Licht anders brachen als im Zentrum (Abb. 54, C).

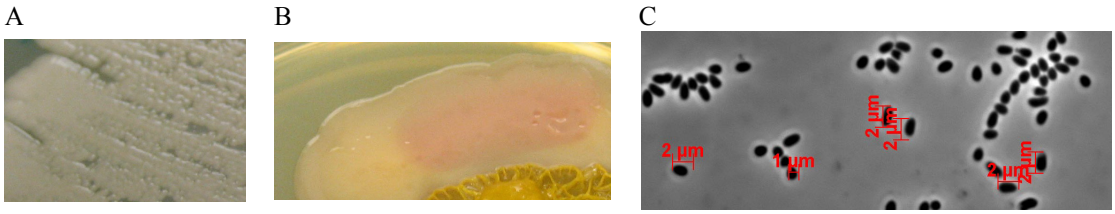


Abb. 54 ***Operational Taxonomic Unit* 17.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 17 nach sechstägiger (A) und nach 22-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 17 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Zu OTU 18 wurden Isolate zusammengefasst, die unpigmentiert waren und ‚schleimig'. Das Zentrum war erhaben, der Rand jedoch eher flach und gewellt (Abb. 55, A und B). Bei Plattierung auf *skim milk*-Agar und Tributyrin-Agar fand keine Hydrolyse statt. Unter dem Mikroskop waren Stäbchen (0,5 *x* 2 µm) erkennbar (Abb. 55, C).

Abb. 55 ***Operational Taxonomic Unit* 18.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 18 nach achttägiger und nach 23-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 18 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Ein unpigmentiertes Isolat, das platte, fast durchsichtige Ausläufer hatte, während das Zentrum leicht erhöht und gewellt war und eine scharfe Abgrenzung erzeugte, bildete OTU 19 (Abb. 56, A und B). Es roch extrem unangenehm und Hydrolysehöfe traten nur bei der Plattierung auf *skim milk*-Agar auf. Nach dem Suspendieren der Zellen war die Lösung viskös und unter dem Mikroskop waren bewegliche Stäbchen (0,5 *x* 2 µm) erkennbar (Abb. 56, C).

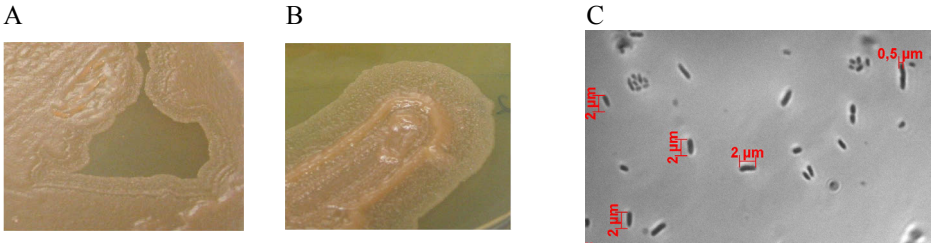


Abb. 56 ***Operational Taxonomic Unit* 19.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 19 nach siebentägiger (A) und nach 23-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 19 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

OTU 20 bestand aus unpigmentierten Kolonien, deren Rand platt und glatt war, während das Zentrum leicht erhöht und gewellt erschien (Abb. 57, A und B). Das Isolat roch süßlich und unangenehm. Hydrolysehöfe traten nur bei der Kultivierung auf Tributyrin-Agar auf. Unter dem Mikroskop wurden bewegliche Kokken (Ø 1-2 µm), einzeln oder als Paar, sichtbar (Abb. 57, C). Das Präparat war mit Stäbchen (1 *x*1,5 µm) kontaminiert.

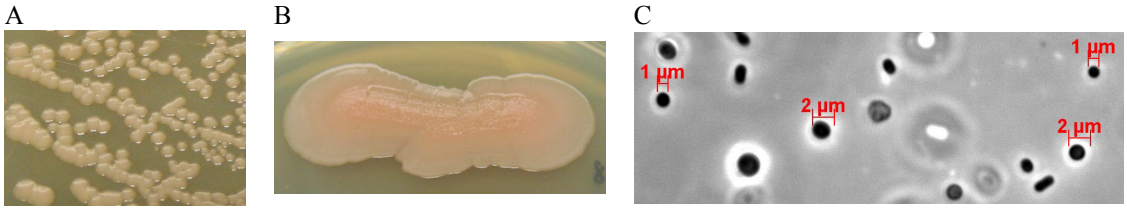


Abb. 57 ***Operational Taxonomic Unit* 20.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen vo OTU 20 nach achttägiger (A) und nach 20-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 20 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Isolate aus OTU 21 ähnelten stark den Kolonien aus OTU 3, hatten jedoch keine hydrolytische Aktivität auf Tributyrin- oder *skim milk*-Agar. Die Kolonien waren rosa-gefärbt, feucht und erhaben (Abb. 58, A und B). Nach 20 Tagen spreizte sich der glatte Rand auf, der deutlich schwächer pigmentiert war als das Zentrum. Unter dem Mikroskop waren Stäbchen (0,5 *x* 1,5 µm), einzeln oder als Paar, erkennbar, kontaminiert mit Kokken oder Kurzstäbchen (Abb. 58, C).

Abb. 58 ***Operational Taxonomic Unit* 21.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 21 nach siebentägiger (A) und nach 20-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 21 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Unpigmentierte Kolonien mit einem glatten Rand wurden in OTU 22 zusammengefasst. Zu Beginn der Kultivierung waren sie unauffällig, falteten aber mit zunehmender Zeit das Zentrum auf, während der Rand flach blieb (Abb. 59, A und B). Hydrolyseaktivität wurde nur bei Kultivierung auf *skim milk*-Agar sichtbar. Unter dem Mikroskop waren große Stäbchen (1 *x* 4-5 µm), einzeln oder als Paar, erkennbar (Abb. 59, C).

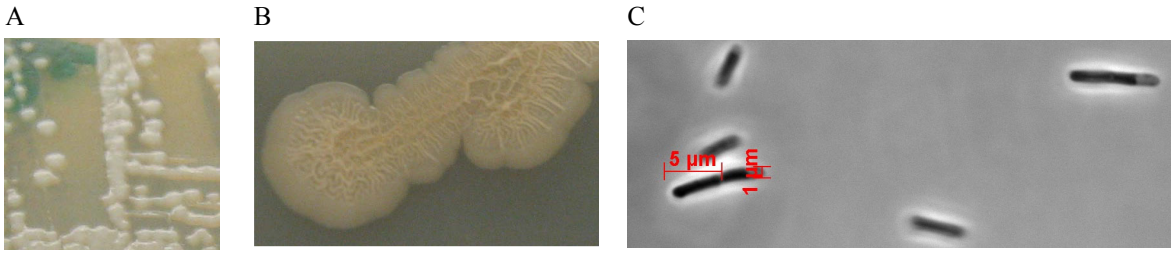


Abb. 59 ***Operational Taxonomic Unit* 22.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 22 nach siebentägiger (A) und nach 21-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 22 wurden mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Isolate aus OTU 23 ähnelten morphologisch stark Organismen aus OTU 3 und OTU 21. Die Isolate bildeten teilweise Hydrolysehöfe bei der Kultivierung auf Tributyrin- oder *skim milk*-Agar.

Isolate aus OTU 24 waren blassgelb-gefärbt und feucht. Die Kolonien hatten einen glatten Rand, waren rund und erhaben (Abb. 60, A und B) und bildeten keine Hydrolysehöfe bei der Kultivierung auf Tributyrin- oder *skim milk*-Agar. Unter dem Mikroskop wurden Stäbchen (0,5 *x* 2,5 µm), einzeln oder als Paar, sichtbar (Abb. 60, C).

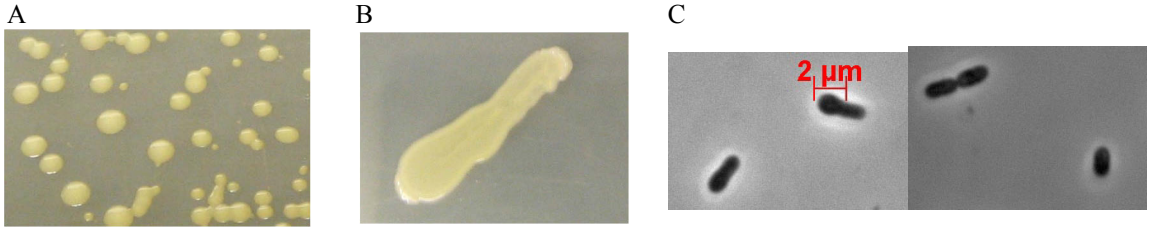


Abb. 60 ***Operational Taxonomic Unit* 24.** Fraktionierter Ausstrich von Zellen von OTU 24 nach siebentägiger (A) und nach 19-tägiger (B) Inkubation bei RT. C: Zellen von OTU 24 wurde mit dem *Axioplan 1* und 1.250 *x* Vergrößerung unter Phasenkontrast (Phase 3) visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mit der *AxioCam MRm* unter Verwendung der *AxioVision Bildanalyse Software*.

Nicht alle Isolate einer *Operational Taxonomic Unit* zeigten identisches Hydrolyseverhalten bei der Kultivierung auf *skim milk*-Agar oder Tributyrin-Agar. Die Einteilung in OTUs erfolgte über die Klonierung der ribosomalen DNA (2.20.1, 2.22) und die Sequenzierung mit dem Primer GM1F (2.6) [214]. Gemäß *E. coli* Nomenklatur wurde so die Nukleotidabfolge der variablen Bereiche V4 bis V8 der 16S rDNA Gene bestimmt. Dies entspricht ca. 60% der Volllängensequenz [349] und liefert vergleichbare Ergebnisse wie diese [350-352]. Allerdings kann über die Analysen der 16S rDNA nur eine grobe Einordnung der Organismen vorgenommen werden und zur Artenabgrenzung sind weitere phylogenetische Untersuchungen mit zusätzlichen Markermolekülen wie beispielsweise Elongationsfaktoren, Hitzeschockproteine, Chaperone etc. notwendig [353-356]. Daher könnte das unterschiedliche Hydrolyseverhalten der Organismen einer OTU entweder auf unterschiedliche aber nah verwandte Bakterienstämme zurückzuführen sein oder das Hydrolyseverhalten wurde durch Kontaminationen verfälscht, denn nicht alle Isolate lagen als Reinkulturen vor. Die Verwandtschaftsbeziehungen der kultivierbaren Organismen ist in (Abb. 61) dargestellt.

Neben einer Hefe (OTU 10) konnten vor allem Stäbchen und Kokken aus den drei Abteilungen *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* (α und γ) isoliert werden, wobei Proteobakterien am häufigsten vertreten waren. Dies verwundert nicht, da ein typisches Medium zur Kultivierung von Proteobakterien verwendet wurde. Durch die Kultivierung ging Biodiversität verloren und es ist allgemein akzeptiert, dass nur ein Bruchteil aller Organismen eines Habitats kultivierbar ist [27, 28, 36, 40]. Von den kultivierbaren Organismen wurde aber wahrscheinlich auch ein gewisser Anteil der langsam wachsenden K-Strategen von schneller wachsenden Bakterien, sog. R-Strategen, verdrängt [357, 358]. So ist beispielsweise von der Isolierung von Spirillen bekannt, dass sie leicht von Proteobakterien überwachsen werden, insbesondere wenn Pepton oder Hefeextrakt im Medium vorhanden ist [330]. Da im verwendeten SHGB-Medium beide Substrate vorhanden waren, wurden zumindest mit großer Wahrscheinlichkeit die Spirillen überwachsen. Außerdem war die Morphologie von Kolonien der Plattenkulturen recht ähnlich und es wurden immer nur einige wenige Kolonien mit gleicher Morphologie analysiert. Es ist davon auszugehen, dass die Diversität innerhalb kultivierbarer Organismen mit gleicher Morphologie größer ist als dokumentiert und bei der Analyse einer größeren Anzahl von Kolonien auch hätte aufgezeigt werden können.

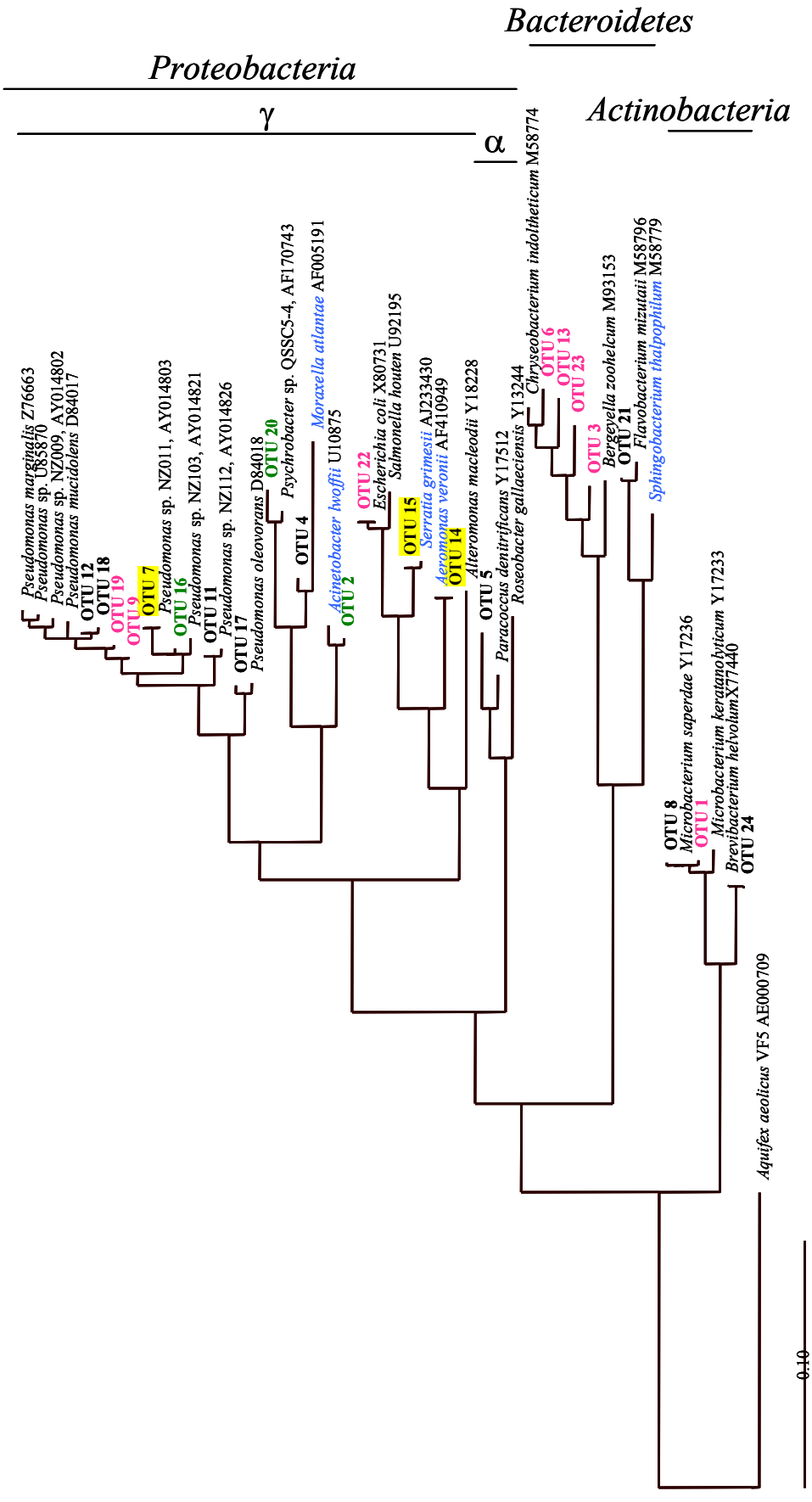


Abb. 61 Phylogenetische Analyse der kultivierbaren Organismen des Schlachthofs. Die kultivierbaren Organismen wurden anhand ihrer 16S rDNA Sequenzen in *Operational Taxonomic Units* (OTUs) eingeteilt. Anschließend wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt, wobei *Aquifex aeolicus* als gemeinsamer, entfernter Verwandter (*outgroup*) festgelegt wurde. Alle OTUs sind in ‚fetter Schrift' hervorgehoben und durchgehend nummeriert. OTUs mit lipolytischer Aktivität sind in ‚grüner Schrift' und OTUs mit Protease-Aktivität in ‚pinker Schrift' gekennzeichnet. OTUs mit beiden Aktivitäten sind ‚gelb' unterlegt. Organismen mit Risikostufe 2 sind in ‚blauer Schrift' gekennzeichnet. Der Stammbaum wurde aus der Diplomarbeit von Olga Link [214] übernommen und modifiziert. Da es sich bei OTU10 um einen Eukarvoten handelte. ist er nicht in Abb. 61 aufgeführt.

Die Pigmentierung sowie die Sekretbildung einiger Isolate ließ potentielle Pathogenität vermuten (3.4.2.2). Die phylogenetische Analyse bestätigte die Verwandtschaft einiger Isolate zu Bakterien, die nach den technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA) als Risikostufe 2 klassifiziert wurden. In vielen pathogenen Organismen sind sekretierte Proteasen, aber auch (Phospho-)Lipasen und Esterasen, als Virulenzfaktoren beschrieben [359-362] und >50% der OTUs zeigten hydrolytische Aktivität auf Tributyrin-Agar oder auf *skim milk*-Agar. Drei OTUs innerhalb der Klasse der γ-Proteobakterien hatten sogar beide Aktivitäten. Diese Isolate waren mit *Pseudomonas* sp. NZ011 oder AY014826 (OTU 7), *Aeromonas veronii* AF410949 (OTU 14) und *Serratia grimesii* AJ233430 (OTU 15) verwandt, wobei letztere der Risikostufe 2 angehören. Somit stehen die potentiellen Virulenzfaktoren der Isolate mit Pathogenität in Verbindung.

Diese Analyse zeigte aber auch, dass viele kultivierbare Organismen des Schlachthofs hydrolytische Aktivität besitzen. Die Annahme, dass der Schlachthof ein ‚natürlich angereichertes' Habitat für Organismen mit hydrolytischer Aktivität ist, bestätigte sich. Nimmt man an, dass 99% der Organismen im Schlachthof unkultivierbar sind, ist das Potential zur Entdeckung von Biokatalysatoren aus dem Metagenom immens.

Actinobacteria, *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* (α und γ) sowie eine Hefe konnten aus dem Schlachthof isoliert und kultiviert werden, wobei Proteobakterien am häufigsten vertreten waren. Anhand ihrer ribosomalen DNA Sequenzen wurden die Isolate in *Operational Taxonomic Units* eingeteilt. Insgesamt konnten 24 OTUs identifiziert werden. 12 OTUs zeigten hydrolytische Aktivität auf Tributyrin-Agar oder auf *skim milk*-Agar und sogar drei OTUs hatten beide Aktivitäten. Obwohl einige OTUs potentielle Virulenzfaktoren aufweisen und mit pathogenen Organismen verwandt sind, besitzen viele kultivierbare Organismen Potential zur Entdeckung von neuartigen Biokatalysatoren.

