

**Neue Biokatalysatoren aus dem Metagenom:
Expression, Identifizierung und biochemische Eigenschaften**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Christian Leggewie

aus Essen

Düsseldorf, Juli 2005

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. Cornelis P. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2005

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion:

Leggewie, C., H. Henning, C. Schmeisser, W. R. Streit, and K. E. Jaeger. 2005. A novel transposon for functional expression of DNA libraries. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Voget, S., C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K. E. Jaeger, and W. R. Streit. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol* **69**:6235-42.

Eggert, T., C. Leggewie, M. Puls, W. Streit, G. van Pouderooyen, B. W. Dijkstra, and K.-E. Jaeger. 2004. Novel biocatalysts by identification and design. *Biocatal Biotransformation* **22**:139-144.

Elend, C., C. Schmeisser, C. Leggewie, H. Steele, J. L. Reymond, K. E. Jaeger, and W. R. Streit. 2005. Isolation and biochemical characterisation of two novel metagenome derived esterases as part of possible ancient antibiotic resistance clusters. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Tagungsbeiträge:

Leggewie C., C. Elend, C. Schmeisser, J. P. Goddard, J. L. Reymond, W. R. Streit, and K. E. Jaeger. 2004. Novel biocatalysts from the metagenome. Tagung "Environmental genomics and environmental metagenomics". Granada, Spanien. (Vortrag)

Leggewie C., and K. E. Jaeger. 2002. Exploiting the unknown: novel biocatalysts from complex microbial consortia. Tagung: "Gegenwart und Zukunft der bakteriellen Genomforschung in Deutschland". Bielefeld (Posterbeitrag)

Leggewie C., H. Henning, and K. E. Jaeger. 2003. Novel tools for the overexpression of biocatalysts from metagenomic DNA-libraries. Tagung: "European Conference on prokaryotic genomes". Göttingen (Posterbeitrag)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die weiße Biotechnologie.....	1
1.2	Der Metagenomansatz: von der Ökologie zur Biotechnologie.....	2
1.3	Das Screening.....	6
1.4	Lipasen.....	9
1.5	Intention dieser Arbeit.....	11
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Chemikalien und Enzyme.....	13
2.2	Bakterienstämme und Plasmide.....	13
2.3	Oligonukleotide.....	15
2.4	Nährmedien.....	22
2.5	Anzucht und Lagerung von Bakterien.....	22
2.6	Isolierung von Nukleinsäuren.....	23
2.7	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	23
2.8	<i>In vitro</i> Rekombination von DNA.....	23
2.9	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	23
2.10	Sequenzierung von DNA.....	23
2.11	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	23
2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	23
2.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.14	Chromatographische Reinigung von Poly-Histidin-Fusionsproteinen aus Zellrohextrakt.....	24
2.15	Screening von Metagenombibliotheken.....	24
2.15.1	Detektion von Dehydrogenaseaktivität.....	24
2.15.2	Selektion von Klonen mit Amidaseaktivität.....	25
2.15.3	Detektion von Amylaseaktivität.....	25
2.15.4	Detektion von Proteaseaktivität.....	26
2.15.5	Identifizierung von lipolytischen Klonen.....	26
2.16	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	26
2.16.1	Spektroskopische Methoden zur Bestimmung von Esterase-/Lipase-Aktivität.....	26
2.16.2	Titrimetrische Methode zur Bestimmung von Esterase-/Lipase-Aktivität.....	26
2.16.3	Gaschromatographische Analyse zur Bestimmung der Enantioselektivität lipolytischer Enzyme.....	27
2.16.4	HPLC-Analyse zur Bestimmung der Amidaseaktivität.....	29

2.17	Bestimmung der pH-Stabilität von Esterasen.....	29
2.18	Bestimmung des pH-Optimums von Esterasen.....	29
2.19	DNA-Isolation aus Umweltproben.....	29
2.20	Klonierung metagenomischer DNA.....	30
2.21	Transposition mit MuExpress.....	30
2.22	DNA-Array Experimente.....	30
2.22.1	Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Glaträgern.....	30
2.22.2	Nachweis der Immobilisierung von Oligonukleotiden durch Vistra-Green Färbung.....	31
2.22.3	Markierung genomischer DNA.....	31
2.22.4	Hybridisierung der immobilisierten Oligonukleotide mit genomischer DNA und Auswertung der Daten.....	32
2.23	Computerprogramme und Online-Datenbanken.....	33
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Identifizierung von Biokatalysatoren durch Aktivitäts-Screening.....	35
3.1.1	DNA-Isolierung und Konstruktion von Metagenombibliotheken.....	35
3.1.2	Das Screening: Identifizierung von Biokatalysatoren.....	37
3.2	Identifizierung von Biokatalysatoren durch Sequenz-abhängiges Screening	43
3.2.1	Erklärung der prinzipiellen Vorgehensweise.....	43
3.2.2	Die Auswahl der Signatursequenzen.....	44
3.2.3	Immobilisierung der Signatursequenzen.....	46
3.2.4	Testscreening mit genomischer DNA.....	47
3.3	Identifizierung von Biokatalysatoren durch Erhöhung der Expression nach Insertion eines Transposons.....	50
3.3.1	MuExpress verfügt über starke Promotoren und ist zur Sequenzierung geeignet.....	51
3.3.2	MuExpress ist funktional.....	51
3.3.3	Identifizierung einer neuen Esterase durch MuExpress.....	53
3.4	Biochemische Charakterisierung von Biokatalysatoren.....	56
3.4.1	Die Auswahl der Biokatalysatoren.....	56
3.4.2	Reinigung und theoretische Eigenschaften der lipolytischen Enzyme.....	58
3.4.3	Die Esterasen bevorzugen kurzkettige Triglyceride und Vinylester als Substrate.....	60
3.4.4	Die Esterasen sind nicht interphasenaktivierbar.....	61
3.4.5	Die Esterasen sind alkalistabil.....	62
3.4.6	Die Esterasen besitzen ein Aktivitäts-Optimum im alkalischen Bereich.....	64
3.4.7	Die drei Esterasen hydrolisieren verschiedene Substrate enantioselektiv.....	65
3.4.8	Enzym-Fingerprinting der Esterasen.....	67