3.4.3 Phylogenetische Analyse von Probe P4

Aus einer unangereicherten Probe sollte DNA zur Konstruktion von Metagenombanken isoliert werden. Über eine visuelle, mikroskopische Beurteilung erwiesen sich Probe P4 und P6 als geeignet (3.4.1), wobei Probe P4 zur DNA Isolation ausgewählt wurde. Da eine morphologische Untersuchung unter dem Mikroskop nur geringe Informationen über die Organismen lieferte, wurde die Probe auch phylogenetisch untersucht. Dazu wurden zuerst Zellen eines Aliquots der Probe P4 aufgeschlossen und DNA isoliert (2.4). Anschließend wurde die 16S rDNA amplifiziert (2.6, 2.18.1), kloniert (2.20.1) und sequenziert (2.21). Ein erster Überblick wurde über BLAST Analysen gewonnen. Zur genauen phylogenetischen Einordnung wurde ein Stammbaum (Abb. 62) der unbekannten Sequenzen und ausgewählter Referenzsequenzen in Kooperation mit Dr. Mirjam Perner (Biozentrum Klein Flottbek, Mikrobiologie, Hamburg) erstellt (2.22).

Der Biofilm (Probe P4) bestand aus Flavobakterien und Chryseobakterien. Beide Spezies sind nah verwandt und gehören der Familie *Flavobacteriaceae* an, die zu der Ordnung *Flavobacteriales*, der Klasse *Flavobacteria* bzw. der Abteilung *Bacteroidetes* zählen (2.2). Es ist nicht ungewöhnlich, dass Biofilme aus verschiedenen mikrobiellen Spezies bestehen, und Biofilme, die aus nur einer Spezies bestehen, sind selten [331]. Die Bakterien aus Probe P4 sind außerdem mit den kultivierbaren Organismen, die in OTU 3, 6 und 23 zusammengefasst wurden (3.4.2.3), verwandt. Isolate dieser OTUs hydrolysieren teilweise Casein. Daher ist die Chance zur Entdeckung von neuen Biokatalysatoren mit hydrolytischer Aktivität gegeben, zumindest unter dem Gesichtspunkt der Abundanz der Gene im Metagenom.

Probe P4 besteht aus einem bakteriellen Biofilm aus Flavobakterien und Chryseobakterien. Diese sind nah verwandt und gehören zur Familie *Flavobacteriaceae* und zur Abteilung *Bacteroidetes*.

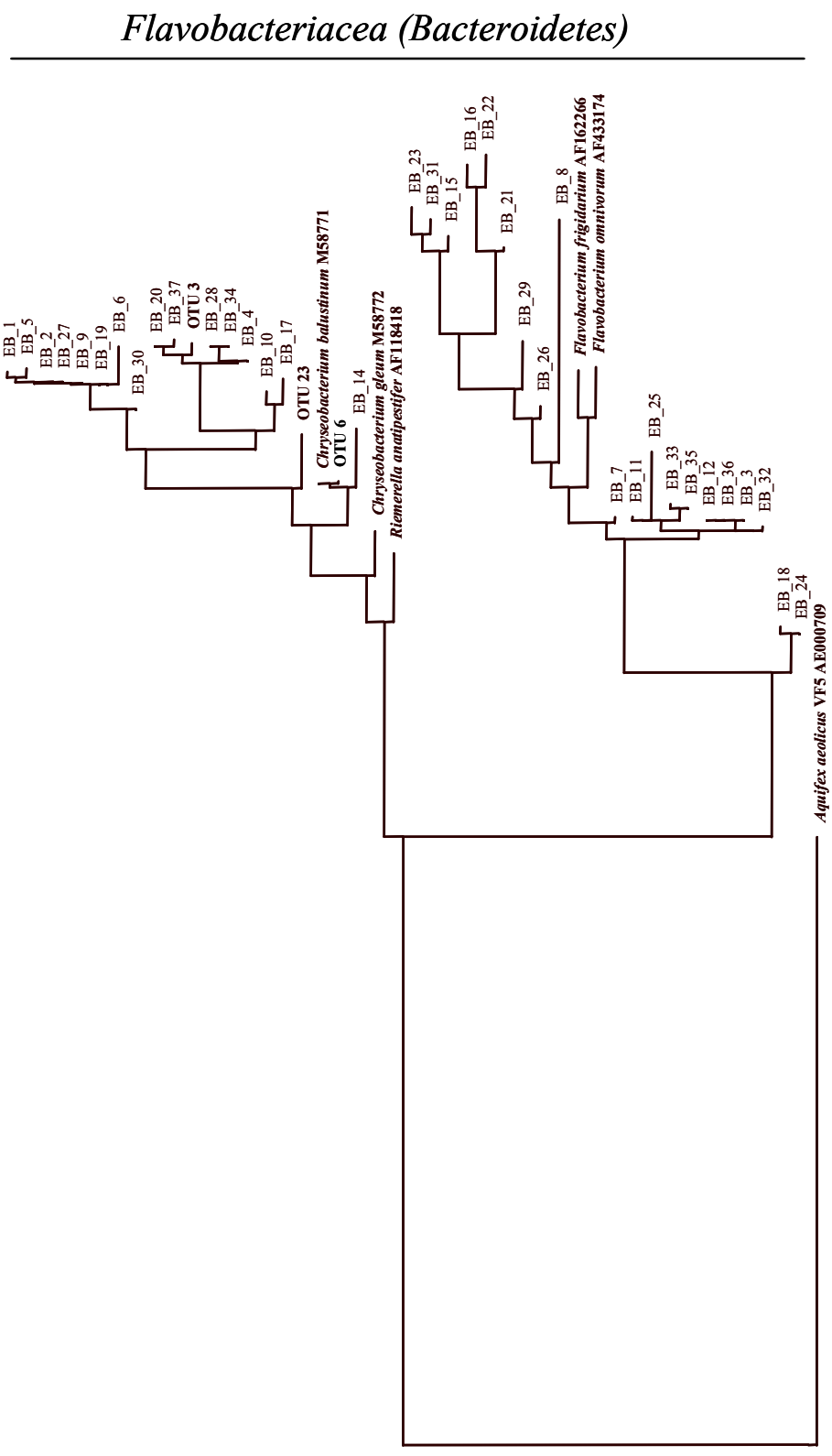


Abb. 62 Phylogenetische Analyse der Organismen aus Probe P4. Aus den 16S rDNA Sequenzen der Organismen der unangereicherten Probe P4 wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt, wobei *Aquifex aeolicus* als gemeinsamer, entfernterster Verwandte (*outgroup)* festgelegt wurde. Alle Referenzsequenzen sind in ‚fetter Schrift' hervorgehoben. EB_1 bis EB_37: unbekannte 16S rDNA Sequenzen von Organismen aus Probe P4 in fortlaufender Nummerierung, wobei bei der Sequenzierung fehlgeschlagene Sequenzen nicht aufgeführt sind. OTU: *Operational Taxonomic Unit*, kultivierbare Organismen des Schlachthofes wurden anhand ihrere 16S rDNA Sequenzen in OTU zusammengefasst (nähere Informationen siehe Diplomarbeit von Olga Link [214] und 3.4.2.3).

3.5 Identifizierung von Biokatalysatoren aus dem Metagenom ‚Schlachthof'

Nach der Probennahme im Schlachthof und mikroskopischer Analyse, eigneten sich nur Probe P4 und P6 zur DNA Isolierung (3.4.1), wobei letztendlich Probe P4 ausgewählt wurde. Probe P4 bestand aus einem bakteriellen Biofilm aus Flavobakterien und Chryseobakterien (3.4.3), die zuvor auch angereichert (3.4.2) werden konnten (OTU 3, 6 und 23). Isolate dieser *Operational Taxonomic Units* bildeten Hydrolysehöfe bei der Anzucht auf *skim milk*-Agar (3.4.2.3). Daher sollten Strukturgene von Proteinen mit Protease-Aktivität durch die metagenomische DNA aus P4 kodiert sein. Die DNA wurde zunächst aus Probe P4 isoliert und durch einen Verdau mit *Bsp*143I (*Sau*3AI Isoschizomer) fragmentiert (3.5.1). *Bsp*143I schneidet aufgrund seiner Erkennungssequenz von vier Basenpaaren statistisch alle 256 Nukleotide. Dadurch wird, im Vergleich zu einem Verdau mit einer Nuklease, die eine Erkennungssequenz von sechs Basenpaaren hat und statistisch alle 4.096 Nukleotide schneidet, eine stärkere Fragmentierung der DNA möglich. Nach der Hydrolyse der DNA wurden 3-6 Kb große Fragmente isoliert und mit dem *Bam*HI-geschnittenen und dephosphorylierten pEBP18 ligiert. Die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Bsp*143I erzeugen bei der Hydrolyse der DNA kompatible Überhänge. Die gewählte Insert-Größe von 3-6 Kb sollte groß genug sein, um einzelne Strukturgene funktional zu erhalten [44, 61, 69, 86]. *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida* wurden transformiert und Genbanken mit sog. ‚kleinen Inserts' erzeugt und funktionsbasiert analysiert (3.5.2).

3.5.1 Isolierung und Fragmentierung der DNA aus Probe P4

Nach dem Auftauen von Probe P4 wurde das Feuchtgewicht mit ca. 5-6 g abgeschätzt. Anschließend wurde die DNA isoliert (2.14.2) und über eine Phenol-Chloroform Extraktion (2.14.4) und Isopropanol-Fällung (2.14.3) gereinigt und konzentriert. Es konnte hochmolekulare DNA in erheblicher Menge isoliert werden, denn schon während der Isopropanol-Fällung wurde die DNA mit bloßem Auge sichtbar (Abb. 63, A). Nach der Elution wurde die DNA über AGE (2.16) visualisiert (Abb. 63, B). Die isolierte DNA war mit einer Größe von >40 Kb hochmolekular und eignete sich daher zur Konstruktion von Genbanken. Allerdings war die DNA mit RNA verunreinigt (nicht dargestellt). Die Konzentration der Nukleinsäuren betrug 3,25 µg/µL und insgesamt wurden ca. 22,5 mg Nukleinsäuren isoliert. Die Reinheit der DNA wurde durch das Verhältnis der Absorbtion bei 260/280 nm und bei 260/230 nm photometrisch bestimmt (2.14.5). Nukleotide (RNA, ssDNA, dsDNA) absorbieren Licht der Wellenlänge 260 nm, wobei ein Absorptionswert

von eins einer Konzentration von 50 µg/mL (dsDNA) entspricht. Absorption der Probe bei 230 nm ist ein Hinweis auf eine Verunreinigung mit Phenol, EDTA oder anderen organischen Verbindungen, und eine Absorption bei 280 nm oder 320 nm zeigt Proteinverunreinigungen an [140]. Obwohl die isolierte DNA mit Absorptionswerten von $A_{260/280}$ = 1,99 und $A_{260/230}$ = 2,17 nicht verunreinigt sein sollte, roch die Lösung noch nach Phenol. Da Phenol enzymatische Restriktionen inhibieren kann [140], wurde ein Aliquot noch einmal über eine Isopropanol-Fällung aufgereinigt, wobei zuvor RNA Rückstände durch eine RNaseA Behandlung entfernt wurden. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit 1,1 µg/µL bestimmt. Die isolierte DNA war mit $A_{260/280}$ = 1,83 und $A_{260/230}$ = 2,2 rein und roch nicht mehr nach Phenol. Für weitere Analysen standen 880 µg gereinigte DNA zur Verfügung. Die optimalen Parameter zur Fragmentierung der DNA wurden über eine Restriktionskinetik (2.15.3) bestimmt. Eine zufriedenstellende Fragmentierung der DNA wurde bei einem Verdau mit 0,5 U *Bsp*143I pro Mikrogramm DNA nach 6 min erzielt (Abb. 63, C). Die DNA wurde präparativ gemäß den Parametern der Restriktionskinetik verdaut, über eine präparative AGE aufgetrennt und DNA der Größe 3-6 Kb nach Ausschneiden des Zielbereiches über Elektroelution (2.17) und Isopropanol-Fällung isoliert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit 30 ng/µL bestimmt. Insgesamt wurden 4,5 µg fragmentierte DNA erhalten. Ein Aliquot wurde nach Fragmentierung und Aufreinigung über AGE kontrolliert (Abb. 63, D).

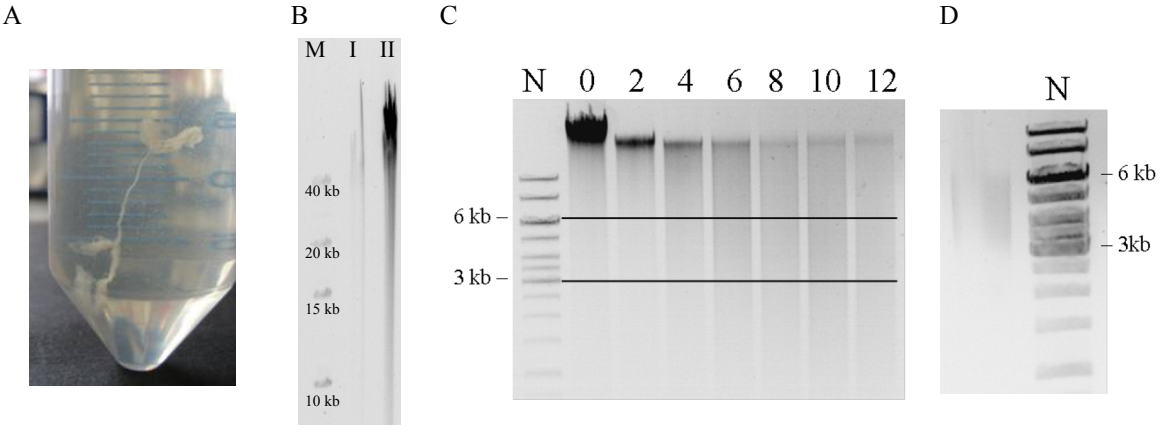


Abb. 63 Analyse von isolierter DNA aus Probe P4. A: Ausgefallene, hochmolekulare DNA aus P4 nach Extraktion während der Isopropanol-Fällung. B: 1 µL (I) und 5 µL (II) aufgereinigte DNA aus Probe P4 wurde über AGE (0,5% (w/v) Agarose, TAE Puffer, 100 V, 20 h) analysiert. C: Die aufgereinigte DNA aus Probe P4 wurde enzymatisch mit 0,5 U *Bsp*143I pro Mikrogramm DNA partiell hydrolysiert. Die Restriktionskinetik der Probe (Probennahme nach 0 bis 12 min) wurde über AGE (0,5% (w/v) Agarose, TAE Puffer, 150 V, 60 min) visualisiert. D: Nach einer präparativen Hydrolyse der DNA mit *Bsp*143I gemäß den Parametern der Restriktionskinetik wurde fragementierte DNA mit einer Größe von 3-6 Kb isoliert. 150 ng fragmentierte, gereinigte DNA der Größe 3-6 Kb wurde über AGE (0,5% (w/v) Agarose, TAE Puffer, 130 V, 1,5 h) kontrolliert. Verwendete DNA-Molekulargewicht Standards: *1 Kb DNA Extension Ladder* (M) und *1 Kb DNA Ladder* (N).

Aus Probe P4 konnten große Mengen an hochmolekularer DNA (>40 Kb) isoliert werden. Insgesamt wurden 880 µg gereinigte DNA und ca. 17,2 mg mit Phenol verunreinigte Nukleinsäuren gewonnen. Die DNA konnte mit *Bsp*143I in 3-6 Kb große Fragmente partiell verdaut werden. Insgesamt wurden 4,5 µg Insert-DNA zur Konstruktion von Genbanken erhalten.

3.5.2 Konstruktion und Screening von Metagenombanken in *Escherichia coli* DH10b

3.5.2.1 Konstruktion von Metagenombanken in *E. coli* DH10b

pEBP18 wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten (2.15.2), mit SAP dephosphoryliert (2.15.5) und die Qualität der Vektorpräparation über eine Ligationskontrolle (2.15.7) überprüft. Anschließend wurde der Genbankvektor mit *Bsp*143I hydrolysierter ‚Insert-DNA' (3-6 Kb) aus Probe P4 (3.5.1) im Verhältnis von Vektor zu Insert = 1:1 und 1:2 ligiert (2.15.6). Elektrokompetente *E. coli* DH10b wurden mit dem Ligationsansatz transformiert (2.23.5) und nach 2,5 stündiger Regeneration in SOC-Medium direkt auf selektivem Indikatormedium (2.12) ÜN angezogen. Je nach verwendetem Ligationsansatz und selektivem Substratagar variierte die Transformationseffizienz zwischen 1-3 x 10^6 *cfu*/µg DNA. Transformation und Selektion wurden solange wiederholt, bis insgesamt je ca. 170.000 Klone auf selektivem Tributyrin-Agar, *skim milk*-Agar und Blutagar erhalten wurden. Die Restriktionsanalyse der Plasmide von insgesamt 48 Klonen zeigte, dass fünf Klone kein Insert trugen (nicht dargestellt). Demnach enthielten 10-15% der Klone der Genbank den Leervektor pEBP18. Ansonsten war das Restriktionsmuster divers, die Insert-DNA der analysierten Plasmide betrugen zwischen 2 Kb und 10 Kb mit einer durchschnittlichen Größe von 5,2 Kb. Demnach wurden ungefähr je 750 Mb metagenomische DNA pro Genbank gespeichert. Nach der Konstruktion der Genbank wurden die Platten für drei Wochen bei 4°C gelagert und mehrmals kontrolliert. Sowohl Klone mit hydrolytischer Aktivität (0) als auch Klone die GFP exprimierten (3.5.2.3) wurden identifiziert.

In *E. coli* DH10b wurden insgesamt drei Metagenombanken konstruiert. Diese bestanden aus je 1,7 x 10^5 Klonen und repräsentierten je ca. 750 Mb metagenomische DNA. Die Insert-DNA der Plasmide betrug 2-10 Kb (Durchschnitt: 5,2 Kb). Sowohl Klone mit hydrolytischer Aktivität als auch GFP exprimierende Klone konnten identifiziert werden.

3.5.2.2 Identifizierung von *E. coli* Genbankklonen mit hydrolytischer Aktivität

Klone mit hydrolytischer Aktivität wurden gesichert, in Flüssigkulturen angezogen (2.9) und deren Plasmide isoliert (2.4). Anschließend wurden die Plasmide über eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Eco*RI sowie *Smi*I (2.15.2) und AGE (2.16) analysiert und die Insert-Größe abgeschätzt. Zur Kontrolle, ob die Aktivitäten spezifisch durch die rekombinanten Plasmide kodiert wurden, wurde *E. coli* DH5α mit den isolierten Plasmiden retransformiert (2.23.4). Alle identifizierten Aktivitäten sind in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17 Übersicht über verschiedene Aktivitäten von *E. coli* DH10b Genbankklonen. Metagenomische DNA (3-6 Kb) aus Probe P4 wurde mit pEBP18 ligiert. Nach Transformation und Selektion von *E. coli* DH10b wurden die Transformanden auf hydrolytische Aktivität auf Blutagar, *skim milk*-Agar und Tributyrin-Agar überprüft. Die Insert-Größe der Plasmide wurde über einen *Smi*I Verdau und AGE (0,6% (w/v) Agarose, 150 V, 45 min) abgeschätzt und ist in Kilobasen (Kb) angegeben. +, + + und + + + spiegelt die Stärke der hydrolytischen Aktivität, bzw. die Größe des gebildeten Hydrolysehofes der Kolonie, wider. Plasmid: pEBP18_3-6Kb. BA: Blutagar. SM: *skim milk*-Agar. TB: Tributyrin-Agar. Ec: *Escherichia coli*. *: keine β-Hämolyse-Aktivität.

Plasmid	Insert-Größe (Kb)	hydrolytische Aktivität	Plasmid	Insert-Größe (Kb)	hydrolytische Aktivität
BA_{Ec} 343	3,5	+ + +	TB_{Ec} 304	3,7	+ +
BA_{Ec} 354	10	+ +	TB_{Ec} 305	4,5	+ +
BA_{Ec} 458	5,5	Pigment*	TB_{Ec} 306	10	+ +
SM_{Ec} 321	5	+	TB_{Ec} 307	4,5	+ +
SM_{Ec} 679	4,5	+ +	TB_{Ec} 308	4	+
SM_{Ec} 682	8,5	+	TB_{Ec} 310	3,2	+ +
SM_{Ec} 760	3,5	+	TB_{Ec} 312	7	+
SM_{Ec} VIII E12	3,7	+	TB_{Ec} 313	5	+ +
TB_{Ec} 94	5,5	+ +	TB_{Ec} 314	5,5	+
TB_{Ec} 113	4,5	+ +	TB_{Ec} 321	5,5	+
TB_{Ec} 157	6	+ + +	TB_{Ec} 350	10	+
TB_{Ec} 301	9	+ +	TB_{Ec} I H8	4	+ +

Exemplarisch sind Kolonien mit hydrolytischer Aktivität in Abb. 64 dargestellt.

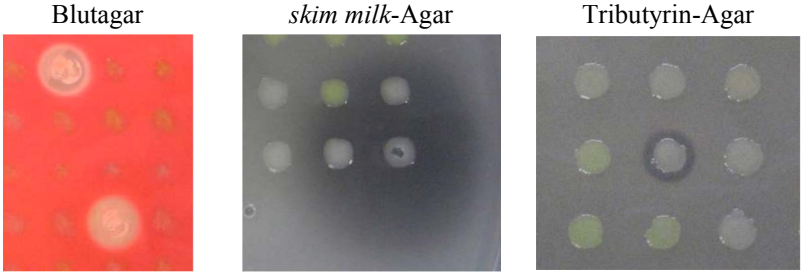


Abb. 64 *E. coli* DH10b Genbankklone mit hydrolytischer Aktivität. *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) wurde auf selektiven Blutagar, *skim milk*-Agar und Tributyrin-Agar kultiviert. Klone mit hydrolytischer Aktivität wurden gesichert, in Flüssigkulturen angezogen und nochmals auf selektiven Substratagar-Platten kultiviert. Exemplarisch sind Kolonien mit hydrolytischer Aktivität abgebildet. Blutagar: Hämolyse-Aktivität. *skim milk*-Agar: Protease-Aktivität. Tributyrin-Agar: Esterase-/Lipase-Aktivität.

Genbankklon *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb BA_{Ec} 458 bildete ein rot- bis braun-gefärbtes Pigment, das ins extrazelluläre Milieu sekretiert wurde (Abb. 65).

A B C

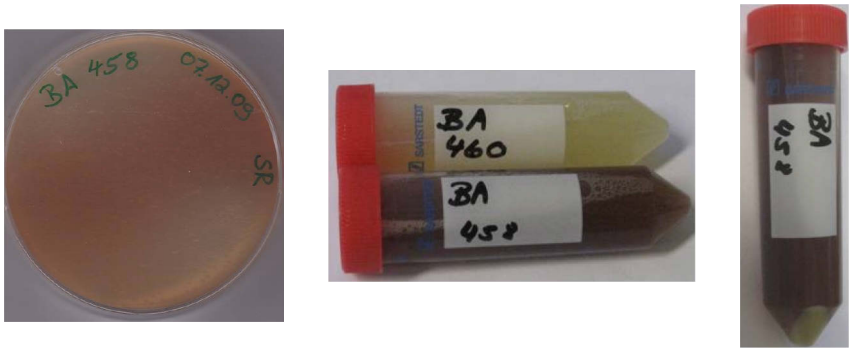


Abb. 65 Genbankklon *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} 458. *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} 458 sekretierte sowohl als Plattenkultur (A) also auch in Flüssigkultur (B, C) ein rot- bis braun-gefärbtes Pigment. *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} 460 wurde als Kontrolle abgebildet (B).

Die Detektionsfrequenz der Aktivitäten ist in Tab. 18 angegeben.

Tab. 18 Detektionsfrequenz der identifzierten Aktivitäten der *E. coli* DH10b Genbank. Pro Genbank wurden ca. 750 Mb (Megabasenpaare) metagenomischer DNA gespeichert. Die Detektionsfrequenz wurde über die Bankengröße und die Anzahl der gefundenen Aktivitäten berechnet und entspricht einem Klon je angegebenen Mb an metagenomischer DNA. *: In allen drei Genbanken (insg. 2.250 Mb Insert-DNA) wurde nur ein Pigment-produzierender Klon gefunden.

Aktivität	Anzahl der Klone	Detektionsfrequenz
Hämolyse-Aktivität	2	1 : 375 Mb
Protease-Aktivität	5	1 : 150 Mb
Esterase-/Lipase-Aktivität	16	1 : 46,8 Mb
Pigment-Produktion*	1	1 : 2.250 Mb

Durch Screening der *E. coli* DH10b Genbanken auf Blutagar, *skim milk*-Agar und Tributyrin-Agar konnten insgesamt zwei Klone mit hämolytischer Aktivität, fünf Klone mit Protease-Aktivität, 16 Klone mit Esterase-/Lipase-Aktivität und ein Pigment produzierender Klon identifiziert werden.

Die Sequenzen ausgewählter Plasmide wurden in einer Kooperation mit dem *Göttingen Genomics Laboratory (G2L)* aufgeklärt (2.21). Anschließend wurden *open reading frames* in den Sequenzen mit Hilfe des Computerprogramms *Clone Manager* identifiziert (2.2). Wenn mehrere *orfs* an einer identischen Stelle in der Sequenz endeten wurde der längste kodierende Bereich ausgewählt. Die korrespondierenden Proteine wurden *in silico* translatiert. Um einen ersten Eindruck zu bekommen, wurden online Datenbanken nach homologen Sequenzen durchsucht (2.2). Exemplarisch sind *open reading frames* von zwei verschiedenen metagenomischen DNA-Inserts der Plasmide pEBP18-3-6Kb SM_{Ec} 679 und BA_{Ec} 354 (8.793 Bp) ist in Abb. 66 visualisiert. *Orfs* die entweder zu gänzlich

unbekannten Proteinen oder zu Proteinen kleiner 150 Aminosäuren führen sind nicht dargestellt.

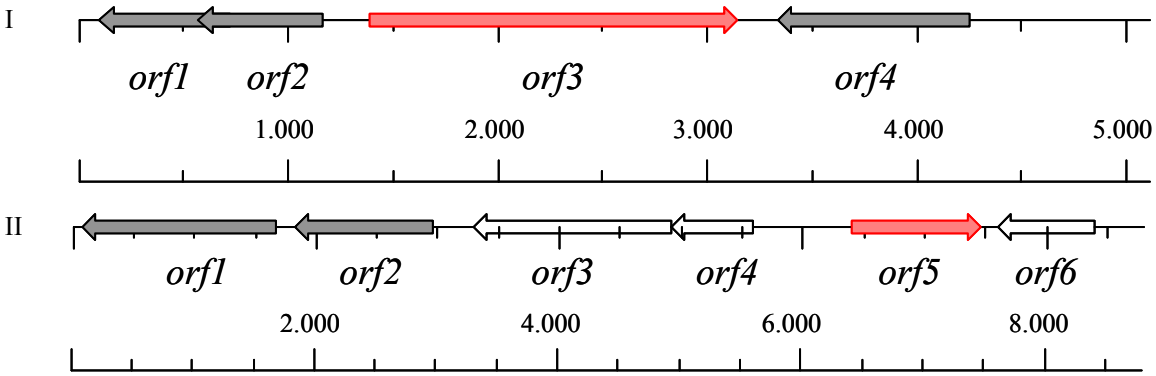


Abb. 66 Schematische Darstellung der *orfs* der Insert-DNA der Plasmide pEBP18_3-6Kb SM_{Ec} 679 und BA_{Ec} 354. Die Plasmide pEBP18_3-6Kb SM_{Ec} 679 (I) und pEBP18_3-6Kb BA_{Ec} 354 (II) wurden sequenziert. *Orfs* sind schematisch durch Pfeile dargestellt. *Orsf* deren Produkte entweder zu gänzlich unbekannten Proteinen oder zu Proteinen kleiner 150 Aminosäuren führen sind nicht abgebildet. Die Nummerierung der *orfs* wurde willkürlich festgelegt. *Orf(s)*: *open reading frame(s)*.

Die Insert-DNA des Plasmids pEBP18_3-6Kb SM_{Ec} 679 (5.109 Bp) kodiert nach den definierten Kriterien (s.o.) für vier *orfs*. Neben einem Gen einer putativen sekretierten Serinprotease (*orf3*) wurden Homologien zu Proteinen des *general secretion pathway* (Typ II Sekretionssystem) [363-365] gefunden. Es handelt sich dabei um die Proteine H (*orf1*), G (*orf2*) und F (*orf4*).

Die Insert-DNA des Plasmids pEBP18_3-6Kb BA_{Ec} 354 (8.793 Bp) kodiert für sechs *orfs*. Homologien zu einer putativen Glukose-Methanol-Cholin Oxidoreduktase (*orf3*), einer putativen Uracil-DNA Glykosylase (*orf4*) und einer putativen (Trypsin-ähnlichen) Serinprotease (*orf6*) wurden gefunden. Außerdem wurden eine putative Lysophospholipid Acyltransferase (*orf5*) und ein ABC-Transporter (*orf1* und *orf2*) identifiziert. Aktive Phospholipasen können die Hämolyse von Blutzellen hervorrufen [366-368] und Cytolysine wie z.B. α-Hämolysin werden über Typ I Sekretion freigesetzt [369-371]. Es ist denkbar, dass die Expression von *orf5* in Kombination mit einer Typ I-abhängigen Sekretion die hämolytische Aktivität des Klons bewirkte.

Es ist extrem auffällig, dass die Insert-DNA beider Plasmide für ein Strukturgen, welches die Aktivität hervorruft, in räumlicher Nähe zu einem putativen Transport-System kodiert. Weitere Analysen sind zwingend notwendig, konnten aber aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

Durch Sequenzierung der Plasmide pEBP18_3-6Kb SM_{Ec} 679 und pEBP18_3-6Kb BA_{Ec} 354 konnte die metagenomische Insert-DNA exakt mit 5.109 Bp bzw. 8.793 Bp bestimmt werden. Die Aktivitäten, die durch die Plasmide kodiert wurden, konnten putativen Proteinen zugeordnet werden. Im Insert SM_{Ec} 679 kodiert *orf3* wahrscheinlich für eine sekretierte Serinprotease und *orf5* von BA_{Ec} 354 für eine Lysophospholipid Acyltransferase.

3.5.2.3 Identifizierung von GFP exprimierenden *E. coli* Genbankklonen

Der Vektor pEBP18 kodiert einen Xylose-abhängigen Promotor, der in *B. subtilis* aber nicht in *E. coli* induzierbar ist [372]. Die Genexpression kann in *E. coli* und *P. putida* über IPTG induziert werden, wobei Stämme verwendet werden müssen, die das Gen der T7 RNA Polymerase unter Kontrolle eines induzierbaren *lacUV5*-Promotors tragen. T7 RNA Polymerase-abhängige Promotoren werden von bakteriellen Polymerasen nicht erkannt und transkribiert [142, 297]. Da die Genbank im *E. coli* Stamm DH10b erstellt wurde und dieser Stamm kein ‚T7-System' besitzt, sollte keine Proteinexpression aufgrund nicht komplett reprimierter Vektor-Promotoren stattfinden. Dennoch fiel bei Sonnenlicht schon mit bloßem Auge auf, dass einige Kolonien der *E. coli*-Genbanken gelblich, aber mit unterschiedlicher Intensität, leuchteten. Die Fluoreszenz wurde durch die Expression des Transkriptionsreporters GFP hervorgerufen, der durch pEBP18 kodiert wurde. Da die größte Anzahl der Kolonien unauffällig war, sollte die Fluoreszenz nicht durch eine Hintergrund-Aktivität (3.3.1) hervorgerufen sein, sondern von konstitutiver oder Substrat-induzierter Expression durch das metagenomische Insert. Dieses Phänom ist bekannt und wird sogar gezielt im Screening von Genbanken unter Verwendung sog. *genetic trap* Vektoren eingesetzt, um beispielsweise Substrat-induzierte Operons [95, 96] oder Regulatoren [97, 373] mit hohem Durchsatz zu identifizieren.

1.490 Klone wurden in *DeepWell* Platten im 96er-Format angezogen (2.9), gesichert (2.9.3) und auf alle drei Substratagar-Platten überimpft, um visuell konstitutive und Substrat-induzierte Expression unter UV-Licht zu unterscheiden. Exemplarisch sind 96 Klone, isoliert aus der ‚Blutagar-Genbank', angezogen auf selektivem Blutagar, *skim milk*-Agar und Tributyrin-Agar dargestellt (Abb. 67). Es handelte sich um *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} I A1-H12.

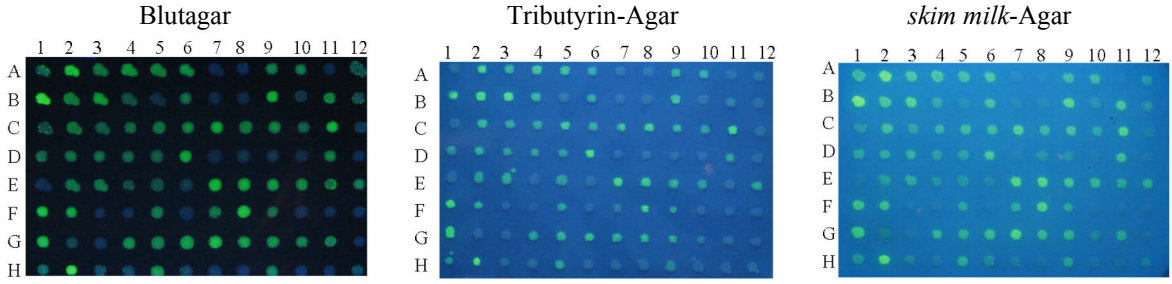


Abb. 67 GFP-exprimierende *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} I A1-H12. Die Klone wurden in Flüssigkulturen angezogen und auf selektive Substratagar-Platten (Blutagar, Tributyrin-Agar und *skim milk*-Agar) überpickt. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit UV-Licht visualisiert.

Versehentlich waren auch einige nicht-fluoreszierende Kolonien gepickt worden. Ansonsten war die GFP Expression fast ausschließlich konstitutiv und die Kolonien leuchteten auf allen drei Substratagar-Platten, allerdings mit unterschiedlicher Intensität, wobei die Fluoreszenz am deutlichsten auf Blutagar-Platten sichtbar wurde. Tributyrin-Agar und *skim milk*-Agar verfügten bei der Betrachtung unter UV-Licht über eine relativ hohe Eigenfluoreszenz und die GFP-Fluoreszenz der Kolonien erzeugte nur einen schwachen Kontrast. Bezogen auf die Gesamtzahl aller Klone fluoreszierten ca. 0,25% der Kolonien.

Möglicherweise konnte eine Kolonie isoliert werden, die nur bei der Kultivierung auf Blutagar fluoreszierte. Bei dem Klon handelte es sich um *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} VI A9 (Abb. 68).

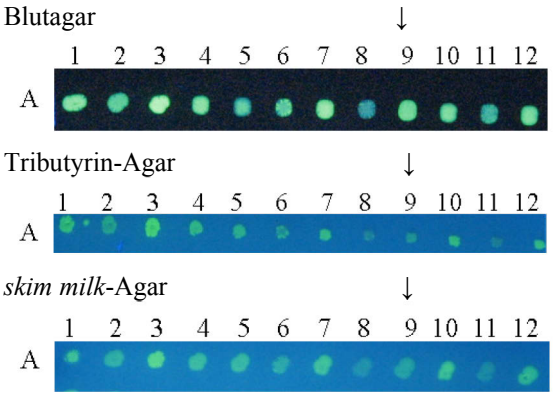


Abb. 68 GFP-exprimierende Genbankklone *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} VI A1-A12. Die Klone wurden von Blutagar-Platten isoliert, in Flüssigkulturen angezogen und auf selektive Substratagar-Platten (Blutagar, Tributyrin-Agar und *skim milk*-Agar) überpickt. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit UV-Licht visualisiert. ↓: *E. coli* DH10b pEBP18_3-6Kb (P4) BA_{Ec} VI A9.

Die Identifizierung von alternativen Promotoren zur Expression in *E. coli* und anderen Bakterien ist bedeutend. Im Jahre 2008 wurden erstmals Promotoren im Metagenom nachgewiesen [373], wobei ein promotorloser Vektor kodierend für zwei bidirektionale Fluoreszenz-Reportern (GFP und DsRed) verwendet wurde. Nach der Ligation des *promoter trap* Vektors mit metagenomischer Insert-DNA, Transformation von *E. coli* mit dem Ligationsansatz und Selektion, wurde eine Genbank erzeugt. Sie bestand aus 115.000

Klonen und die rekombinanten Plasmide hatten eine Insert-Größe von 0,2-3 Kb. Die Genbank wurde auf Fluoreszenz untersucht und 224 Kolonien mit grüner Fluoreszenz und 178 Kolonien mit roter Fluoreszenz wurden identifiziert. Dies entspricht ca. 0,2% bzw. 0,15% der Klone. Werden *genetic trap* Vektoren verwendet, die für bidirektionale Fluoreszenzreporter kodieren, ist die Chance zur Identifizierung von Promotoren theoretisch um 50% erhöht, da die Klonierung ungerichtet verläuft und beide DNA-Stränge des Inserts ein Gen bzw. einen Promotor kodieren können. Dennoch kann pEBP18 in Kombination mit Bakterienstämmen wie beispielsweise *E. coli* DH10b, in denen die Promotoren des Vektors nicht transkribiert werden, als sog. *genetic trap* Vektor verwendet werden.

Ca. 0,25% der Kolonien der *E. coli* Genbanken exprimierten GFP, sichtbar durch eine gelbliche Koloniefärbung bei der Betrachtung unter Tageslicht. Die GFP Expression wurde durch die metagenomische Insert-DNA hervorgerufen. Höchst wahrscheinlich wurden Promotoren in der Insert-DNA von der *E. coli* Polymerase erkannt und transkribiert. Die Klone wurden gesichert, im 96er-Format kultiviert und auf selektivem Blutagar, Tributyrin-Agar und auf *skim milk*-Agar angezogen. Die GFP Expression war fast ausschließlich konstitutiv und die Kolonien leuchteten auf allen drei Substraten. pEBP18 kann in *E. coli* DH10b als sog. *genetic trap* Vektor verwendet werden.

3.5.2.4 Analyse der konstitutiven GFP Expression ausgewählter Klone

Die konstitutive Expression von GFP durch die metagenomische Insert-DNA wurde anhand ausgewählter Klone überprüft, wobei unterschiedlich stark fluoreszierende Kolonien ausgewählt wurden. Zuerst wurde die Plasmid-DNA von jeweils zwei Kolonien mit starker, mittlerer und schwacher Fluoreszenz, sowie von zwei nicht-fluoreszierenden Kolonien, isoliert und über Restriktionsanalyse mit *Smi*I und AGE überprüft. Die Insert-Größen der Plasmide (pEBP18_3-6Kb (P4)) sind in Tab. 19 angegeben.