4	Diskussion.....	73
4.1	Identifizierung von Biokatalysatoren durch Aktivitäts-Screening.....	74
4.1.1	Konstruktion von Metagenombibliotheken.....	74
4.1.2	Screening von Metagenombibliotheken und Entwicklung eines Selektionssystems.....	76
4.2	Identifizierung von Biokatalysatoren durch Sequenz-basiertes Screening....	80
4.3	Identifizierung von Biokatalysatoren durch gesteigerte Expression.....	85
4.3.1	MuExpress optimiert das Screening durch Expressionssteigerung.....	87
4.3.2	Identifizierung einer neuen Esterase durch MuExpress.....	88
4.3.3	Effizienz von MuExpress.....	88
4.3.4	Verschiedene Faktoren könnten die Identifizierung von Biokatalysatoren verhindern.....	90
4.4	Biochemische Charakterisierung von Biokatalysatoren aus dem Metagenom.....	91
4.4.1	Die Auswahl der Biokatalysatoren.....	92
4.4.2	Die lipolytischen Enzyme EstCL, EstA3 und EstCE.....	95
4.4.3	Bei den Enzymen EstCL, EstCE und EstA3 handelt es sich um Esterasen...	96
4.4.4	Die Esterasen sind alkalistabil und weisen ebenfalls ein Aktivitätsoptimum im alkalischen Bereich auf.....	98
4.4.5	Die drei Esterasen hydrolysieren verschiedene Substrate enantioselektiv.....	99
4.4.6	Enzymatisches Fingerprinting der Esterasen.....	101
4.5	Ausblick.....	104
5	Zusammenfassung.....	106
6	Literatur.....	108
7	Anhang.....	120
7.1	Sequenzen der neu identifizierten Biokatalysatoren.....	120
7.2	Strukturformeln.....	121

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

	Seite
Abb. 1	3
Abb. 2	4
Abb. 3	7
Abb. 4	10
Abb. 5	11
Abb. 6	31
Abb. 7	35
Abb. 8	37
Abb. 9	38
Abb. 10	39
Abb. 11	39
Abb. 12	41
Abb. 13	43
Abb. 14	47
Abb. 15	48
Abb. 16	50
Abb. 17	52
Abb. 18	53
Abb. 19	54
Abb. 20	56
Abb. 21	58
Abb. 22	61
Abb. 23	63
Abb. 24	64
Abb. 25	68
Abb. 26	69
Abb. 27	71
Abb. 28	75
Abb. 29	78
Abb. 30	84

Abb. 31	Abhängigkeit der Eignung eines Biokatalysators von multiplen Parametern	92
Abb. 32	Vergleich der Aminosäuresequenzen von LipB und zwei Lipasen aus <i>P. fluorescens</i> B52 und <i>P. fluorescens</i> SIKW1	94
Abb. 33	Die biotechnologische Eignung von EstCL, EstCE und EstA3	103
Abb. 34	Nukleotidsequenz und Aminosäuresequenz von EstCL	120
Abb. 35	Nukleotidsequenz und Aminosäuresequenz von LCL2	120
Tab. 1	Liste der bis 2004 identifizierten Gene und Biokatalysatoren aus dem Metagenom mit hohem Potential für die Industrie	5
Tab. 2	Mögliche Gründe für die fehlende Aktivität von Enzymen beim metagenomischen Aktivitätsscreening und Lösungsansätze	9
Tab. 3	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	13
Tab. 4	Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide	14
Tab. 5	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	15
Tab. 6	Übersicht der zur Hybridisierung in Array-Experimenten genutzten Oligonukleotide	16
Tab. 7	Übersicht der eingesetzten Antibiotikakonzentrationen	23
Tab. 8	Übersicht der Substrate für die Bestimmung der Enantioselektivität	27
Tab. 9	Übersicht der Alkohole für die Bestimmung der Enantioselektivität	28
Tab. 10	Überblick der in dieser Arbeit hergestellten, bzw. zur Verfügung gestellten Metagenombibliotheken für ein Screening nach neuen Biokatalysatoren	36
Tab. 11	Übersicht der identifizierten Biokatalysatoren der verschiedenen Enzymklassen	42
Tab. 12	Repräsentatives Beispiel des Oligonukleotiddesigns am Beispiel der Signatursequenz einer putativen Lipase aus <i>C. glutamicum</i>	45
Tab. 13	Immobilisierungseigenschaften modifizierter und unmodifizierter Oligonukleotide (18-21 Basen) zweier Array-Slides mit verschiedenen Auftragspuffern	46
Tab. 14	Übersicht über die Biokatalysatoren, welche für eine weiterführende biochemische Charakterisierung in Frage kamen	57
Tab. 15	SDS-PAGE der gereinigten Enzyme EstCL, EstCE und EstA3 und deren theoretische Eigenschaften	59
Tab. 16	Aktivitäten der drei Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 gegenüber Triglyceriden und Vinylestern unterschiedlicher Kettenlängen	60
Tab. 17	Bestimmung der Aktivitäten von EstCL, EstCE und EstA3 gegenüber racemischen oder enantiomerenreinen Substraten	66
Tab. 18	Spezifische Aktivitäten von EstCL, EstCE und EstA3 gegenüber einer Auswahl an Vinylestern und Triglyceriden im Vergleich mit anderen bekannten lipolytischen Enzymen	98
Tab. 19	Strukturformeln der bei der gaschromatographischen Analyse verwendeten Substrate	121

Abkürzungen

Im folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgelistet. Dabei sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten ausgenommen. Darüber hinaus wurden Aminosäuren in dem gebräuchlichen Ein-oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

A. dest	destilliertes Wasser
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
ca	circa
Cm	Chloramphenicol
GC	Gaschromatographie, gaschromatographisch
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC	<i>enzyme code</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomeren-Überschuß
ER	Eppendorf Reaktionsgefäß
<i>et al</i>	<i>et alii</i> (und andere)
h	Stunde(n)
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
M	Molar
min	Minute(n), minütig
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl. open reading frame)
pA	<i>per analyse</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>p</i> -NP	<i>para</i> -Nitrophenyl
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheiten
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

Schätzungen zufolge existieren Mikroorganismen seit etwa 3,8 Milliarden Jahren, und seitdem passen Sie sich den jeweiligen Lebensbedingungen immer besser an und erschließen neue Lebensräume. Grund für diese Optimierung kann eine Verbesserung der enzymatischen Ausstattung sein, so dass beispielsweise das Nährstoffangebot vielfältiger genutzt werden kann. Die Enzyme, die sogenannten Nanomaschinen der Zellen, sind nicht nur optimiert worden, sondern auch in ihrer Vielfalt nahezu unerschöpflich. Die bei weitem umfangreichste Quelle sind die Mikroorganismen, die etwa 60 % der Biomasse auf der Erde ausmachen (214). Die Biotechnologie versucht, das „know how“ der Natur zu nutzen, also Prinzipien zu kopieren oder Ressourcen, wie z.B. Enzyme zu verwenden. Eine Anforderung an die Biotechnologie ist es, solche neuen Enzyme effizient zu finden, d.h. zum einen möglichst viele unterschiedliche Habitate zu erschliessen, sowie alle darin vorhandenen Mikroorganismen möglichst vollständig auf interessante Enzymkandidaten zu untersuchen.