Tab. 19 Insert-Größe von Plasmiden von *E. coli* DH10b Klonen mit unterschiedlich starker Fluoreszenz. Metagenomische DNA (3-6 Kb) aus Probe P4 wurde mit pEBP18 ligiert. Nach Transformation und Selektion von *E. coli* DH10b wurden die Transformanden auf selektivem Blutagar, *skim milk*-Agar und Tributyrin-Agar angezogen. Die Plasmide ausgewählter Klone wurden isoliert und die Insert-Größen wurden über einen *Smi*I Verdau und AGE (0,6% (w/v) Agarose, 150 V, 45 min) abgeschätzt. Plasmid: pEBP18_3-6Kb (P4). Insert (Kb): Insert-Größe des Plasmids in Kilobasen angegeben.

Plasmid	Insert (Kb)	Plasmid	Insert (Kb)	Plasmid	Insert (Kb)
BAI A2	5	BAI B2	6	BAI D7	11,5
BAI A3	6	BAI D3	4,5	BAI D8	6
BAI B1	2	BAI D4	4	BAII E12	4

E. coli DH5α wurde mit den isolierten Plasmiden transformiert und auf selektivem Vollmedium und Blutagar angezogen. *E. coli* DH5α pEBP18 diente als Negativ- und *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18 als Positivkontrolle. Zuerst wurde die GFP-Fluoreszenz bei Tageslicht und unter UV-Licht kontrolliert (Abb. 69).

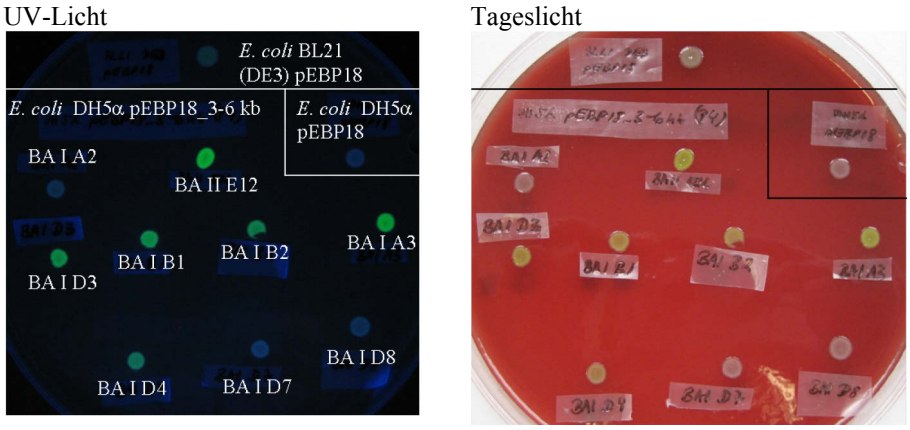


Abb. 69 GFP-exprimierende *E. coli* DH5α Klone nach Transformation mit verschiedenen Plasmiden (pEBP18_3-6Kb (P4)) der *E. coli* DH10b Genbank. *E. coli* DH5α wurde mit verschiedenen Plasmiden (pEBP18_3-6Kb (P4)) der *E. coli* DH10b Genbank transformiert und auf Blutagar angezogen. Als Kontrolle dienten *E. coli* DH5α pEBP18 und *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18. Die Fluoreszenz der Kolonien durch GFP Expression wurde mit UV-Licht und Tageslicht visualisiert. Da beide Kontrollen unter UV-Licht nicht floureszierten, sind sie in Abb. 68 (UV-Licht) nicht erkennbar.

Die *E. coli* DH5α Transformanden verhielten sich hinsichtlich der GFP-Fluoreszenz teilweise anders, als die im ‚primären' Screening identifizierten *E. coli* DH10b Genbankklone (Tab. 20). Daher wurden die *E. coli* DH10b Genbankklone nochmals kontrolliert.

Tab. 20 GFP-Fluoreszenz von *E. coli* DH10b Genbankklonen und DH5α Retransformanden. *E. coli* DH5α wurde mit verschiedenen Plasmiden (pEBP18_3-6Kb (P4)) der *E. coli* DH10b Genbank transformiert. Als Kontrolle dienten die *E. coli* DH10b Genbankklone. + + +, + +, + und ‚keine' spiegelt die Intensität der GFP-Fluoreszenz, visuell beurteilt, wider, wobei in erwartete Fluoreszenz (Spalte 2) und in tatsächliche Fluoreszenz beim Experiment (Spalte 3 und 4) unterschieden wurde.

pEBP18_3-6Kb (P4)	erwartete Fluoreszenz	Fluoreszenz DH10b	Fluoreszenz DH5α
BAI A2	+ + +	keine	keine
BAI A3	+ +	+ +	+ + +
BAI B1	+ + +	+	+ +
BAI B2	+ +	+ +	+ +
BAI D3	+	+	+ + +
BAI D4	+	+	+
BAI D7	keine	keine	keine
BAI D8	keine	keine	keine
BAII E12	+ + +	+ + +	+ + +

Bei der Betrachtung der Vollmedium-Agarplatten mit den ausplattierten Transformanden fiel nach einigen Tagen auf, dass teilweise eine Mischpopulation aus fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Kolonien entstanden war (Abb. 70).

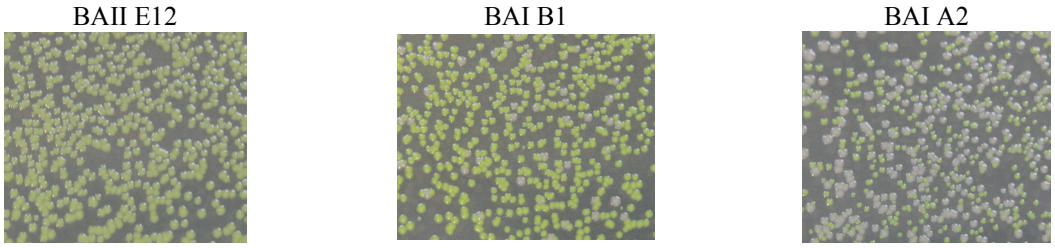


Abb. 70 *E. coli* DH5α Kolonien kultiviert auf Vollmedium nach Transformation mit verschiedenen Plasmiden (pEBP18_3-6Kb (P4)) der *E. coli* DH10b Genbank. *E. coli* DH5α wurde mit verschiedenen Plasmiden (pEBP18_3-6Kb (P4)) der *E. coli* DH10b Genbank transformiert und auf Vollmedium ausplattiert. Die Fluoreszenz der Kolonien der Transformationsansätze durch Expression von GFP wurde mit Tageslicht visualisiert.

Manche metagenomischen Inserts, wie im Beispiel von *E. coli* DH5α pEBP18_3-6Kb (P4) BAII E12, verursachten starke GFP-Fluoreszenz der Kolonien ohne Einfluss auf die Vitalität zu nehmen. Alle Kolonien der Transformation zeigten denselben Phänotyp. Andere Plasmide hingegen, die zuvor im Screening eine starke Fluoreszenz der *E. coli* DH10b Kolonien hervorriefen, verursachten Selektionsdruck und erzeugten in *E. coli* DH5α Mischpopulationen in unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 70). Das metagenomische Insert des Plasmids pEBP18_3-6Kb (P4) BAI B1 führte nach dessen Vermehrung in *E. coli* DH5α zu einer Mischpopulation aus vielen fluoreszierenden und nur wenigen nicht-fluoreszierenden Kolonien. Das metagenomische Insert von pEBP18_3-6Kb (P4) BAI A2 führte hingegen nach Vermehrung in *E. coli* DH5α zu ca. 50% großen, nicht-fluoreszierenden und kleinen, stark-fluoreszierenden Kolonien. Wahrscheinlich haben nicht-fluoreszierende Zellen einen Vorteil und überwachsen fluoreszierende Kolonien. Das Verhältnis von fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen, das in einer Kultur entsteht, kann unterschiedlich sein, wodurch verschiedene Intensität der GFP-Fluoreszenz während Screening und anschließender Kultivierung erklärbar wären (Tab. 20).

Exemplarisch wurden die Plasmide von zwei fluoreszierenden Kolonien und zwei großen, nicht-fluoreszierenden Kolonien von *E. coli* DH5α pEBP18_3-6Kb (P4) BAI A2 isoliert und über Restriktionsanalyse mit *Smi*I und AGE kontrolliert (Abb. 71). Es wurde ein Restriktionsmuster von 10,5 Kb Vektorrückrat und 5 Kb Insert-DNA erwartet.

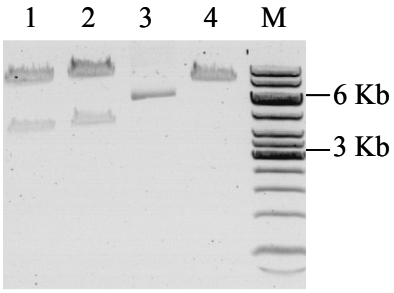


Abb. 71 Restriktionsanalyse der Plasmide von vier *E. coli* DH5α pEBP18_3-6Kb (P4) BAI A2 Klonen. *E. coli* DH5α wurde mit pEBP18_3-6Kb (P4) BAI A2 transformiert und auf Vollmedium ausplattiert. Die Plasmide von zwei fluoreszierenden Kolonien (Spur 1 und 2) sowie zwei nicht-fluoreszierender Kolonien (Spur 3 und 4) wurden isoliert und über Restriktionsanalyse mit *Smi*I und AGE (0,6% (w/v) Agarose, 150 V, 45 min) kontrolliert. M: *1 Kb DNA Ladder*.

Die beiden untersuchten nicht-fluoreszierenden Kolonien von *E. coli* DH5α pEBP18_ 3-6Kb (P4) BAI A2 entstanden durch eine massive Umorganisation (*rearrangement*) des gesamten Plasmids, sichtbar durch ein stark verändertes Restriktionsmuster. pEBP18_3-6Kb (P4) BAI A2 wurde durch die metagenomische Insert-DNA strukturell instabil. Dies spiegelte die Toxizität bzw. den Selektionsdruck durch die metagenomische DNA und der von ihr hervorgerufenen starken Überexpression von GFP wider.

Unter der Annahme, dass die Intensität der GFP-Fluoreszenz direkt abhängig von der gebildeten Menge an GFP ist, kann verschieden starke Fluoreszenz eine unterschiedlich starke GFP Expression widerspiegeln. In den *E. coli* DH5α-Stämmen sollte die GFP Expression mit der Erkennung von Promotoren in der metagenomischen Insert-DNA der Plasmide in Zusammenhang stehen, denn *E. coli* DH5α verfügt nicht über eine T7-RNA-Polymerase und die Expresson kann daher nicht über den plasmidkodierte T7 Promotor induziert sein [142, 144, 145, 297].

Exemplarisch wurde die GFP Expression in 50 mL Flüssigkulturen durch eine photometrische Messung der GFP-Fluoreszenz bestimmt (Abb. 72). Dabei diente die Expression in *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18 als Positivkontrolle. Sie wurde analog zur Expression der Reportergene durchgeführt (3.3.2) und die Expression durch das ‚T7-System' wurde mit 100 µM IPTG bei einer $OD_{600} = 1,1$ induziert. Die Probennahme erfolgte unmittelbar vor sowie 4 h und 21,5 h nach der Induktion. Die Zeitpunkte wurden als t_0, t_4 und $t_{21,5}$ festgelegt. Parallel dazu wurde die Expression in *E. coli* DH5α pEBP18 (Negativkontrolle) und in *E. coli* DH5α pEBP18_3-6Kb (P4) BAI A2 - BAII E12 verfolgt. Alle *E. coli* DH5α Kulturen wurden nicht mit IPTG versetzt. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten t_0, t_4 und $t_{21,5}$ genommen.

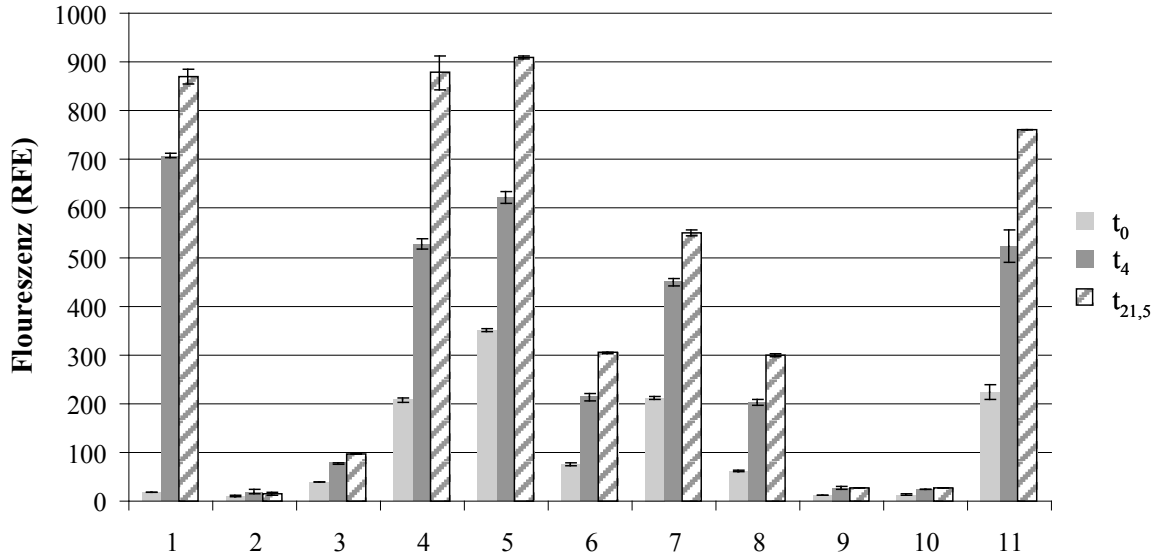


Abb. 72 Photometrische Messung der GFP-Fluoreszenz in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Die GFP-Fluoreszenz wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen, wobei sich die Zeitpunkte der Probennahme t_0, t_4 und $t_{21,5}$ auf die Expression von *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18 bezogen. t_0: Zeitpunkt vor der Induktion der Expression mit IPTG. t_4, $t_{21,5}$: 4 h und 21,5 h nach Induktion der Expression. 1: *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18 (Positivkontrolle). 2: *E. coli* DH5a pEBP18 (Negativkontrolle). 3-11: neun unterschiedliche *E. coli* DH5α pEBP18_3-6kb (P4) Stämme; BAI A2 (3), BAI A3 (4), BAI B1 (5), BAI B2 (6), BAI D3 (7), BAI D4 (8), BAI D7 (9), BAI D8 (10), BAII E12 (11). Die gemessene Fluoreszenz ist in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angegeben, wobei das Diagramm den Mittelwert und die Standard-Abweichung einer Doppelbestimmung zeigt.

Die gemessene Fluoreszenz korrelierte mit der visuellen Abschätzung (Abb. 69, Tab. 20), d.h. für Stämme die zuvor auf den Agar-Platten durch eine intensive gelbegrüne Färbung aufgefallen waren, konnte eine starke GFP-Fluoreszenz gemessen werden. Manche Stämme wie *E. coli* DH5α pEBP18_3-6kb (P4) BAI A2 (Abb. 72, #4) oder BAI A3 (Abb. 72, #5) fluoreszierten nach 21,5 h genauso stark wie *E. coli* BL21 (DE3) pEBP18 (Abb. 72, #1). Das Expressionsniveau von GFP durch die Insert-DNA scheint mit dem des ‚T7-Systems' vergleichbar zu sein. Andere Stämme fluoreszierten geringer (Abb. 72, #6-8 und #11) oder gar nicht (Abb. 72, #9 und #10). In der Kultur von *E. coli* DH5α pEBP18_3-6Kb (P4) BAI A2 (Abb. 72, #3) setzten sich massiv die nicht-fluoreszierenden Zellen durch, wodurch kaum Fluoreszenz gemessen werden konnte.

Die unterschiedliche Intensität der GFP-Fluoreszenz von *E. coli* DH5α pEBP18_3-6Kb Klonen spricht für unterschiedlich starke Promotoren, die in der metagenomischen Insert-DNA kodiert sind.

Von neun Kolonien, die während dem Screening der Genbanken in *E. coli* DH10b unterschiedlich starke GFP-Fluoreszenz entwickelten, wurde die Plasmid-DNA isoliert und über Restriktionsanalyse und AGE analysiert. Die Inserts der Plasmide waren divers (2-11,5 Kb). *E. coli* DH5α wurde mit den Plasmiden transformiert und die konstitutive GFP Expression wurde in Flüssigkulturen verfolgt. Auch die *E. coli* DH5α Transformanden fluoreszierten unterschiedlich stark. Die gemessene Fluoreszenz mancher Organismen war vergleichbar mit dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pEBP18, dessen GFP-Expression über einen starken T7 RNA Polymerase-abhängigen Promotor gesteuert wurde. Das Experiment zeigt das große Potential zur Entdeckung alternativer Promotoren im Metagenom.

3.5.3 Konstruktion und Screening von Metagenombanken in *P. putida* KT2440

3.5.3.1 Konstruktion von Metagenombanken in *P. putida* KT2440

Die Klone der drei *E. coli* DH10b Genbanken wurden abgeschwemmt und die Plasmid-DNA wurde isoliert. Anschließend wurden elektrokompetente *P. putida* KT2440 mit gemischten Plasmid-Präparationen (Plasmid *pools*) transformiert und auf selektivem Vollmedium mit Glukose angezogen. Die Transformationseffizienzen betrugen 10^4-10^5 *cfu*/µg. Das Experiment wurde mehrfach wiederholt, bis insgesamt ca. 8×10^4 Klone erhalten wurden. Die Plasmidanalyse zeigte, dass 20% der Transformanden den Leervektor enthielten und die Insert-DNA in Richtung kleiner Inserts verschoben war (nicht dargestellt). Die Insert-DNA der analysierten Plasmide betrug zwischen 2 Kb und 6 Kb mit einer durchschnittlichen Größe von 4 Kb. Die Gesamtgröße der Genbank wurde auf ca. 256 Mb metagenomische Insert-DNA geschätzt.

In *P. putida* KT2440 wurden Metagenombanken erzeugt, die insgesamt ca. 256 Mb metagenomische DNA repräsentierten. Die Insert-Größe der analysierten Plasmide betrug 2 Kb bis 6 Kb und im Durchschnitt 4 Kb.

3.5.3.2 Screening der Metagenombanken in *P. putida* KT2440

Die Transformanden wurden vom selektiven Vollmedium abgeschwemmt und in doppelter Klonzahl auf selektive Substratagar-Platten ausplattiert. Zwei Klone hatten Protease-Aktivität, was einer Detektionsfrequenz von einem Klon je 128 Mb metagenomischer Insert-DNA entsprach. Nach der Isolierung der Plasmide (pEBP18_3-6KB (P4)) wurde die

Insert-Größe durch eine Restriktionsanalyse mit *Smi*I und AGE für den Klon SM_{Pp} 1 auf 6 Kb und für den Klon SM_{Pp} 7 auf 3 Kb geschätzt. Insgesamt wurden 199 Klone mit potentieller Esterase-/Lipase-Aktivität identifiziert, aber die Plasmide wurden nicht näher analysiert. Auch wurde nicht überprüft, ob die Aktivitäten tatsächlich Vektor-assoziiert waren. Sollten alle Klone Vektor-assoziierte Esterase-/Lipase-Aktivität besitzen, läge die Detektionsfrequenz bei einem Klon je 1,3 Mb metagenomischer Insert-DNA. Es wurden keine Klone mit Hämolyse-Aktivität, GFP-Fluoreszenz oder Pigment-Produktion nachgewiesen.

In *P. putida* KT2440 konnten einige Klone mit Protease-Aktivität und viele Klone mit Esterase-/Lipase-Aktivität identifiziert werden.

3.5.3.3 Unterscheidung zwischen Esterase- und Lipase-Aktivität

Kolonien mit Hofbildung auf Tributyrin-Agar wurden gesichert, in Flüssigkulturen angezogen (2.9) und noch einmal auf Tributyrin-Agar (2.12.4) und Rhodamin B-Agar (2.12.5) kultiviert, um zwischen Esterase- und Lipase-Aktivität zu unterscheiden. Bei der Kultivierung fiel auf, dass die Kolonien unterschiedliche Pigmentierungen besaßen. Exemplarisch sind *P. putida* KT2440 pEBP18_3-6KB (P4) TBIII B1-B12 in Abb. 73 dargestellt.

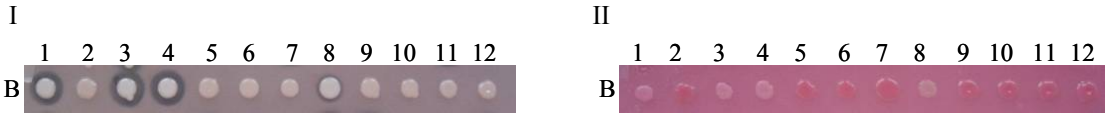


Abb. 73 *P. putida* KT2440 Kolonien nach Transformation mit verschiedenen Plasmiden (pEBP18_3-6Kb (P4)) der *E. coli* DH10b Genbank auf Tributyrin-Agar und Rhodamin B-Agar. *P. putida* KT2440 wurde mit gemischten Plasmid-Präparationen (pEBP18_3-6Kb (P4)) der *E. coli* DH10b Genbank transformiert und nach Selektion auf Vollmedium auf Tributyrin-Agar (I) und Rhodoamin B-Agar (II) ausplattiert. Exemplarisch ist *P. putida* KT2440 pEBP18_3-6KB (P4) TBIII B1-B12 dargestellt. Die Dokumentation erfolgte bei Tageslicht.

P. putida KT2440 pEBP18_3-6KB (P4) Klon TBIII B1, B3, B4 und B8 hydrolysierten Tributyrin unterschiedlich stark. Die Kolonien waren leicht weißlich gefärbt. Möglicherweise wurde dies durch die Expression der lipolytischen Enzyme hervorgerufen. Die anderen Klone hatten die für *P. putida* typische, unpigmentierte Morphologie, wobei nur Klon TBIII B11 einen minimalen Hydrolysehof bildete, der allerdings in Abb. 73 nicht sichtbar ist. Bei der Betrachtung des Rhodamin B-Agars unter UV-Licht hatten Klon TBIII B1, B3 und B4 einen gelb-fluoreszierenden Hof (nicht dargestellt). Demnach exprimierten *P. putida* KT2440 pEBP18_3-6Kb (P4) TBIII B8 und B11 eine Esterase, während

P. putida KT2440 pEBP18_3-6Kb (P4) TBIII B1, B3 und B4 Lipase-Aktivität besaßen. Die Plasmide wurden nicht isoliert und über Restriktionsanalyse überprüft.

Insgesamt konnten potentiell 199 Klone mit Aktivität auf Tributyrin-Agar identifiziert werden, wobei 153 dieser Klone auch Aktivität auf Rhodamin B-Agar zeigten.

3.6 ‚Kreuz-Expression'

Verschiedene bakterielle Wirte haben unterschiedliches metabolisches und regulatorisches Potential [110, 118, 124, 218], wodurch nicht alle Biokatalysatoren äquivalent in verschiedenen Organismen exprimiert werden. So wird beispielsweise die Fähigkeit Promotoren zu erkennen von Sigmafaktoren bestimmt und die Anzahl von identifizierten Sigmafaktoren innerhalb bakterieller Genome variiert extrem. In *E. coli* sind sieben Sigmafaktoren beschrieben, während in *B. subtilis* 18 und in *P. putida* sogar 24 vorhergesagt wurden [116]. Neben Promotorerkennung und Transkriptelongation sind Translation [5, 88, 281, 282], korrekte Proteinfaltung [90-92] und ggf. posttranslationale Modifizierungen [89, 93, 94] von entscheidender Bedeutung. Computer-Vorhersagen zufolge sind im Durchschnitt nur ca. 40% aller Gene in *E. coli* zu exprimieren, wobei, abhängig von der Herkunft der Gene, große Schwankungen existieren. Während beispielsweise 73% der Gene von Bakterien der Abteilung *Firmicutes* als exprimierbar klassifiziert wurden, traf dies auf nur 7% der Gene von Bakterien der Abteilung *Actinobacteria* zu [374]. Daher ist es unwahrscheinlich, dass ein Plasmid mit metagenomischer Insert-DNA, das in *E. coli* zur Expression eines aktiven Biokatalysators führt, nach der Transformation von *P. putida* oder *B. subtilis* denselben Phänotyp hervorruft. Dasselbe gilt natürlich auch im umgekehrten Fall (*vic versa*). Wahrscheinlich werden nur die wenigsten Enzyme aktiv in zwei oder sogar drei verschiedenen Wirten exprimiert, insbesondere wenn die Organismen zu unterschiedlichen bakteriellen Klassen oder sogar Phyla gehören. Dieser Gedanke ist in Abb. 74 visualisiert.

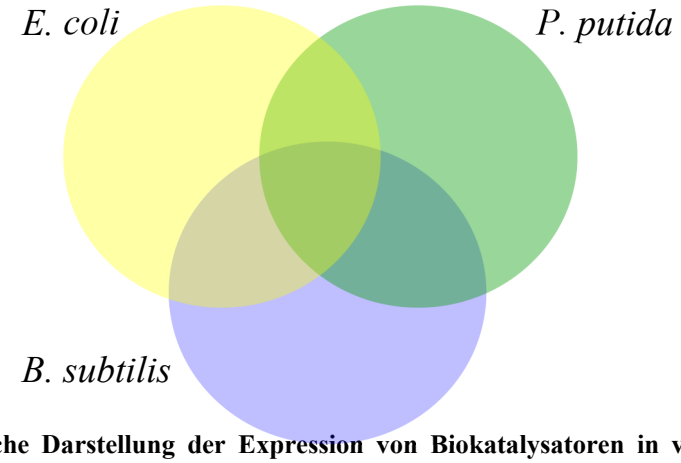


Abb. 74 Schematische Darstellung der Expression von Biokatalysatoren in verschiedenen Wirten. Nicht jedes Enzym wird aktiv in jedem Wirt exprimiert. Die Schnittflächen symbolisieren überlappendes Expressionspotential von verschiedenen Organismen.

Gestützt wird die Hypothese von Experimenten, in denen Shuttle-Vektoren verwendet und die Expression von aktiven Proteinen in unterschiedlichen Wirten vergleichend analysiert wurden [93, 118, 124, 218, 375]. Weitere Argumente liefern Studien über aktivitätsbasierte Screenings von Metagenombanken in verschiedenen Organismen [66, 110]. Ein eindrucksvolles Beispiel ist das Screening von Metagenombanken durch Komplementation in *Sinorhizobium meliloti* Rm11107 und in *E. coli* LS5218. Beide defizienten Stämme konnten nicht auf Hydroxybutyrat als einzige Kohlenstoffquelle wachsen. Die Genbanken wurde aus metagenomischer DNA aus Aktivschlamm (*activated sludge*) und Erdboden (*soil*) konstruiert. Die Durchmusterung in *S. meliloti* Rm11107 identifizierte 25 Klone, die auf D-3-Hydroxybutyrat als einzige Kohlenstoffquelle wuchsen. Allerdings komplementierte nur ein einziges dieser 25 Plasmide *E. coli* LS5218. Beim Screening der Genbanken in *E. coli* LS5218 wurden insgesamt neun Klone mit D-3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase-Aktivität gefunden, wobei kein identifiziertes Plasmid *S. meliloti* Rm11107 komplementierten konnte [112].

Um zu überprüfen, ob die Proteine nur in einem Wirt oder sogar in zwei oder drei verschiedenen Organismen aktiv exprimiert werden, wurden exemplarisch einige Plasmide ausgewählt. Sie stammten von aktiven Klonen der *E. coli* DH10b und *P. putida* KT2440 Genbanken. *E. coli* DH5α wurde über chemische Kompetenz (2.23.4), *P. putida* KT2440 über Elektroporation (2.23.7) und *B. subtilis* TEB1030 über die Ausnutzung seiner natürlichen Kompetenz (2.23.6) transformiert. Die Transformanden wurden auf selektivem Vollmedium angezogen und anschließend auf verschiedene Substratagar-Platten überpickt und auf Funktionalität überprüft (Tab. 21).

Tab. 21 Aktivitäten der ‚Kreuz-Expression'. Die drei Wirte *E. coli* DH5α, *P. putida* KT2440 und *B. subtilis* TEB1030 wurden mit verschiedenen Plasmiden von aktiven Klonen der *E. coli* DH10b oder *P. putida* KT2440 Genbank transformiert. Die Herkunft der Plasmide (pEBP18_3-6Kb (P4)) ist sowohl durch den Namen gekennzeichnet (Ec: *E. coli*, Pp: *P. putida*) als auch noch einmal in Spalte 2 angegeben. Spalte 3 gibt Auskunft über die gefundene Aktivität im ‚primären' Screening. ‚keine', +, + + und + + + spiegelt die Stärke der (hydrolytischen) Aktivität bzw. die Größe des gebildeten Hofs der Kolonie wider. Die Aktivitäten der Transformanden sind in Spalte 4-6 angegeben. BA: Blutagar. SM: *skim milk*-Agar. TB: Tributyrin-Agar. DH10b, DH5α: *E. coli* DH10b und DH5α. KT2440: *P. putida* KT2440. TEB1030: *B. subtilis* TEB1030. keine *cfu*: keine Kolonie-bildende Einheiten (Transformanden). *: Wahrscheinlich kam es nach der Transformation zur Bildung eines toxischen Genprodukts, wodurch keine Transformanden entstanden.

Plasmid	Wirt (Screening)	Erwartete Aktivität	Aktivität in		
			DH5α	KT2440	TEB1030
TB_{Ec} 94	DH10b	+ +	+ +	keine	keine
TB_{Ec} 157	DH10b	+ + +	+ + +	keine	keine
BA_{Ec} 343	DH10b	+ + +	+ + +	keine	keine
BA_{Ec} 458	DH10b	Pigment (+ + +)	+ + +	+ + +	keine
SM_{Ec} 321	DH10b	+	+	keine	keine
SM_{Ec} VIII E12	DH10b	+	+	keine	keine
SM_{Ec} 679	DH10b	+ +	+ +	+ +	keine *cfu**
SM_{Pp} 1	KT2440	+ + +	keine	+ + +	keine
SM_{Pp} 7	KT2440	+	+	+	keine

Singuläre und überlappende Aktivitäten der Wirte nach der Transformation mit ausgewählten rekombinanten Plasmiden sind noch einmal in Abb. 75 veranschaulicht.

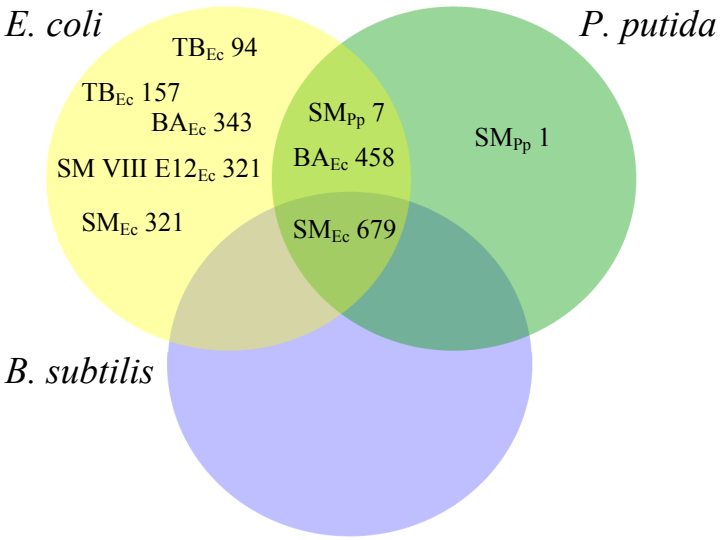


Abb. 75 Schematische Darstellung der Ergebnisse der ‚Kreuz-Expression'. Nicht jedes Enzym wird aktiv in jedem Wirt exprimiert. Als Wirte wurden *E. coli* DH5α, *P. putida* KT2440 und *B. subtilis* TEB1030 in Kombination mit ausgewählten Plasmiden (pEBP18_3-6Kb (P4)) der Metagenombanken verwendet. Die Herkunft der Plasmide ist durch den Namen gekennzeichnet (Ec: *E. coli*, Pp: *P. putida*). BA: Blutagar. SM: *skim milk*-Agar. TB: Tributyrin-Agar. Die Schnittflächen symbolisieren überlappende Aktivität in den jeweiligen Organismen.

Erwartungsgemäß vermittelten die meisten Plasmide eine Aktivität des Biokatalysators nur in einem Wirt. *E. coli* und *P. putida* sind γ-Proteobakterien und relativ nah verwandt,

wodurch sich eine gewisse Übereinstimmung bei der Expression von Biokatalysatoren ergibt. Von neun verschiedenen metagenomischen DNA-Inserts wurden drei verschiedene Aktivitäten in beiden heterologen Wirten detektiert. Hingegen ist *B. subtilis* ein Gram-positiver Organismus und gehört zur Abteilung *Firmicutes*. Daher überrascht es nicht, dass die metagenomische DNA nicht funktional exprimiert wurde und kein überlappendes Expressionspotential zwischen *E. coli* und *B. subtilis* bzw. *P. putida* und *B. subtilis* festgestellt werden konnte. Die einzige Ausnahme ist Plasmid pEBP18_3-6Kb (P4) SM_{Ec} 679. Obwohl die Transformation mehrfach mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen wiederholt wurde und mit dem Kontrollvektor pEBP18 erfolgreich verlief, konnten keine pEBP18_3-6Kb (P4) SM_{Ec} 679 Transformanden erhalten werden. Wahrscheinlich wurde die DNA zwar in *B. subtilis* aufgenommen und es fand Rekombination mit dem Chromosom statt, doch die Expression der Protease war toxisch, wodurch die Bildung von Kolonien verhindert wurde. Generell werden Proteasen nur sehr selten in funktionsbasierten Screenings erhalten [52, 56, 100, 376]. Mögliche Ursachen dafür sind, dass Promotoren nicht erkannt werden, Proteasen als inaktive Proteine synthetisiert werden, oder intrazelluläre und aktive Proteasen toxisch für den Wirt sein können. Die Identifizierung von gleich sieben Plasmiden, die für Protease-Aktivität kodieren, ist außergewöhnlich. Es ist ein Hinweis darauf, dass (*i*) das Metagenom ‚Schlachthof' zur Identifizierung von proteolytischen Enzymen geeignet ist und (*ii*) das DNA von Flavobakterien und Chryseobakterien in *E. coli* oder *P. putida* exprimierbar ist.

pEBP18 integrierte über homologe Sequenzen in das nicht-essenzielle Amylasegen des *B. subtilis* Chromosoms, wobei die Transformation über die Ausnutzung der natürlichen Kompetenz zwar zuverlässig ablief, die erzielten Transformationseffizienzen aber mit 10^0-10^2 *cfu*/µg Plasmid niedrig waren (Ergebnisse nicht dargestellt). Daher wurden auch keine Genbanken in *B. subtilis* TEB1030 erzeugt. Wahrscheinlich würde aber genau dies zur Identifizierung von Biokatalysatoren führen, die in den Screenings der Metagenom-banken in *E. coli* und *P. putida* aufgrund von fehlender Aktivität nicht detektiert werden konnten. Zur Erzeugung von Genbanken in *B. subtilis* wäre daher ein Shuttle-Vektor, der als episomales Plasmid vorliegt, besser geeignet. Vorteile gegenüber integrativen Vektoren wären neben einer effizienteren Transformation der Bakterien über Protoplastierung [261], auch eine gesteigerte Gendosis [88]. Daher wurde die Konstruktion von pEBP-Derivaten, die als episomale Plasmide in *B. subtilis* vorlagen, im Rahmen von zwei Diplomarbeiten realisiert. Mittlerweile sind Vorläufer-Plasmide wie pEBP40 [213] und pEBP42 [214], aber auch die optimierte Variante pEBP41 [214], verfügbar.

Von neun verschiedenen rekombinanten Plasmiden mit metagenomischer Insert-DNA wurden drei verschiedene Aktivitäten in den Gram-negativen Wirten *E. coli* DH5α und *P. putida* KT2440 detektiert. Im Gram-positiven *B. subtilis* konnte keine Aktivität festgestellt werden, wobei ein rekombinantes Plasmid nach der Transformation höchst wahrscheinlich ein toxisches Genprodukt erzeugte und keine Transformanden erhalten werden konnten. Das Experiment verdeutlicht die Wichtigkeit der Verwendung von Shuttle-Vektoren und die kombinierte Durchmusterung von Genbanken in verschiedenen Wirten, um eine möglichst große Anzahl verschiedener Biokatalysatoren zu identifizieren.

4 Literaturverzeichnis

Die im Literaturverzeichnis aufgeführten Publikationen entsprechen den Angaben der Autoren.