1.1 Die weiße Biotechnologie

Seit einigen Jahren wird die Biotechnologie in drei Bereiche eingeteilt; die grüne (pflanzliche) Biotechnologie, die rote (medizinisch/pharmazeutische) Biotechnologie und die weiße (oder auch industrielle) Biotechnologie. Eine sehr allgemeine Definition hat die Europäische Gesellschaft der Bioindustrie „Europabio“ aufgestellt: „White biotechnology is the application of nature's toolset to industrial production“ (59). Im Fokus der weißen Biotechnologie steht demnach die Herstellung von Produkten mit biotechnischen Verfahren. Zu diesen Produkten gehören Bulk- und Feinchemikalien, Lebensmittel sowie Lebensmittelzusatzstoffe und Futtermitteladditive, Agrar- und Pharmaprodukte, Hilfsstoffe für verarbeitende Industrien wie technische Enzyme und Biokraftstoffe. Dazu setzt sie Mikroorganismen oder deren Bestandteile (Enzyme) als Basis für die industrielle Produktion ein. Diese Technologie wurde in den letzten Jahren immer bedeutender, und es wird geschätzt, dass in 10 % der organisch-chemischen Synthesestrategien die Biokatalyse Vorteile gegenüber der traditionellen chemischen Synthese aufweist (164). So verdoppelte sich die Anzahl der enzymatischen Produktionsverfahren in der jüngeren Zeit allein in der chemischen Industrie auf 130 (189). Andere Studien schätzen den Anteil biotechnischer Verfahren in der Herstellung verschiedener chemischer Produkte zur Zeit auf ca. 5 %; bis 2010 wird aber ein starker Anstieg auf bis zu 20 % postuliert (63, 141, 194). Nach einer Studie der weltweit tätigen Firmen-Beratungsagentur McKinsey wird erwartet, dass bei der Produktion von 30 - 60 % aller Feinchemikalien bis 2010 ein biokatalytischer Schritt involviert sein wird und die

weiße Biotechnologie ca. 10 - 20 % des gesamten chemischen Marktes mit jährlichen Wachstumsraten von 11 - 22 % ausmachen wird (66, 141). Bisher wurde der Großteil der chemischen Umsetzungen allerdings noch nicht auf eine Umstellung auf eine biotechnische Verfahrensweise geprüft, da die Industrie oft nur zögerlich einmal etablierte chemische Verfahren aufgibt, obwohl sie evtl. viel ökonomischer und kostenneutraler sein könnten (41). Außerdem stehen natürlich nicht für jede chemische Reaktion die entsprechenden Biokatalysatoren zur Verfügung und in vielen Fällen wird es auch nahezu unmöglich sein, bzw. wird es unwirtschaftlich bleiben, chemische Prozesse komplett zu ersetzen. Einigen chemischen Unternehmen mangelt es möglicherweise auch an der notwendigen Expertise im Bereich der Mikrobiologie und Biotechnologie, um Verfahren auf der Basis von Biokatalysatoren einzusetzen. Trotzdem war schon in den letzten 10 Jahren ein Anstieg des Marktvolumens für Enzyme von 50 % zu verzeichnen (8), was auch verdeutlicht, wie groß der Bedarf an (neuen) Biokatalysatoren ist. Unbestritten wird die weiße Biotechnologie in den nächsten Jahren immer bedeutender und eine Voraussetzung dafür ist ein breites Repertoire verschiedenster Biokatalysatoren, die z.B. aus der mikrobiellen Vielfalt mit innovativen Techniken isoliert werden müssen.

1.2 Der Metagenomansatz: von der Ökologie zur Biotechnologie

Im Jahre 1987 stellte Carl Woese ein Modell zur Taxonomie der Bereiche des Lebens auf, wobei der zu Grunde liegende Parameter die 16S rRNA war (217). Damals wurde die Domäne der Bakterien mit dieser Methode in 12 Linien (auch Reiche genannt) eingeteilt, wozu beispielsweise die Proteobakterien, die Spirochaeten oder die Actinobakterien gehören (Abb. 1). Eine neue Ära der mikrobiellen Ökologie begann, als die Sequenzierung der 16S rRNA benutzt wurde, um auch unkultivierte Mikroorganismen zu beschreiben. Es wurde gezeigt, dass nur ca. 1% oder weniger der bakteriellen Diversität aus einer Umweltprobe mit Standardkulturtechniken isoliert werden konnten (4).

Um dieses Problem zu umgehen, wird im so genannten Metagenomansatz die gesamte DNA (das Metagenom) einer Umweltprobe direkt isoliert und gegebenenfalls in geeignete Vektorsysteme kloniert, wobei die entstehenden Metagenombibliotheken beispielsweise für ein Aktivitätsscreening nach Biokatalysatoren zur Verfügung stehen. Die isolierte DNA kann aber auch zwecks Identifizierung der mikrobiellen Zusammensetzung direkt zur Amplifikation der rDNA benutzt werden. Erstmals angewendet wurde diese Technik 1984 bei der Identifizierung von Tubenwurm-assoziierten Symbionten durch die Analyse der entsprechenden 5S rDNA (187), wogegen Metagenombibliotheken erst 1991 konstruiert

wurden (178). Der Stammbaum von 1987 wurde 1998 in einer überarbeiteten und um die unkultivierten Bakterien erweiterten Version vorgestellt (90). Diese Liste schlug nun 36 verschiedene Linien der Bakteriendomäne vor, der neueste Stammbaum umfasst mittlerweile 52 Linien, von denen 26 Linien ausschließlich bisher unkultivierte Organismen aufweisen ((154), Abb. 1).