1. **Madigan, M.T. and Martinko, T.J.** (2006) Brock Mikrobiologie. Pearson Studium, München.
2. **Lovett, P.S. and Schoner, R.G.** (1983) Expression plasmid for *B. subtilis*. *Gene Amplif Anal* 3, 117-134.
3. **Grosjean, H. and Fiers, W.** (1982) Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene* 18 (3), 199-209.
4. **Gouy, M. and Gautier, C.** (1982) Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res* 10 (22), 7055-7074.
5. **Gustafsson, C., Govindarajan, S. and Minshull, J.** (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22 (7), 346-353.
6. **Hohn, B. and Collins, J.** (1980) A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* 11 (3-4), 291-298.
7. **Cronan, J.E.** (2003) Cosmid-based system for transient expression and absolute off-to-on transcriptional control of *Escherichia coli* genes. *J Bacteriol* 185 (22), 6522-6529.
8. **Brady, G., Jantzen, H.M., Bernard, H.U., Brown, R., Schütz, G. and Hashimoto-Gotoh, T.** (1984) New cosmid vectors developed for eukaryotic DNA cloning. *Gene* 27 (2), 223-232.
9. **Chia, W., Scott, M.R. and Rigby, P.W.** (1982) The construction of cosmid libraries of eukaryotic DNA using the Homer series of vectors. *Nucleic Acids Res* 10 (8), 2503-2520.
10. **Kim, U.-J., Shizuya, H., de Jong, P.J., Birren, B. and Simon, M.I.** (1992) Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res* 20 (5), 1083-1085.
11. **Leipold, R.J., Krewson, C.E. and Dhurjati, P.** (1994) Mathematical model of temperature-sensitive plasmid replication. *Plasmid* 32 (2), 131-167.
12. **Kiewiet, R., Kok, J., Seegers, J.F.M.L., Venema, G. and Bron, S.** (1993) The mode of replication is a major factor in segregational plasmid instability in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 59 (2), 358-364.
13. **Friehs, K.** (2004) Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 86, 47-82.
14. **Agaphonov, M.O., Trushkina, P.M., Sohn, J.-H., Choi, E.-S., Rhee, S.-K. and Ter-Avanesyan, M.D.** (1999) Vectors for rapid selection of integrants with different plasmid copy numbers in the yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *Yeast* 15 (7), 541-551.
15. **Mayer, M.P.** (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163 (1), 41-46.
16. **Shimotsu, H. and Henner, D.J.** (1986) Construction of a single-copy integration vector and its use in analysis of regulation of the *trp* operon of *Bacillus subtilis*. *Gene* 43 (1-2), 85-94.
17. **Ferrari, F.A., Nguyen, A., Lang, D. and Hoch, J.A.** (1983) Construction and properties of an integrable plasmid for *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 154 (3), 1513-1515.
18. **Itaya, M.** (1993) Integration of repeated sequences (pBR322) in the *Bacillus subtilis* 168 chromosome without affecting the genome structure. *Mol Gen Genet* 241 (3-4), 287-297.
19. **Bron, S., Luxen, E. and Swart, P.** (1988) Instability of recombinant pUB110 plasmids in *Bacillus subtilis*: plasmid-encoded stability function and effects of DNA inserts. *Plasmid* 19 (3), 231-241.
20. **Primrose, S.B. and Ehrlich, S.D.** (1981) Isolation of plasmid deletion mutants and study of their instability. *Plasmid* 6 (2), 193-201.
21. **Bankier, A.T.** (2001) Shotgun DNA sequencing. *Methods Mol Biol* 167, 89-100.
22. **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., *et al.*** (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304 (5667), 66-74.
23. **Schloss, P.D. and Handelsman, J.** (2005) Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol* 6 (8), 229.
24. **Alexander, S.K. and Strete, D.** (2006) Mikrobiologisches Grundpraktikum: Ein Farbatlas Pearson Studium, München.

25. **Karl, D.M.** (2007) Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. *Nat Rev Microbiol* 5 (10), 759-769.
26. **Voet, D.J., Voet, J.G. and Pratt, C.W.** (2002) Lehrbuch der Biochemie. Wiley-VCH, Weinheim.
27. **Cowan, D.A.** (2000) Microbial genomes - the untapped resource. *Trends Biotechnol* 18 (1), 14-16.
28. **Curtis, T.P. and Sloan, W.T.** (2005) Microbiology. Exploring microbial diversity - a vast below. *Science* 309 (5739), 1331-1333.
29. **Ellis, D.G., Bizzoco, R.W. and Kelley, S.T.** (2008) Halophilic *Archaea* determined from geothermal steam vent aerosols. *Environ Microbiol* 10 (6), 1582-1590.
30. **Antranikian, G., Vorgias, C.E. and Bertoldo, C.** (2005) Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 96, 219-262.
31. **Johnson, D.B. and Hallberg, K.B.** (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Res Microbiol* 154 (7), 466-473.
32. **Thomas, D.N. and Dieckmann, G.S.** (2002) Antarctic Sea ice - a habitat for extremophiles. *Science* 295 (5555), 641-644.
33. **van den Burg, B.** (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 6 (3), 213-218.
34. **Marrs, B., Delagrave, S. and Murphy, D.** (1999) Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Curr Opin Microbiol* 2 (3), 241-245.
35. **Lorenz, P. and Eck, J.** (2005) Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* 3 (6), 510-516.
36. **Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H.** (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59 (1), 143-169.
37. **Galvão, T.C., Mohn, W.W. and de Lorenzo, V.** (2005) Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. *Trends Biotechnol* 23 (10), 497-506.
38. **Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J. and Goodman, R.M.** (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5 (10), 245-249.
39. **Langer, M., Gabor, E.M., Liebeton, K., Meurer, G., Niehaus, F., Schulze, R., Eck, J. and Lorenz, P.** (2006) Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. *Biotechnol J* 1 (7-8), 815-821.
40. **Handelsman, J.** (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (4), 669-685.
41. **Glass, G.V.** (1976) Primary, secondary, and meta-analysis of research. *Educ Res* 5, 3–8.
42. **Mahner, M. and Kary, M.** (1997) What exactly are genomes, genotypes and phenotypes? And what about phenomes? *J Theor Biol* 186 (1), 55-63.
43. **Ferrer, M., Martínez-Abarca, F. and Golyshin, P.N.** (2005) Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol* 16 (6), 588-593.
44. **Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D. and Handelsman, J.** (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* 38, 525-552.
45. **Vieites, J.M., Guazzaroni, M.-E., Beloqui, A., Golyshin, P.N. and Ferrer, M.** (2009) Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 33 (1), 236-255.
46. **Rajendhran, J. and Gunasekaran, P.** (2008) Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnol Adv* 26 (6), 576-590.
47. **Roberts, S.M.** (2003) Biocatalysts in synthetic organic chemistry. *Tetrahedron* 60, 499-500.
48. **Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B.** (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409 (6817), 258-268.
49. **Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J.D., Steele, H.L., Reymond, J.-L., Jaeger, K.-E. and Streit, W.R.** (2006) Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microbiol* 72 (5), 3637-3645.
50. **Lee, S.-W., Won, K., Lim, H.K., Kim, J.-C., Choi, G.J. and Cho, K.Y.** (2004) Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 65 (6), 720-726.
51. **Richardson, T.H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., Macomber, J., Short, J.M., Robertson, D.E. and Miller, C.** (2002) A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *J Biol Chem* 277 (29), 26501-26507.
52. **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., *et al.* (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 66 (6), 2541-2547.

53. **Schmeisser, C., Stöckigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D.F., Flemming, H.C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.-E., *et al.*** (2003) Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl Environ Microbiol* 69 (12), 7298-7309.
54. **Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.-E. and Streit, W.R.** (2003) Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol* 69 (10), 6235-6242.
55. **Cottrell, M.T., Moore, J.A. and Kirchman, D.L.** (1999) Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 65 (6), 2553-2557.
56. **Lämmle, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C., Brunner, H. and Rupp, S.** (2007) Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *J Biotechnol* 127 (4), 575-592.
57. **Rees, H.C., Grant, S., Jones, B., Grant, W.D. and Heaphy, S.** (2003) Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. *Extremophiles* 7 (5), 415-421.
58. **Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T. and 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.
59. **Gabor, E.M., de Vries, E.J. and Janssen, D.B.** (2004) Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environ Microbiol* 6 (9), 948-958.
60. **Gabor, E.M., de Vries, E.J. and Janssen, D.B.** (2005) A novel penicillin acylase from the environmental gene pool with improved synthetic properties. *Enzyme Microb Technol* 36 (2-3), 182-190.
61. **Steele, H.L., Jaeger, K.-E., Daniel, R. and Streit, W.R.** (2009) Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16 (1-2), 25-37.
62. **Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A. and Golyshin, P.N.** (2007) Mining enzymes from extreme environments. *Curr Opin Microbiol* 10 (3), 207-214.
63. **Cava, F., Hidalgo, A. and Berenguer, J.** (2009) *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* 13 (2), 213-231.
64. **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. and Banfield, J.F.** (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428 (6978), 37-43.
65. **Whitman, W.B., Coleman, D.C. and Wiebe, W.J.** (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (12), 6578-6583.
66. **Courtois, S., Cappellano, C.M., Ball, M., Francou, F.-X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S.J., Hopke, J., Osburne, M.S., *et al.*** (2003) Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol* 69 (1), 49-55.
67. **Gans, J., Wolinsky, M. and Dunbar, J.** (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309 (5739), 1387-1390.
68. **Green, B.D. and Keller, M.** (2006) Capturing the uncultivated majority. *Curr Opin Biotechnol* 17 (3), 236-240.
69. **Daniel, R.** (2005) The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol* 3 (6), 470-478.
70. **Handelsman, J.** (2005) Sorting out metagenomes. *Nat Biotechnol* 23 (1), 38-39.
71. **Schloss, P.D. and Handelsman, J.** (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* 14 (3), 303-310.
72. **Brennan, Y., Callen, W.N., Christoffersen, L., Dupree, P., Goubet, F., Healey, S., Hernández, M., Keller, M., Li, K., Palackal, N., *et al.*** (2004) Unusual microbial xylanases from insect guts. *Appl Environ Microbiol* 70 (6), 3609-3617.
73. **Knietsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., Henne, A. and 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), 1408-1416.
74. **Brady, S.F., Chao, C.J., Handelsman, J. and Clardy, J.** (2001) Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Org Lett* 3 (13), 1981-1984.

75. **Zhou, J., Bruns, M.A. and Tiedje, J.M.** (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62 (2), 316-322.
76. **Tien, C.C., Chao, C.C. and Chao, W.L.** (2001) Methods for DNA extraction from various soils: a comparison. *J Appl Microbiol* 86 (6), 937-943.
77. **Roh, C., Villatte, F., Kim, B.-G. and Schmid, R.D.** (2006) Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. *Appl Biochem Biotechnol* 134 (2), 97-112.
78. **Hurt, R.A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M. and Zhou, J.** (2001) Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl Environ Microbiol* 67 (10), 4495-4503.
79. **Frostegård, Å., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X. and Simonet, P.** (1999) Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl Environ Microbiol* 65 (12), 5409-5420.
80. **Cardenas, E. and Tiedje, J.M.** (2008) New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 19 (6), 544-549.
81. **Kannan, N., Taylor, S.S., Zhai, Y., Venter, J.C. and Manning, G.** (2007) Structural and functional diversity of the microbial kinome. *PLoS Biol* 5 (3), e17.
82. **Harrington, E.D., Singh, A.H., Doerks, T., Letunic, I., von Mering, C., Jensen, L.J., Raes, J. and Bork, P.** (2007) Quantitative assessment of protein function prediction from metagenomics shotgun sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (35), 13913-13918.
83. **Yooseph, S., Sutton, G., Rusch, D.B., Halpern, A.L., Williamson, S.J., Remington, K., Eisen, J.A., Heidelberg, K.B., Manning, G., Li, W., *et al.*** (2007) The *Sorcerer II* Global Ocean Sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biol* 5 (3), e16.
84. **Bohannon, J.** (2007) Metagenomics. Ocean study yields a tidal wave of microbial DNA. *Science* 315 (5818), 1486-1487.
85. **Streit, W.R. and Schmitz, R.A.** (2004) Metagenomics - the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol* 7 (5), 492-498.
86. **Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N.** (2009) Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16 (1-2), 109-123.
87. **Sørensen, H.P. and Mortensen, K.K.** (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 115 (2), 113-128.
88. **Jana, S. and Deb, J.K.** (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67 (3), 289-298.
89. **Makrides, S.C.** (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60 (3), 512-538.
90. **Weickert, M.J., Doherty, D.H., Best, E.A. and Olins, P.O.** (1996) Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 7 (5), 494-499.
91. **Ferrer, M., Chernikova, T.N., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N. and Timmis, K.N.** (2003) Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat Biotechnol* 21 (11), 1266-1267.
92. **Georgiou, G. and Segatori, L.** (2005) Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr Opin Biotechnol* 16 (5), 538-545.
93. **Perlova, O., Fu, J., Kuhlmann, S., Krug, D., Stewart, A.F., Zhang, Y. and Müller, R.** (2006) Reconstitution of the myxothiazol biosynthetic gene cluster by Red/ET recombination and heterologous expression in *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol* 72 (12), 7485-7494.
94. **Li, W., Zhou, X. and Lu, P.** (2004) Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* 155 (8), 605-610.
95. **Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T. and Watanabe, K.** (2005) Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol* 23 (1), 88-93.
96. **Uchiyama, T. and Watanabe, K.** (2008) Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries. *Nat Protoc* 3 (7), 1202-1212.
97. **Williamson, L.L., Borlee, B.R., Schloss, P.D., Guan, C., Allen, H.K. and Handelsman, J.** (2005) Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Appl Environ Microbiol* 71 (10), 6335-6344.
98. **Henne, A., Schmitz, R.A., Bömeke, M., Gottschalk, G. and Daniel, R.** (2000) Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66 (7), 3113-3116.
99. **Knietsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., Henne, A. and Daniel, R.** (2003)

Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 5 (1), 46-56.

100. **Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P.** (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 59 (1), 15-32.
101. **Gabor, E., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J. and Lorenz, P.** (2007) Updating the metagenomics toolbox. *Biotechnol J* 2 (2), 201-206.
102. **Altenbuchner, J., Viell, P. and Pelletier, I.** (1992) Positive selection vectors based on palindromic DNA sequences. *Methods Enzymol* 216, 457-466.
103. **Ermolaeva, M.D., Khalak, H.G., White, O., Smith, H.O. and Salzberg, S.L.** (2000) Prediction of transcription terminators in bacterial genomes. *J Mol Biol* 301 (1), 27-33.
104. **Markert, A.** (2008) Etablierung eines neuen T7 RNA-Polymerase-abhängigen Expressionssystems zur koordinierten Expression aller Gene einer Genregion. Dissertation. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät), Düsseldorf.
105. **Leggewie, C., Henning, H., Schmeisser, C., Streit, W.R. and Jaeger, K.-E.** (2006) A novel transposon for functional expression of DNA libraries. *J Biotechnol* 123 (3), 281-287.
106. **Jeng, S.-T., Gardner, J.F. and Gumport, R.I.** (1990) Transcription termination by bacteriophage T7 RNA polymerase at rho-independent terminators. *J Biol Chem* 265 (7), 3823-3830.
107. **Hoffmann, F. and Rinas, U.** (2004) Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 89, 143-161.
108. **Lund, P.A.** (2001) Microbial molecular chaperones. *Adv Microb Physiol* 44, 93-140.
109. **Thomas, J.G., Ayling, A. and Baneyx, F.** (1997) Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* 66 (3), 197-238.
110. **Martinez, A., Kolvek, S.J., Yip, C.L.T., Hopke, J., Brown, K.A., MacNeil, I.A. and Osburne, M.S.** (2004) Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. *Appl Environ Microbiol* 70 (4), 2452-2463.
111. **Li, Y., Wexler, M., Richardson, D.J., Bond, P.L. and Johnston, A.W.B.** (2005) Screening a wide host-range, waste-water metagenomic library in tryptophan auxotrophs of *Rhizobium leguminosarum* and of *Escherichia coli* reveals different classes of cloned *trp* genes. *Environ Microbiol* 7 (12), 1927-1936.
112. **Wang, C., Meek, D.J., Panchal, P., Boruvka, N., Archibald, F.S., Driscoll, B.T. and Charles, T.C.** (2006) Isolation of poly-3-hydroxybutyrate metabolism genes from complex microbial communities by phenotypic complementation of bacterial mutants. *Appl Environ Microbiol* 72 (1), 384-391.
113. **Ono, A., Miyazaki, R., Sota, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y. and Tsuda, M.** (2007) Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* 74 (2), 501-510.
114. **Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., *et al.*** (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbio.* 4 (12), 799-808.
115. **Jiménez, J.I., Miñambres , B., García, J.L. and Díaz, E.** (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4 824-841.
116. **Martínez-Bueno, M.A., Tobes, R., Rey, M. and Ramos, J.-L.** (2002) Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ Microbiol* 4 (12), 842-855.
117. **Wenzel, S.C., Gross, F., Zhang, Y., Fu, J., Stewart, A.F. and Müller, R.** (2005) Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via *red/ET* recombineering. *Chem Biol* 12 (3), 349-356.
118. **Gross, F., Luniak, N., Perlova, O., Gaitatzis, N., Jenke-Kodama, H., Gerth, K., Gottschalk, D., Dittmann, E. and Müller, R.** (2006) Bacterial type III polyketide synthases: phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads. *Arch Microbiol* 185 (1), 28-38.

119. **Zhang, H., Wang, Y. and Pfeifer, B.A.** (2008) Bacterial hosts for natural product production. *Mol Pharm* 5 (2), 212-225.
120. **Schmidt, F.R.** (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 65 (4), 363-372.
121. **Terpe, K.** (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 72 (2), 211-222.
122. **Bolhuis, A., Tjalsma, H., Smith, H.E., de Jong, A., Meima, R., Venema, G., Bron, S. and van Dijl, J.M.** (1999) Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 65 (7), 2934-2941.
123. **Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., *et al.*** (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390 (6657), 249-256.
124. **Doekel, S., Eppelmann, K. and Marahiel, M.A.** (2002) Heterologous expression of nonribosomal peptide synthetases in *B. subtilis*: construction of a bi-functional *B. subtilis*/*E. coli* shuttle vector system. *FEMS Microbiol Lett* 216 (2), 185-191.
125. **Ferreira, L.C.S., Ferreira, R.C.C. and Schumann, W.** (2005) *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. *An Acad Bras Cienc* 77 (1), 113-124.
126. **Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., *et al.*** (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32 (4), 1363-1371.
127. **Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Zagorec, M., Rose, M., Klier, A. and Rapoport, G.** (1997) Induction of the *Bacillus subtilis ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol Microbiol* 25 (1), 65-78.
128. **Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd and Peterson, K.M.** (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166 (1), 175-176.
129. **Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T. and Eggert, T.** (2006) Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol* 362 (3), 393-402.
130. **Itoh, N., Koide, Y., Fukuzawa, H., Hirose, S. and Inukai, T.** (1991) Novel plasmid vectors for gene cloning in *Pseudomonas*. *J Biochem* 110 (4), 614-621.
131. **Itoh, N., Kawanami, T., Nitta, C., Iwata, N., Usami, S., Abe, Y. and Koide, Y.** (2003) Characterization of pNI10 plasmid in *Pseudomonas*, and the construction of an improved *Escherichia* and *Pseudomonas* shuttle vector, pNUK73. *Appl Microbiol Biotechnol* 61 (3), 240-246.
132. **Gryczan, T.J., Contente, S. and Dubnau, D.** (1978) Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 134 (1), 318-329.
133. **Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 (1), 103-119.
134. **Wahl, G.M., Lewis, K.A., Ruiz, J.C., Rothenberg, B., Zhao, J. and Evans, G.A.** (1987) Cosmid vectors for rapid genomic walking, restriction mapping, and gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (8), 2160-2164.
135. **Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G.** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59 (3), 695-700.
136. **Kane, M.D., Poulsen, L.K. and 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 (3), 682-686.
137. **Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. and Noller, H.F.** (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 148 (2), 107-127.
138. **van Hannen, E.J., Mooij, W., van Agterveld, M.P., Gons, H.J. and 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.
139. **Hinc, K., Iwanicki, A., Seror, S. and Obuchowski, M.** (2006) Mapping of a transcription promoter located inside the *priA* gene of the *Bacillus subtilis*

chromosome. *Acta Biochim Pol* 53 (3), 497-505.

140. **Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
141. **Eggert, T., Brockmeier, U., Dröge, M.J., Quax, W.J. and Jaeger, K.-E.** (2003) Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. *FEMS Microbiol Lett* 225 (2), 319-324.
142. **Studier, F.W. and Moffatt, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189 (1), 113-130.
143. **Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M., Ayele, M., *et al.*** (2008) The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol* 190 (7), 2597-2606.
144. **Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166 (4), 557-580.
145. **Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. and Graham, M.W.** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17 (9), 3469-3478.
146. **Bayley, S.A., Duggleby, C.J., Worsey, M.J., Williams, P.A., Hardy, K.G. and Broda, P.** (1977) Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol Gen Genet* 154 (2), 203-204.
147. **Knops, K.** (2009) Eignung von Autotransportern zum Oberflächendisplay in Gram-negativen Bakterien. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät), Düsseldorf.
148. **Bast, E.** (2001) Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
149. **Regenhardt, D.** (2004) Funktionale Genomanalyse von *Pseudomonas putida* KT2440. Dissertation. Technische Universität Carolo-Wilhelmina (Fachbereich 4), Braunschweig.
150. **Sekiguchi, J., Takada, N. and Okada, H.** (1975) Genes affecting the productivity of alpha-amylase in *Bacillus subtilis* Marburg. *J Bacteriol* 121 (2), 688-694.
151. **Steyn, A.J.S. and Pretorius, I.S.** (1995) Characterization of a novel alpha-amylase from *Lipomyces kononenkoae* and expression of its gene (*LKA1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 28 (6), 526-533.
152. **Astolfi Filho, S., Galembeck, E.V., Faria, J.B. and Schenberg Frascino, A.C.** (1986) Stable yeast transformants that secrete tunctional alpha-amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. *Nat Biotechnol* 4 (4), 311-315.
153. **Eksteen, J.M., van Rensburg, P., Cordero Otero, R.R. and Pretorius, I.S.** (2003) Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the alpha-amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biotechnol Bioeng* 84 (6), 639-646.
154. **Hasan, F., Shah, A.A. and Hameed, A.** (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol Adv* 27 (6), 782-798.
155. **Kouker, G. and Jaeger, K.-E.** (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 53 (1), 211-213.
156. **Takeshita, S., Sato, M., Toba, M., Masahashi, W. and Hashimoto-Gotoh, T.** (1987) High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lac*Z alpha-complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* 61 (1), 63-74.
157. **Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (6), 1513-1523.
158. **Canosi, U., Iglesias, A. and Trautner, T.A.** (1981) Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: effects of insertion of *Bacillus subtilis* DNA into plasmid pC194. *Mol Gen Genet* 181 (4), 434-440.
159. **Canosi, U., Morelli, G. and Trautner, T.A.** (1978) The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. *Mol Gen Genet* 166 (3), 259-267.
160. **de Vos, W.M., Venema, G., Canosi, U. and Trautner, T.A.** (1981) Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: fate of plasmid DNA. *Mol Gen Genet* 181 (4), 424-433.
161. **Michel, B., Niaudet, B. and Ehrlich, S.D.** (1982) Intramolecular recombination during plasmid transformation of *Bacillus subtilis* competent cells. *Embo J* 1 (12), 1565-1571.

162. **Contente, S. and Dubnau, D.** (1979) Marker rescue transformation by linear plasmid DNA in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 2 (4), 555-571.
163. **Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 (1), 263-273.
164. **Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R.** (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77 (1), 51-59.
165. **Lee, C.L., Ow, D.S. and Oh, S.K.** (2006) Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *J Microbiol Methods* 65 (2), 258-267.
166. **Riley, M., Abe, T., Arnaud, M.B., Berlyn, M.K., Blattner, F.R., Chaudhuri, R.R., Glasner, J.D., Horiuchi, T., Keseler, I.M., Kosuge, T., *et al.*** (2006) *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot - 2005. *Nucleic Acids Res* 34 (1), 1-9.
167. **Sanger, F. and Coulson, A.R.** (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94 (3), 441-448.
168. **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12), 5463-5467.
169. **Droege, M. and Hill, B.** (2008) The Genome Sequencer FLX™ System - longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J Biotechnol* 136 (1-2), 3-10.
170. **Morozova, O. and Marra, M.A.** (2008) Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 92 (5), 255-264.
171. **Teng, X. and Xiao, H.** (2009) Perspectives of DNA microarray and next-generation DNA sequencing technologies. *Sci China C Life Sci* 52 (1), 7-16.
172. **Bagge, N., Ciofu, O., Hentzer, M., Campbell, J.I., Givskov, M. and Høiby, N.** (2002) Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (*IS1669*) located in *ampD*. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (11), 3406-3411.
173. **Albano, M., Hahn, J. and Dubnau, D.** (1987) Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 169 (7), 3110-3117.
174. **Dubnau, D.** (1991) The regulation of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 5 (1), 11-18.
175. **Dubnau, D.** (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* 55 (3), 395-424.
176. **Dubnau, D.** (1997) Binding and transport of transforming DNA by *Bacillus subtilis*: the role of type-IV pilin-like proteins - a review. *Gene* 192 (1), 191-198.
177. **Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J.** (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 81 (5), 741-746.
178. **Young, F.E. and Spizizen, J.** (1961) Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 81 (5), 823-829.
179. **Choi, K.-H., Kumar, A. and Schweizer, H.P.** (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* 64 (3), 391-397.
180. **Peterson, G.L.** (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83 (2), 346-356.
181. **Winkler, U.K. and Stuckmann, M.** (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 138 (3), 663-670.
182. **Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680-685.
183. **Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P.G.** (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25 (9), 1327-1333.
184. **Merril, C.R.** (1990) Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* 182, 477-488.
185. **Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W.** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9 (6), 255-262.
186. **Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (9), 4350-4354.

187. **Pluskal, M.G., Przekop, M.B., Kavonian, M.R., Vecoli, C. and Hicks, D.A.** (1986) Immobilon PVDF transfer membrane: a new membrane substrate for Western blotting of proteins. *Biotechniques* 4 (3), 272-283.
188. **Nguyen, H.D., Phan, T.T. and Schumann, W.** (2007) Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* 55 (2), 89-93.
189. **Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. and Simon, M.** (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (18), 8794-8797.
190. **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., *et al.*** (2001) Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3 (2), 301-308.
191. **Wang, G.-L., Holsten, T.E., Song, W.-Y., Wang, H.P. and Ronald, P.C.** (1995) Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the *Xa*-21 disease resistance locus. *Plant J* 7 (3), 525-533.
192. **Novick, R.P.** (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* 51 (4), 381-395.
193. **Scott, J.R.** (1984) Regulation of plasmid replication. *Microbiol Rev* 48 (1), 1-23.
194. **Zielenkiewicz, U. and Cegłowski, P.** (2001) Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochim Pol* 48 (4), 1003-1023.
195. **Pomerantsev, A.P., Camp, A. and Leppla, S.H.** (2009) A new minimal replicon of *Bacillus anthracis* plasmid pXO1. *J Bacteriol* 191 (16), 5134-5146.
196. **del Solar, G. and Espinosa, M.** (2000) Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol* 37 (3), 492-500.
197. **del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M.J., Espinosa, M. and Díaz-Orejas, R.** (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (2), 434-464.
198. **Chattoraj, D.K.** (2000) Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol Microbiol* 37 (3), 467-476.
199. **Backman, K., Betlach, M., Boyer, H.W. and Yanofsky, S.** (1979) Genetic and physical studies on the replication of ColE1-type plasmids. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43 (1), 69-76.
200. **Sakai, H. and Komano, T.** (1996) DNA replication of IncQ broad-host-range plasmids in gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 60 (3), 377-382.
201. **Kües, U. and Stahl, U.** (1989) Replication of plasmids in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 53 (4), 491-516.
202. **Antoine, R. and Locht, C.** (1992) Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol* 6 (13), 1785-1799.
203. **Aakvik, T., Degnes, K.F., Dahlsrud, R., Schmidt, F., Dam, R., Yu, L., Völker, U., Ellingsen, T.E. and Valla, S.** (2009) A plasmid RK2-based broad-host-range cloning vector useful for transfer of metagenomic libraries to a variety of bacterial species. *FEMS Microbiol Lett* 296 (2), 149-158.
204. **Blatny, J.M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H.C., Karunakaran, P. and Valla, S.** (1997) Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria. *Plasmid* 38 (1), 35-51.
205. **Nešvera, J., Hochmannoá, J., Pátek, M., Šroglová, A. and Bečvářová, V.** (1994) Transfer of the broad-host-range IncQ plasmid RSF1010 and other plasmid vectors to the Gram-positive methylotroph *Brevibacterium methylicum* by electrotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol* 40 (6), 864-866.
206. **Gormley, E.P. and Davies, J.** (1991) Transfer of plasmid RSF1010 by conjugation from *Escherichia coli* to *Streptomyces lividans* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 173 (21), 6705-6708.
207. **Meyer, R.** (2009) Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid* 62 (2), 57-70.
208. **Sia, E.A., Roberts, R.C., Easter, C., Helinski, D.R. and Figurski, D.H.** (1995) Different relative importances of the *par* operons and the effect of conjugal transfer on the maintenance of intact promiscuous plasmid RK2. *J Bacteriol* 177 (10), 2789-2797.
209. **Scherzinger, E., Bagdasarian, M.M., Scholz, P., Lurz, R., Rückert, B. and Bagdasarian, M.** (1984) Replication of the broad host range plasmid RSF1010: requirement for three plasmid-encoded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (3), 654-658.

210. **Ostroff, G.R. and Pène, J.J.** (1984) Molecular cloning with bifunctional plasmid vectors in *Bacillus subtilis*. I. Construction and analysis of *B. subtilis* clone banks in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 193 (2), 299-305.
211. **Kreft, J., Bernhard, K. and Goebel, W.** (1978) Recombinant plasmids capable to replication in *B. subtilis* and *E. coli*. *Mol Gen Genet* 162 (1), 59-67.
212. **Harwood, C.R.** (1992) *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol* 10 (7), 247-256.
213. **Real, C.I.** (2009) Konstruktion und Analyse eines Shuttle-Vektors zur Expression in *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* und *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät), Düsseldorf.
214. **Link, O.** (2010) Konstruktion neuer Vektoren zur Expression metagenomischer DNA. Diplomarbeit. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät), Düsseldorf.
215. **Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S.** (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173 (1), 33-38.
216. **Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjørn, S.P., Givskov, M. and Molin, S.** (1998) New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64 (6), 2240-2246.
217. **Ish-Horowicz, D. and Burke, J.F.** (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9 (13), 2989-2998.
218. **Fu, J., Wenzel, S.C., Perlova, O., Wang, J., Gross, F., Tang, Z., Yin, Y., Stewart, A.F., Müller, R. and Zhang, Y.** (2008) Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. *Nucleic Acids Res* 36 (17), e113.
219. **Horinouchi, S. and Weisblum, B.** (1982) Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J Bacteriol* 150 (2), 815-825.
220. **Holden, M.T., Lindsay, J.A., Corton, C., Quail, M.A., Cockfield, J.D., Pathak, S., Batra, R., Parkhill, J., Bentley, S.D. and Edgeworth, J.D.** (2010) Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic- and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, sequence type 239 (TW). *J Bacteriol* 192 (3), 888-892.
221. **Lewis, P.J. and Marston, A.L.** (1999) GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* 227 (1), 101-110.
222. **Daniel, R.A., Harry, E.J., Katis, V.L., Wake, R.G. and Errington, J.** (1998) Characterization of the essential cell division gene *ftsL* (*yIID*) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol Microbiol* 29 (2), 593-604.
223. **Nguyen, H.D., Nguyen, Q.A., Ferreira, R.C., Ferreira, L.C., Tran, L.T. and Schumann, W.** (2005) Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid* 54 (3), 241-248.
224. **Middleton, R. and Hofmeister, A.** (2004) New shuttle vectors for ectopic insertion of genes into *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 51 (3), 238-245.
225. **Verhamme, D.T., Murray, E.J. and Stanley-Wall, N.R.** (2009) DegU and Spo0A jointly control transcription of two loci required for complex colony development by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 191 (1), 100-108.
226. **Itaya, M., Fujita, K., Ikeuchi, M., Koizumi, M. and Tsuge, K.** (2003) Stable positional cloning of long continuous DNA in the *Bacillus subtilis* genome vector. *J Biochem* 134 (4), 513-519.
227. **Kaneko, S., Akioka, M., Tsuge, K. and Itaya, M.** (2005) DNA shuttling between plasmid vectors and a genome vector: systematic conversion and preservation of DNA libraries using the *Bacillus subtilis* genome (BGM) vector. *J Mol Biol* 349 (5), 1036-1044.
228. **Kaneko, S., Tsuge, K., Takeuchi, T. and Itaya, M.** (2003) Conversion of sub-megasized DNA to desired structures using a novel *Bacillus subtilis* genome vector. *Nucleic Acids Res* 31 (18), e112.
229. **Maciag, I.E., Viret, J.F. and Alonso, J.C.** (1988) Replication and incompatibility properties of plasmid pUB110 in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* 212 (2), 232-240.
230. **Ostroff, G.R. and Pène, J.J.** (1984) Molecular cloning with bifunctional plasmid vectors in *Bacillus subtilis*. II. Transfer of sequences propagated in *Escherichia coli* to *B. subtilis*. *Mol Gen Genet* 193 (2), 306-311.
231. **Alonso, J.C., Viret, J.F. and Tailor, R.H.** (1987) Plasmid maintenance in *Bacillus subtilis* recombination-deficient mutants. *Mol Gen Genet* 208 (1-2), 349-352.
232. **Nap, J.P., Bijvoet, J. and Stiekema, W.J.** (1992) Biosafety of kanamycin-resistant

transgenic plants. *Transgenic Res* 1 (6), 239-249.

233. **Kokotek, W. and Lotz, W.** (1989) Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. *Gene* 84 (2), 467-471.
234. **Oka, A., Sugisaki, H. and Takanami, M.** (1981) Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn*903*. *J Mol Biol* 147 (2), 217-226.
235. **Taylor, L.A. and Rose, R.E.** (1988) A correction in the nucleotide sequence of the Tn*903* kanamycin resistance determinant in pUC4K. *Nucleic Acids Res* 16 (1), 358.
236. **Grindley, N.D. and Joyce, C.M.** (1980) Genetic and DNA sequence analysis of the kanamycin resistance transposon Tn*903*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (12), 7176-7180.
237. **Lovett, P.S., Williams, D.M. and Duvall, E.J.** (1982) Expression of a foreign procaryotic gene in *Bacillus subtilis*. *Basic Life Sci* 19, 51-57.
238. **Jana, S. and Deb, J.K.** (2005) Molecular targets for design of novel inhibitors to circumvent aminoglycoside resistance. *Curr Drug Targets* 6 (3), 353-361.
239. **Wright, G.D. and Thompson, P.R.** (1999) Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* 4, D9-21.
240. **Lorenz, M.G. and Wackernagel, W.** (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 58 (3), 563-602.
241. **Khasanov, F.K., Zvingila, D.J., Zainullin, A.A., Prozorov, A.A. and Bashkirov, V.I.** (1992) Homologous recombination between plasmid and chromosomal DNA in *Bacillus subtilis* requires approximately 70 bp of homology. *Mol Gen Genet* 234 (3), 494-497.
242. **le Goffic, F., Capmau, M.-L., Tangy, F. and Baillarge, M.** (1979) Mechanism of action of aminoglycoside antibiotics. Binding studies of tobramycin and its 6'-*N*-acetyl derivative to the bacterial ribosome and its subunits. *Eur J Biochem* 102 (1), 73-81.
243. **Ryu, D.H., Litovchick, A. and Rando, R.R.** (2002) Stereospecificity of aminoglycoside-ribosomal interactions. *Biochemistry* 41 (33), 10499-10509.
244. **Itaya, M.** (1995) Toward a bacterial genome technology: integration of the *Escherichia coli* prophage lambda genome into the *Bacillus subtilis* 168 chromosome. *Mol Gen Genet* 248 (1), 9-16.
245. **Perego, M.** (1993) Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*. In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (ed.) *Integrational vectors for genetic manipulation in Bacillus subtilis*. pp. 615–624, American Society for Microbiology, Washington.
246. **Iordănescu, S.** (1975) Recombinant plasmid obtained from two different, compatible staphylococcal plasmids. *J Bacteriol* 124 (2), 597-601.
247. **Timmis, K.N.** (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist *par excellence*. *Environ Microbiol* 4, 779-781.
248. **Schweizer, H.P.** (2003) Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* 2 (1), 48-62.
249. **Ogawa, K., Akagawa, E., Nakamura, K. and Yamane, K.** (1995) Determination of a 21548 bp nucleotide sequence around the 24 degrees region of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Microbiology* 141 (2), 269-275.
250. **Boe, L., Gros, M.-F., te Riele, H., Ehrlich, S.D. and Gruss, A.** (1989) Replication origins of single-stranded-DNA plasmid pUB110. *J Bacteriol* 171 (6), 3366-3372.
251. **Chen, S.-T., Jordan, E.M., Wilson, R.B., Draper, R.K. and Clowes, R.C.** (1987) Transcription and expression of the exotoxin A gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 133 (11), 3081-3091.
252. **Frank, D.W., Storey, D.G., Hindahl, M.S. and Iglewski, B.H.** (1989) Differential regulation by iron of *regA* and *toxA* transcript accumulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 171 (10), 5304-5313.
253. **Olsen, R.H., DeBusscher, G. and McCombie, W.R.** (1982) Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J Bacteriol* 150 (1), 60-69.
254. **Schweizer, H.P.** (1991) *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene* 97 (1), 109-121.
255. **Carleton, S., Projan, S.J., Highlander, S.K., Moghazeh, S.M. and Novick, R.P.** (1984) Control of pT181 replication II. Mutational analysis. *Embo J* 3 (10), 2407-2414.
256. **Novick, R.P., Adler, G.K., Projan, S.J., Carleton, S., Highlander, S.K., Gruss, A., Khan, S.A. and Iordanescu, S.** (1984) Control of pT181 replication I. The pT181 copy control function acts by inhibiting the synthesis of a replication protein. *Embo J* 3 (10), 2399-2405.
257. **Novick, R.P., Projan, S.J., Kumar, C.C., Carleton, S., Gruss, A., Highlander, S.K.**

and Kornblum, J. (1985) Replication control for pT181, an indirectly regulated plasmid. *Basic Life Sci* 30, 299-320.