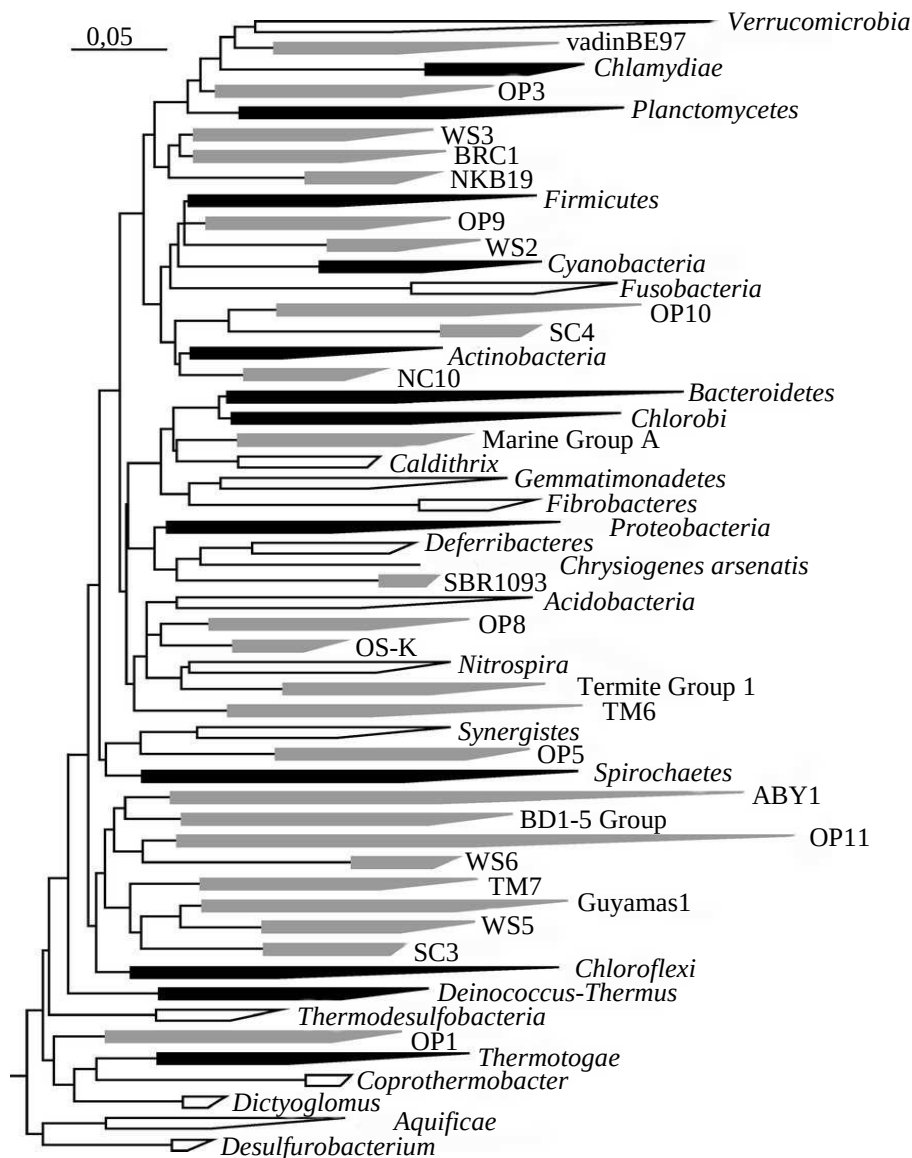


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum nach Rappe & Giovannoni (154). Schwarz: die 12 bakteriellen Linien nach Woese (217), Grau: neue Linien mit kultivierbaren Arten, Weiß: neue Linien ohne bisher kultivierbare Arten.

Die Zahl der 16S rRNA Gene, die aktuell (Stand: 07/05) in der Genbank deponiert sind beträgt ~ 32.000 (zum Vergleich: Stand 01.04.2004: ~ 21.000) für die kultivierten Bakterien, während bereits ca. 116.000 (zum Vergleich: Stand 01.04.2004: ~ 54.000) aus bislang

unkultivierten Bakterien stammen (Berechnung nach (154)). Diese Zahlen belegen eine explosionsartige Zunahme des Wissens über die enorme Vielfalt im Reich der Bakterien. Diese Diversität birgt auch ein gewaltiges biotechnologisches Potential, denn auch die enzymatische Ausstattung der bislang unkultivierten Bakterien ist unbekannt und kann nun genutzt werden. Denn seit vielen Jahren war die Identifizierung von neuen Biokatalysatoren von einer arbeitsintensiven Laborarbeit geprägt, welche die oft mühsame Kultivierung und das anschließende Screening von mikrobiellen Organismen nach den gewünschten Eigenschaften umfasste (Abb. 2, linke Seite).