258. **Dubnau, D. and Davidoff-Abelson, R.** (1971) Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J Mol Biol* 56 (2), 209-221.
259. **Cutting, S.M. and Vander Horn, P.B.** (1990) Genetic Analysis. In: Haarwood, C.R. and Cutting, S.M. (ed.) *Genetic Analysis*. pp. 27-74, John Wiley & Sons, New York.
260. **Spizizen, J.** (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44 (10), 1072-1078.
261. **Chang, S. and Cohen, S.N.** (1979) High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol Gen Genet* 168 (1), 111-115.
262. **Romero, D., Pérez-García, A., Veening, J.-W., de Vicente, A. and Kuipers, O.P.** (2006) Transformation of undomesticated strains of *Bacillus subtilis* by protoplast electroporation. *J Microbiol Methods* 66 (3), 556-559.
263. **Kretz, P.L., Kohler, S.W. and Short, J.M.** (1991) Identification and characterization of a gene responsible for inhibiting propagation of methylated DNA sequences in *mcrA mcrB1 Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 173 (15), 4707-4716.
264. **Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F.R.** (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204, 63-113.
265. **Chakrabarty, A.M., Mylroie, J.R., Friello, D.A. and Vacca, J.G.** (1975) Transformation of *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli* with plasmid-linked drug-resistance factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (9), 3647-3651.
266. **Trevors, J.T., Chassy, B.M., Dower, W.J. and Blaschek, H.P.** (1992) Electrotransformation of bacteria by plasmid DNA. In: Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A. and Sower, A.E. (ed.) *Electrotransformation of bacteria by plasmid DNA*. pp. 265-290, Academic Press, San Diego.
267. **Song, Y., Hahn, T., Thompson, I.P., Mason, T.J., Preston, G.M., Li, G., Paniwnyk, L. and Huang, W.E.** (2007) Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria. *Nucleic Acids Res* 35 (19), e129.
268. **Ravnikar, M., Irman, A., Radić, N., Lunder, M. and Štrukelj, B.** (2009) Chemoporation using saponins or cholates: an alternative method for transformation of bacterial cells. *Biotechnol Lett* 31 (12), 1943-1946.
269. **Alvarez-Martinez, C.E. and Christie, P.J.** (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 73 (4), 775-808.
270. **de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K.N.** (1990) Mini-Tn*5* transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 172 (11), 6568-6572.
271. **Liu, S.-C., Webster, D.A. and Stark, B.C.** (1996) An imporved method of transformation in Pseudomonads. *Biotechnology Techniques* 10 (9), 683-686.
272. **Choi, K.-H. and Schweizer, H.P.** (2006) mini-Tn*7* insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* 1 (1), 153-161.
273. **Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16 (13), 6127-6145.
274. **Iwasaki, K., Uchiyama, H., Yagi, O., Kurabayashi, T., Ishizuka, K. and Takamura, Y.** (1994) Transformation of *Pseudomonas putida* by electroporation. *Biosci Biotechnol Biochem* 58 (5), 851-854.
275. **Smith, A.W. and Iglewski, B.H.** (1989) Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res* 17, 10509.
276. **Cho, J.-H., Kim, E.-K. and So, J.-S.** (1995) Improved transformation of *Pseudomonas putida* KT2440 by electroporation. *Biotechnology Techniques* 9 (1), 41-44.
277. **Itoh, N., Kouzai, T. and Koide, Y.** (1994) Efficient transformation of *Pseudomonas* strains with pNI vectors by electroporation. *Biosci Biotechnol Biochem* 58, 1306-1308.
278. **Xue, G.-P., Johnson, J.S. and Dalrymple, B.P.** (1999) High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J Microbiol Methods* 34 183-191
279. **Hsu, L.M.** (2002) Promoter clearance and escape in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1577 (2), 191-207.
280. **Lloyd, G., Landini, P. and Busby, S.** (2001) Activation and repression of transcription initiation in bacteria. *Essays Biochem* 37, 17-31.
281. **Veening, J.-W., Smits, W.K., Hamoen, L.W., Jongbloed, J.D.H. and Kuipers, O.P.** (2004) Visualization of differential gene expression by improved cyan

fluorescent protein and yellow fluorescent protein production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 70 (11), 6809-6815.

282. **Sastalla, I., Chim, K., Cheung, G.Y., Pomerantsev, A.P. and Leppla, S.H.** (2009) Codon-optimized fluorescent proteins designed for expression in low-GC gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 75 (7), 2099-2110.
283. **Perlova, O., Gerth, K., Kuhlmann, S., Zhang, Y. and Müller, R.** (2009) Novel expression hosts for complex secondary metabolite megasynthetases: Production of myxochromide in the thermopilic isolate *Corallococcus macrosporus* GT-2. *Microb Cell Fact* 8, 1.
284. **Smith, C.B., Anderson, J.E., Fischer, R.L. and Webb, S.R.** (2002) Stability of green fluorescent protein using luminescence spectroscopy: is GFP applicable to field analysis of contaminants? *Environ Pollut* 120 (3), 517-520.
285. **Southward, C.M. and Surette, M.G.** (2002) The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light. *Mol Microbiol* 45 (5), 1191-1196.
286. **Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P.** (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* 14 (3), 315-319.
287. **Ma, J., Zhang, Z., Wang, B., Kong, X., Wang, Y., Cao, S. and Feng, Y.** (2006) Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* 45 (1), 22-29.
288. **Jaeger, K.-E. and Eggert, T.** (2002) Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13 (4), 390-397.
289. **Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P.** (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64 (6), 763-781.
290. **Eggert, T., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B.W. and Jaeger, K.-E.** (2001) Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. *FEBS Lett* 502 (3), 89-92.
291. **Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C.** (1993) Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem* 216 (1), 155-160.
292. **Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D.H., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.-Y.F., Westers, H., Zanen, G., Quax, W.J., *et al.*** (2004) Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (2), 207-233.
293. **Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D.H., Bron, S. and van Dijl, J.M.** (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (3), 515-547.
294. **Jongbloed, J.D.H., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S., Airaksinen, U., Pries, F., Quax, W.J., van Dijl, J.M. and Braun, P.G.** (2002) Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 277 (46), 44068-44078.
295. **Nagarajan, V.** (1993) Protein secretion. In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (ed.) *Protein secretion*. pp. 713-727, American Society for Microbiology, Washington.
296. **Carvalho, C.M.L., Aires-Barros, M.R. and Cabral, J.M.S.** (1999) Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol Bioeng* 66 (1), 17-34.
297. **Kang, Y., Son, M.S. and Hoang, T.T.** (2007) One step engineering of T7-expression strains for protein production: increasing the host-range of the T7-expression system. *Protein Expr Purif* 55 (2), 325-333.
298. **Spehr, V., Frahm, D. and Meyer, T.F.** (2000) Improvement of the T7 expression system by the use of T7 lysozyme. *Gene* 257 (2), 259-267.
299. **Lee, S.-G. and Liao, J.C.** (2008) Control of acetate production rate in *Escherichia coli* by regulating expression of single-copy *pta* using $lacI^Q$ in multicopy plasmid. *J Microbiol Biotechnol* 18 (2), 334-337.
300. **Chen, L.-H., Emory, S.A., Bricker, A.L., Bouvet, P. and Belasco, J.G.** (1991) Structure and function of a bacterial mRNA stabilizer: analysis of the 5' untranslated region of *ompA* mRNA. *J Bacteriol* 173 (15), 4578-4586.
301. **Celesnik, H., Deana, A. and Belasco, J.G.** (2007) Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal. *Mol Cell* 27 (1), 79-90.
302. **Emory, S.A., Bouvet, P. and Belasco, J.G.** (1992) A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 6 (1), 135-148.
303. **Rauhut, R. and Klug, G.** (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 23 (3), 353-370.

304. **Deana, A. and Belasco, J.G.** (2005) Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev* 19 (21), 2526-2533.
305. **Celesnik, H., Deana, A. and Belasco, J.G.** (2007) Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal. *Mol Cell* 27 (1), 79-90.
306. **Emory, S.A., Bouvet, P. and Belasco, J.G.** (1992) A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 6 (1), 135-148.
307. **Fournier, B., Truong-Bolduc, Q.C., Zhang, X. and Hooper, D.C.** (2001) A mutation in the 5' untranslated region increases stability of *norA* mRNA, encoding a multidrug resistance transporter of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183 (7), 2367-2371.
308. **Schneider, E., Blundell, M. and Kennell, D.** (1978) Translation and mRNA decay. *Mol Gen Genet* 160 (2), 121-129.
309. **Joyce, S.A. and Dreyfus, M.** (1998) In the absence of translation, RNase E can bypass 5' mRNA stabilizers in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 282 (2), 241-254.
310. **Wang, J.D., Herman, C., Tipton, K.A., Gross, C.A. and Weissman, J.S.** (2002) Directed evolution of substrate-optimized GroEL/S chaperonins. *Cell* 111 (7), 1027-1039.
311. **Choi, J.H. and Lee, S.Y.** (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 64 (5), 625-635.
312. **Suh, S.-J., Silo-Suh, L.A. and Ohman, D.E.** (2004) Development of tools for the genetic manipulation of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* 58 (2), 203-212.
313. **Schweizer, H.P.** (2001) Vectors to express foreign genes and techniques to monitor gene expression in Pseudomonads. *Curr Opin Biotechnol* 12 (5), 439-445.
314. **Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A. and Schweizer, H.P.** (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43 (1), 59-72.
315. **Pagratis, N.C. and Revel, H.R.** (1993) Broad host range, regulated expression system utilizing bacteriophage T7 RNA polymerase and promoter. *Biotechnol Bioeng* 41 (9), 837-845.
316. **Dunn, A.K. and Handelsman, J.** (1999) A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*. *Gene* 226 (2), 297-305.
317. **Serrano-Heras, G., Salas, M. and Bravo, A.** (2005) A new plasmid vector for regulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 54 (3), 278-282.
318. **Itaya, M., Shaheduzzaman, S.M., Matsui, K., Omori, A. and Tsuji, T.** (2001) Green marker for colonies of *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65 (3), 579-583.
319. **Singh, K.D., Schmalisch, M.H., Stülke, J. and Görke, B.** (2008) Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *J Bacteriol* 190 (21), 7275-7284.
320. **Krispin, O. and Allmansberger, R.** (1998) The *Bacillus subtilis* AraE protein displays a broad substrate specificity for several different sugars. *J Bacteriol* 180 (12), 3250-3252.
321. **Lindner, C., Stülke, J. and Hecker, M.** (1994) Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140 (4), 753-757.
322. **Schmiedel, D. and Hillen, W.** (1996) Contributions of XylR CcpA and *cre* to diauxic growth of *Bacillus megaterium* and to xylose isomerase expression in the presence of glucose and xylose. *Mol Gen Genet* 250 (3), 259-266.
323. **Phan, T.T.P., Nguyen, H.D. and Schumann, W.** (2006) Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* 46 (2), 189-195.
324. **Ulmanen, I., Lundström, K., Lehtovaara, P., Sarvas, M., Ruohonen, M. and Palva, I.** (1985) Transcription and translation of foreign genes in *Bacillus subtilis* by the aid of a secretion vector. *J Bacteriol* 162 (1), 176-182.
325. **von Mering, C., Hugenholtz, P., Raes, J., Tringe, S.G., Doerks, T., Jensen, L.J., Ward, N. and Bork, P.** (2007) Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. *Science* 315 (5815), 1126-1130.
326. **Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T., Cayouette, M., McHardy, A.C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., *et al.*** (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* 450 (7169), 560-565.
327. **García Martín, H., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K.W., McHardy, A.C., Yeates, C., He, S., Salamov, A.A., Szeto, E., *et al.*** (2006) Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR)

sludge communities. *Nat Biotechnol* 24 (10), 1263-1269.

328. **Woyke, T., Teeling, H., Ivanova, N.N., Huntemann, M., Richter, M., Gloeckner, F.O., Boffelli, D., Anderson, I.J., Barry, K.W., Shapiro, H.J., *et al.*** (2006) Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* 443 (7114), 950-955.
329. **Krieg, N.R. and Hylemon, P.B.** (1976) The taxonomy of the chemoheterotrophic spirilla. *Annu Rev Microbiol* 30, 303-325.
330. **Krieg, N.R.** (1976) Biology of the chemoheterotrophic spirilla. *Bacteriol Rev* 40 (1), 55-115.
331. **O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R.** (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54 (1), 49-79.
332. **Mah, T.-F.C. and O'Toole, G.A.** (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9 (1), 34-39.
333. **Monds, R.D. and O'Toole, G.A.** (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol* 17 (2), 73-87.
334. **Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F. and Kluepfel, D.** (1995) Production and secretion of proteins by streptomycetes. *Crit Rev Biotechnol* 15 (1), 13-39.
335. **Aparna, M.S.P.B.D. and Yadav, S.** (2008) Biofilms: microbes and disease *Braz J Infect Dis* 12 (6), 526-530.
336. **Jenkinson, H.F. and Lappin-Scott, H.M.** (2001) Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol* 9 (1), 9-10.
337. **Rosche, B., Li, X.Z., Hauer, B., Schmid, A. and Buehler, K.** (2009) Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? *Trends Biotechnol* 27 (11), 636-643.
338. **Williams, V. and Fletcher, M.** (1996) *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl Environ Microbiol* 62 (1), 100-104.
339. **Makin, S.A. and Beveridge, T.J.** (1996) The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* 142 (2), 299-307.
340. **Liu, G.Y. and Nizet, V.** (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol* 17 (9), 406-413.
341. **Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G. and Torres-Guerrero, H.** (2000) Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun* 68 (6), 3696-3703.
342. **Liu, G.Y., Essex, A., Buchanan, J.T., Datta, V., Hoffman, H.M., Bastian, J.F., Fierer, J. and Nizet, V.** (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med* 202 (2), 209-215.
343. **Paolo, W.F., Jr., Dadachova, E., Mandal, P., Casadevall, A., Szaniszlo, P.J. and Nosanchuk, J.D.** (2006) Effects of disrupting the polyketide synthase gene *WdPKS1* in *Wangiella* [*Exophiala*] *dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. *BMC Microbiol* 6, 55.
344. **van Duin, D., Casadevall, A. and Nosanchuk, J.D.** (2002) Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (11), 3394-3400.
345. **Baron, S.S. and Rowe, J.J.** (1981) Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrob Agents Chemother* 20 (6), 814-820.
346. **Chatfield, C.H. and Cianciotto, N.P.** (2007) The secreted pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity. *Infect Immun* 75 (8), 4062-4070.
347. **Purcell, E.B. and Crosson, S.** (2008) Photoregulation in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 11 (2), 168-178.
348. **Chew, A.G.M. and Bryant, D.A.** (2007) Chlorophyll biosynthesis in bacteria: the origins of structural and functional diversity. *Annu Rev Microbiol* 61, 113-129.
349. **Gray, M.W., Sankoff, D. and Cedergren, R.J.** (1984) On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 12 (14), 5837-5852.
350. **Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Backhed, F., Nyren, P. and Engstrand, L.** (2008) Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One* 3 (7), e2836.
351. **Huse, S.M., Dethlefsen, L., Huber, J.A., Mark Welch, D., Relman, D.A. and Sogin, M.L.** (2008) Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet* 4 (11), e1000255.
352. **Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M. and Herndl, G.J.** (2006) Microbial diversity in the deep sea

and the underexplored “rare biosphere”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (32), 12115-12120.

353. **Griffiths, E. and Gupta, R.S.** (2001) The use of signature sequences in different proteins to determine the relative branching order of bacterial divisions: evidence that Fibrobacter diverged at a similar time to *Chlamydia* and the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* division. *Microbiology* 147 (9), 2611-2622.
354. **Mignard, S. and Flandrois, J.P.** (2007) Identification of *Mycobacterium* using the EF-Tu encoding (*tuf*) gene and the tmRNA encoding (*ssrA*) gene. *J Med Microbiol* 56 (8), 1033-1041.
355. **Miñana-Galbis, D., Urbizu-Serrano, A., Farfán, M., Fusté, M.C. and Lorén, J.G.** (2009) Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the *cpn60* universal target. *Int J Syst Evol Microbiol* 59 (8), 1976-1983.
356. **Woese, C.R.** (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51 (2), 221-271.
357. **MacArthur, R.H. and Wilson, E.O.** (1967) The Theory of Island Biogeography. Princeton University Press, Princeton.
358. **Parry, G.D.** (1987) The meanings of r- and k-selection. *Oecologia* 48 (2), 260-264.
359. **Edberg, S.C.** (2009) Does the possession of virulence factor genes mean that those genes will be active? *J Water Health* 7 (1), S19-28.
360. **McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P. and Sajid, M.** (2006) Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol* 1, 497-536.
361. **Munsch-Alatossava, P., Gursoy, O. and Alatossava, T.** Exclusion of phospholipases (PLs)-producing bacteria in raw milk flushed with nitrogen gas N_2. *Microbiol Res* 165 (1), 61-65.
362. **Zhu, H., Liu, M., Sumby, P. and Lei, B.** (2009) The secreted esterase of group a *Streptococcus* is important for invasive skin infection and dissemination in mice. *Infect Immun* 77 (12), 5225-5232.
363. **Desvaux, M., Parham, N.J., Scott-Tucker, A. and Henderson, I.R.** (2004) The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends Microbiol* 12 (7), 306-309.
364. **Koster, M., Bitter, W. and Tommassen, J.** (2000) Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 290 (4-5), 325-331.
365. **Filloux, A., Michel, G. and Bally, M.** (1998) GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 22 (3), 177-198.
366. **Chap, H.J., Zwaal, R.F. and van Deenen, L.L.** (1977) Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the surface membrane. *Biochim Biophys Acta* 467 (2), 146-164.
367. **Little, C. and Rumsby, M.G.** (1980) Lysis of erythrocytes from stored human blood by phospholipase C (*Bacillus cereus*). *Biochem J* 188 (1), 39-46.
368. **Pal, S., Guhathakurta, B., Sasmal, D., Mallick, R. and Datta, A.** (1997) Purification and characterisation of a hemolysin with phospholipase C activity from *Vibrio cholerae* O139. *FEMS Microbiol Lett* 147 (1), 115-120.
369. **Holland, I.B., Schmitt, L. and Young, J.** (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* 22 (1-2), 29-39.
370. **Bhakdi, S., Bayley, H., Valeva, A., Walev, I., Walker, B., Kehoe, M. and Palmer, M.** (1996) Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* 165 (2), 73-79.
371. **Stanley, P., Koronakis, V. and Hughes, C.** (1998) Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (2), 309-333.
372. **Baumgartner, V.** (2008) Funktionelle Expression der Lipase A aus *Bacillus subtilis* und des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) in *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida*. Bachelor Arbeit. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät), Düsseldorf.
373. **Han, S.-S., Lee, J.-Y., Kim, W.-H., Shin, H.-J. and Kim, G.-J.** (2008) Screening of promoters from metagenomic DNA and their use for the construction of expression vectors. *J Microbiol Biotechnol* 18 (10), 1634-1640.
374. **Gabor, E.M., Alkema, W.B. and Janssen, D.B.** (2004) Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ Microbiol* 6 (9), 879-886.
375. **Wexler, M., Bond, P.L., Richardson, D.J. and Johnston, A.W.B.** (2005) A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. *Environ Microbiol* 7 (12), 1917-1926.
376. **Rondon, M.R., Raffel, S.J., Goodman, R.M. and Handelsman, J.** (1999) Toward functional genomics in bacteria: analysis of

gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (11), 6451-6455.

5 Anhang

Lebenslauf

Name Sonja Christina Tröschel, Dipl.-Ing. (FH)
geboren am 27.11.1981
in Bad Soden am Taunus

Schulische und berufliche Ausbildung

seit 11/2006	Promotion am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich im Rahmen des BMBF geförderten Projektes „GenoMik-Plus, Genomforschung an Mikroorganismen für industrielle Produktion, Ernährung, Umwelt und Gesundheit“. Thema: „Entwicklung neuartiger Wirt - Vektor Systeme mit breitem Wirtsspektrum zum funktionsbasierten Screening von Metagenombanken“.
02-10/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hochschule Darmstadt, Fachbereich: Chemie- und Biotechnologie.
09/2001-12/2005	Biotechnologie-Studium an der Hochschule Darmstadt. Diplomarbeit bei der Firma BRAIN AG. Thema: „Heterologe Proteinexpression in *Escherichia coli* durch das α-Hämolysin Sekretionssystem“. Auslandssemester im Labor von Ph.D. Donald E. Woods an der University of Calgary (Alberta, Kanada). Thema: „Studies of *Burkholderia pseudomallei* proteases and quorum sensing and investigation of the *Burkholderia thailandensis* type III secretion system (TTSS)”
08/1992-05/2001	Gymnasium Oberursel, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Sonja Christina Tröschel