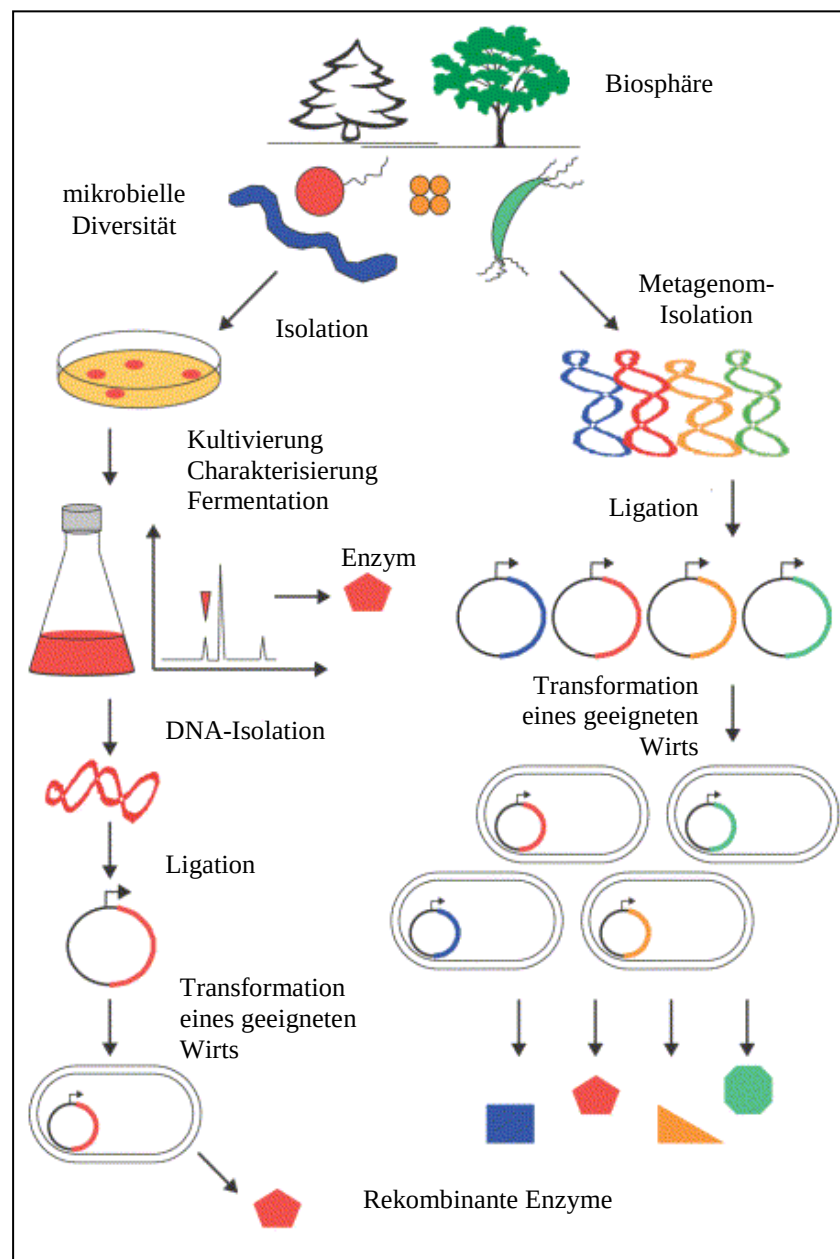


Abb. 2.: Schematischer Vergleich des klassischen (links) und des „Metagenom-Ansatzes“ (rechts) zur Isolierung von Biokatalysatoren (135). Details s. Text.

Fast alle industriell genutzten Biokatalysatoren stammen bisher aus einer vergleichsweise kleinen Gruppe von Organismen, die unter kontrollierten Bedingungen im Labor kultiviert werden können, also der „Spitze des Eisbergs“ aller existierenden Mikroorganismen. Mit dieser klassischen Technik konnten viele industriell wertvolle Enzyme isoliert werden, der Metagenomansatz steigert jedoch das theoretische Repertoire an Biokatalysatoren um ein Vielfaches (Abb. 2, rechts). In neuerer Zeit werden immer mehr Anstrengungen unternommen, nicht nur die Verschiedenartigkeit der untersuchten Habitate um Nischen zu vergrößern, wie z.B. Biofilme (176, 203) extreme Standorte (10, 12, 91, 144, 160) oder Human-assoziierte Mikroorganismen (48, 213), sondern auch der Umfang der sequenzierten Metagenominformation wird immer größer. So wurden bei der Sequenzierung von marinen Proben aus der Sargasso-See durch das Labor von Genompionier Craig Venter über eine Million neue proteinkodierende Gene aus unkultivierten Bakterien entdeckt, wodurch die Anzahl der bisher bekannten Gene verdoppelt wurde (206).

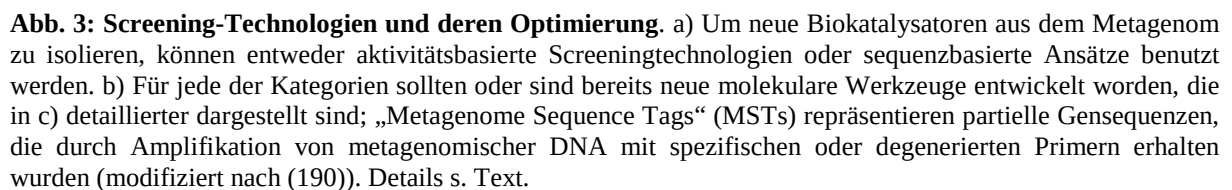
Tab. 1. Liste der bis 2004 identifizierten Gene und Biokatalysatoren aus dem Metagenom mit hohem Potential für die Industrie (190).

Identifizierte funktionelle Gene/Enzyme	Referenzen
Lipasen und Esterasen	(16, 166, 176, 208)
Polysaccharid modifizierende Enzyme	
α -Amylasen	(161, 166, 176, 208)
α -1,4 Glukan verzweigende Enzyme	(176, 208)
β -Agarasen	(208)
Chitinasen	(35)
Cellulasen	(83)
Oxidoreduktasen/Dehydrogenasen	
Alkohol Oxidoreduktasen	(115, 116)
Di-Keto-D-Glukonsäure Reduktasen	(58)
4-Hydroxybuttersäure Dehydrogenasen	(86)
Andere Enzyme	
Proteasen	(172)
Nitrilasen	(44)
Vitaminbiosynthese	
Biotin Biosynthese	(57)
Produktion von Bulkchemikalien (Jahresproduktion > 10 T)	
1,3 Propandiol Biosynthese	(114)
Antibiotika und Arzneimittel Biosynthese	
Turbomycin A, B	(73)
Polyketid Synthetase	(36, 150)
Violacein	(24)
Langkettige N-Acyltyrosine	(23, 25)
Indirubin	(137)
Terragine	(210)

Erstmals wurde im Jahr 2000 von einer umfangreichen Untersuchung von metagenomischer DNA aus Bodenproben im Hinblick auf die Isolierung von verschiedensten Biokatalysatoren berichtet (166). Hierbei wurde eine DNA-Bibliothek von insgesamt fast 30.000 Klonen in BAC-Vektoren (bacterial artificial chromosomes) angelegt, welche in der Lage sind, bis zu ca. 200 kb an Fremd-DNA aufzunehmen. Diese Metagenombank wurde einer Reihe von Aktivitätsassays unterzogen und es konnten Klone identifiziert werden, die antibakterielle, lipolytische, DNase- oder amilolytische Aktivität zeigten. In den letzten Jahren wuchs dann die Anzahl der aus dem Metagenom isolierten Enzyme sprunghaft an. Tabelle 1 vermittelt einen Überblick der bislang gefundenen Biokatalysatoren mit biotechnologischem Potential aus dem Metagenom. Gleichzeitig konnte man auch eine Zunahme an Publikationen zum Thema Metagenom, sowie die Veröffentlichung von verschiedenen Methoden, die beispielsweise die DNA-Isolationstechnik oder das Screening von Metagenombanken optimieren, bemerken (163, 191). Es ist also auch zukünftig mit einem starken Zuwachs an neuen Biokatalysatoren aus dem Metagenom zu rechnen.

1.3 Das Screening

Eine wichtige Voraussetzung zur Identifizierung von Biokatalysatoren nicht nur aus dem Metagenom ist das entsprechende Screeningsystem. Mittlerweile gibt es verschiedenste Verfahren, um eine Suche nach interessanten Enzymkandidaten zu erleichtern, wie in Abbildung drei zusammenfassend dargestellt ist. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten von Vorgehensweisen, die oft auch parallel durchgeführt werden (176, 208): Beim Aktivitätsscreening werden Metagenombibliotheken meist mit einfachen Plattenassays durchmustert, um einen hohen Durchsatz zu ermöglichen. Dagegen wird beim sequenzbasierten Screening entweder die metagenomische DNA in relativ kleinen Fragmenten von 2-5 kb in „Shotgun-Vektoren“ kloniert und oft im Megabasenbereich sequenziert („gene mining“, (176, 203, 206)), oder interessante Gene werden mittels PCR oder Hybridisierung mit entsprechenden Signatursequenzen identifiziert, wie bereits für Polyketidsynthetasen, Proteorhodopsine oder Nitrilhydratasen gezeigt wurde (Abb. 3, rechte Seite, (36, 40, 129)). Für die beiden zuletzt genannten Ansätze ist es zunächst notwendig, konservierte Bereiche der gesuchten Enzymgruppe zu identifizieren. Beim sequenzbasierten Screening lassen sich also keine absolut neuen Biokatalysatoren, d.h. solche mit einer stark abweichenden oder völlig neuen Struktur identifizieren, da man sowohl beim „gene mining“, als auch bei Verfahren, bei denen PCR oder Hybridisierung angewendet wird, auf eine relativ hohe Homologie zu bereits bekannten Proteinen angewiesen ist (129, 135). Trotzdem lassen



7

unterschiedlichen Methoden versucht, die Effizienz des Screenings zu verbessern (Abb. 3, b+c, linke Seite): Da der größte „bottleneck“ beim Aktivitätsscreening die Verwendung eines heterologen Wirtsorganismus ist, sind hier die größten Erfolge bei der Screeningsoptimierung zu erwarten. Der heterologe Wirt könnte mit einer anderen (weiteren) Sekretionsmaschinerie ausgestattet werden, so dass ein Proteintransport stattfinden kann, der entweder für die Enzymaktivität selbst oder für die Detektion im Assay obligat sein kann. Zusätzlich wäre es vorteilhaft, den Expressionswirt mit verschiedenen Faltungshelfern (Chaperonen) aus unterschiedlichen Organismen zu ergänzen, um die Chance zu erhöhen, eine korrekte Enzymstruktur zu erhalten. Des Weiteren kann auch der abweichende Codongebrauch zu einem nicht translatierten Protein führen: durch die Erweiterung der Anzahl der verfügbaren tRNA-Gene könnte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass auch heterologe Enzymgene produziert werden. Stämme mit einem erweiterten Codongebrauch durch zusätzliche, plasmidkodierte eukaryontische tRNA-Gene sind bereits im Handel (z.B. *E. coli* Expressionsstämme Rosetta, BL21(DE3) CodonPlusRIL, NOVAGEN). Einige Arbeitsgruppen und Firmen haben auch bereits erfolgreich versucht, nicht nur *E. coli* als heterologen Wirt zu nutzen, sondern die Chance auf ein aktives Enzym dadurch zu erhöhen, die Metagenombibliotheken in verschiedenen Bakterien zu durchmustern (134, 210). Weiterhin kann es von Vorteil sein, eine Anreicherung von interessanten Mikroorganismen, die ein bestimmtes Substrat nutzen können, durchzuführen. Dabei sollte das Substrat einen Wuchsvorteil ermöglichen, wie bei der Isolierung von verschiedenen Biotin-Operons oder Agarasen gezeigt wurde (57, 208). Anschließend kann wiederum die Gesamt-DNA isoliert und kloniert werden. Durch eine Isotopenmarkierung des Substrats kann die genomische DNA von Mikroorganismen, die das Substrat wirklich nutzen, von anderer genomischer DNA elegant getrennt werden: die Bakterien bauen das schwere Isotop (z.B. ^{13}C oder ^{15}N) in die chromosomale DNA ein, welche sich dann durch eine Ultrazentrifugation im Dichtegradienten von der leichten, unerwünschten DNA trennen lässt. Mit dieser Technik wurden bereits neue Methanmonooxygenasen und Methanoldehydrogenasen isoliert (152, 153). Die denkbaren Gründe für eine fehlende Aktivität beim Aktivitätsscreening sind also vielfältig; einige entsprechende Lösungsansätze sind bereits durchgeführt worden oder könnten die Effizienz zumindest theoretisch verbessern (Tab. 2). Die Zunahme an Methoden zur effizienteren Nutzung von unkultivierten Mikroorganismen gerade in den letzten fünf Jahren zeigt, dass auf dem jungen Forschungsgebiet des Metagenomansatzes nicht nur große Fortschritte gemacht wurden, sondern dass es schon in vielen biotechnologisch ausgerichteten Laboren zur Standardtechnik geworden ist.

Tab. 2: Mögliche Gründe für die fehlende Aktivität von Enzymen beim metagenomischen Aktivitätsscreening und Lösungsansätze. Oben: Gen-Ebene, unten: Protein-Ebene.

Problem	Ursache	Wirkung	Lösungsansatz
Promotor	vom heterologen Wirt nicht erkannt	keine Expression	Integration von Transposon-kodierten Promotoren (diese Arbeit)
Codongebrauch	vom heterologen Wirt nicht unterstützt	keine/unvollständige Expression	Expression zusätzlicher tRNA-Gene (z.B. Rosetta, NOVAGEN)
Induktion	Expression muss induziert werden	keine Expression	Zugabe von induzierenden Agenzien, wie Avidin zur Isolierung von Biotin-Operons (57)
Faltung	nicht korrekt	inaktives Enzym	Co-Expression von Chaperonen
Modifikation	posttranslationale Modifikation unvollständig	inaktives Enzym	Nutzung verschiedener Expressionswirte
Toxizität	Expression ist für den heterologen Wirt toxisch	evtl.unklonierbar, Enzym abgebaut	Nutzung verschiedener Expressionswirte
akzessorische Gene	für Aktivität essentielle, akzessorische Gene fehlen	inaktives Enzym	Klonierung großer Fragmente, Co-Expression
Proteinabbau	Protein wird nach der Expression abgebaut	keine Aktivität meßbar	Protease-defiziente Expressionsstämme
Sekretion	fehlender Proteintransport	fehlende Detektion im Assay, evtl. inaktives Enzym	Nutzung verschiedener Expressionswirte

1.4 Lipasen

Eine besonders wichtige Gruppe von Biokatalysatoren bilden die lipolytischen Enzyme, also Esterasen [EC 3.1.1.1] und Lipasen [EC 3.1.1.3] (9, 93), da sie die chemo-, regio- oder enantioselektive Hydrolyse von Esterverbindungen oder die umgekehrte Reaktion in organischen Lösungsmitteln katalysieren (Abb. 4; (94, 96, 158)). Im allgemeinen werden Lipasen heute als Carboxyl-Ester-Hydrolasen definiert, die sich von den Esterasen durch die Fähigkeit abgrenzen, wasserunlösliche und langkettige (Kettenlänge $C \geq 10$) Triacylglycerole zu spalten. Allerdings können Lipasen auch in der Lage sein, kürzerkettigere „Esterase Substrate“ zu spalten, die maximale Aktivität zeigen sie jedoch gegen Substrate, die Emulsionen bilden (30, 207). Lipasen gehören strukturell zu der Klasse der α/β Hydrolasen, benötigen keine Cofaktoren und werden nach Arpigny & Jäger in acht Familien unterteilt (7). Sie werden in verschiedensten industriellen Bereichen biotechnologisch genutzt, u.a. in der

Lebensmittel-, der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie, für Detergenzien, Öle und Fette, Biopolymere und für die Papierherstellung.

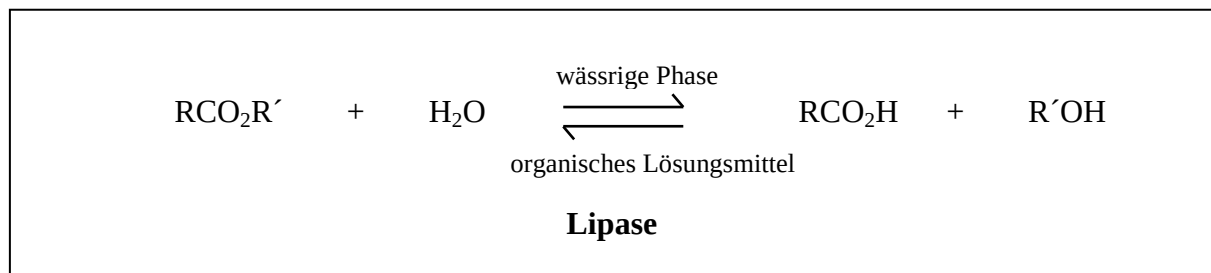


Abb 4.: Esterhydrolyse und reversible Reaktion durch Lipasen.

Aufgrund dieses breiten Anwendungspotentials wurden die Lipasen zum häufigsten verwendeten Biokatalysator in der organischen Synthese. So sind mindestens 21 Lipasen (aus wenigstens 11 verschiedenen Organismen) kommerziell erhältlich, welche von 12 verschiedenen Firmen vertrieben werden (79). Diese Mannigfaltigkeit der Anwendungsmöglichkeiten zeigt, dass ein hoher Bedarf an diesen Enzymen besteht, der auch aus dem Metagenom gedeckt werden kann. So berichten auch schon einige in jüngerer Zeit erschienene Publikationen über die Isolation von lipolytischen Enzymen aus dem Metagenom (16, 87, 127, 160, 208). Jedoch wird aktuell noch keines dieser Enzyme industriell genutzt, was neben anderen möglichen Gründen auch auf die geringe Verknüpfung von Forschungseinrichtungen zu der industriellen Verwertung hinweist.

1.5 Intention dieser Arbeit

Die Nutzung des Metagenoms ist ein zukunftsweisendes Gebiet, nicht nur die Erforschung der mikrobiellen Ökologie betreffend, sondern auch aufgrund des Potentials zur biotechnologischen Anwendung.

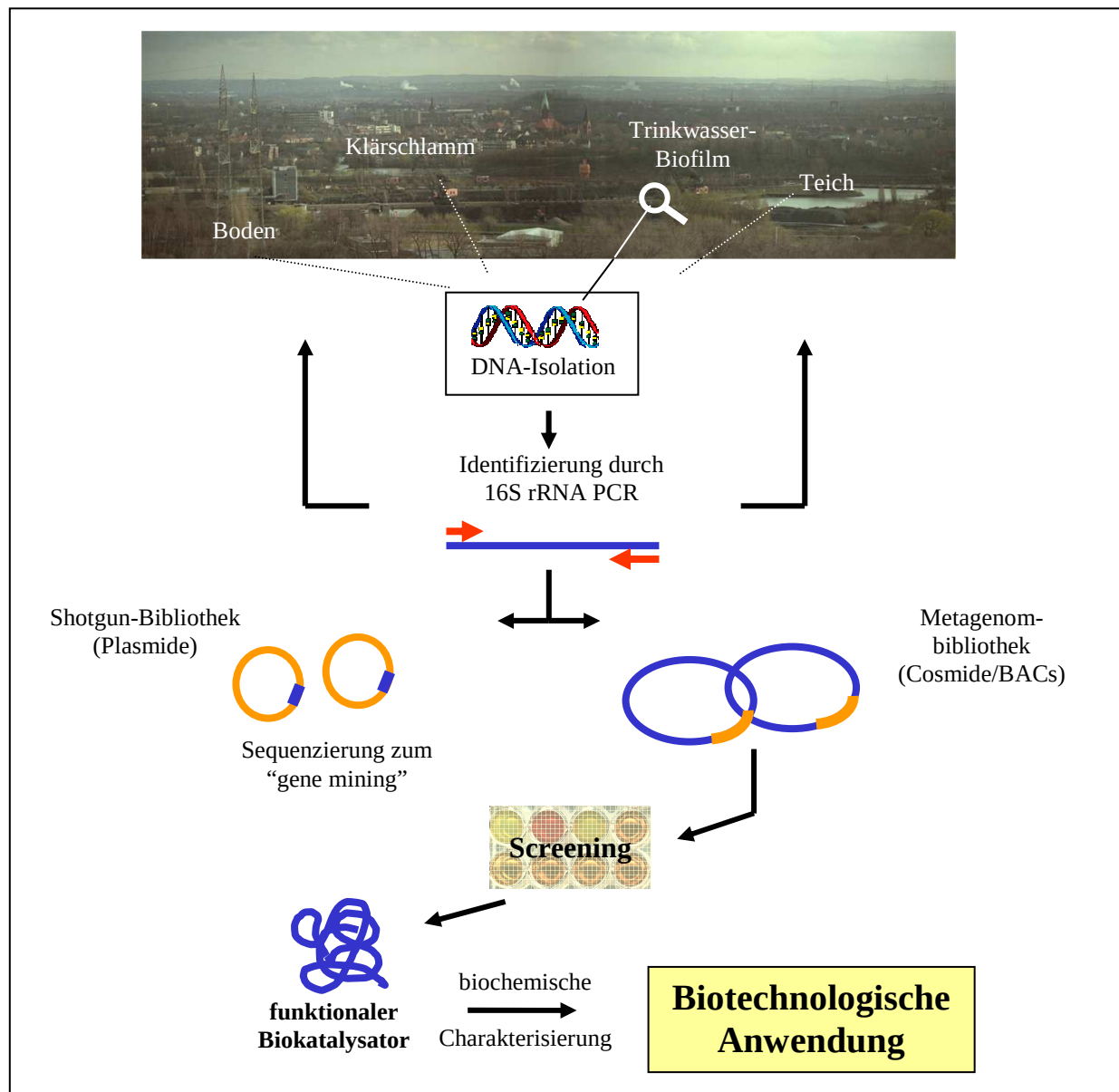


Abb. 5: Schematische Darstellung der Vorgehensweise in dieser Arbeit. Die Gesamt-DNA verschiedener Habitats, wie z.B. aus einem Trinkwasserbiofilm, wurde zunächst isoliert und mittels 16S rRNA PCR die mikrobielle Zusammensetzung des Habitats analysiert (AG Streit). Anschließend wurde die DNA partiell verdaut und entweder in Plasmide zur Sequenzierung oder in Cosmide bzw. BAC's (bacterial artificial chromosomes) kloniert (größtenteils AG Streit). Die Cosmid/BAC-Metagenombibliotheken wurden auf verschiedene Biokatalysatoraktivitäten durchmustert, wobei auch neue Assays und Expressionstools verwendet wurden. Identifizierte funktionale Biokatalysatoren wurden biochemisch charakterisiert und zur biotechnologischen Anwendung vorbereitet.

Die Vielfalt an neuen Biokatalysatoren aus den bisher unkultivierten Mikroorganismen ist nahezu unerschöpflich, allerdings steckt dieser Forschungszweig noch in den Kinderschuhen. Erstmals wurde 1998 vom großen biotechnologischen Potential der unkultivierten Bakterien berichtet (81). Seitdem steigt die Zahl der Publikationen, die dieses Thema behandeln, stark an (191). Diese Arbeit wurde im Rahmen des vom Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekts „GenoMiks“ im Cluster 4.1 des Netzwerks Göttingen durchgeführt. Dabei sollte die Arbeit in enger Kooperation besonders mit der Arbeitsgruppe von Prof. W. Streit der Universität Göttingen (jetzt Universität Duisburg-Essen) angefertigt werden (Abb. 5). In diesem Verbund sollten verschiedene Biofilme mit Hilfe des Metagenomansatzes untersucht werden (176, 208). Die Aufgabenteilung sah hierbei vor, dass bei der AG Streit die Erstellung der Metagenombanken und deren mikrobielle Zusammensetzung mittels 16S rRNA Analyse durchgeführt wurde, wogegen in der Arbeitsgruppe von Prof. K.-E Jäger (Universität Düsseldorf) und in dieser Arbeit die Identifizierung und Charakterisierung von Biokatalysatoren im Vordergrund stand. Zunächst sollten neue Assays und effizientere Screeningmethoden entwickelt werden, aber auch die Technik der Metagenom-Isolierung durchgeführt werden. Des Weiteren sollten auch neue, innovative Wege zur Nutzung des Metagenoms besprochen werden, wie die Etablierung eines Array-Systems zur Detektion und Isolierung von lipolytischen Enzymen, später dann von verschiedensten Biokatalysatoren (s. Abb. 3, rechte Seite). Wie in der Einleitung unter 1.4 dargestellt, handelt es sich bei den lipolytischen Enzymen um besonders interessante Biokatalysatoren mit breitem Anwendungsspektrum. Eine Hauptaufgabe war demnach die Isolierung neuer lipolytischer Enzyme und deren detaillierte biochemische Charakterisierung, um sie bei Bedarf und entsprechender Eignung industriell zu verwerten.

2. Material & Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Antibiotika und Enzyme wurden von den folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen: **Antibiotika:** SERVA (Heidelberg)

Chemikalien: FLUKA (Sternheim), MERCK (Darmstadt), ROTH (Karlsruhe) und SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen). **Enzyme:** Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI FERMENTAS (St. Leon-Roth) bezogen. *Pfu*-Polymerasen wurden bei der Firma STRATAGENE (Heidelberg) erworben. *Taq*-Polymerasen stammten von der Firma MBI FERMENTAS (St. Leon-Roth). Die T4-DNALigase wurde von der Firma MBI FERMENTAS (St. Leon-Roth) bezogen. Weitere Enzyme: Lysozym von SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen). Transposasen wurden entweder von der Firma EPICENTRE (Madison, USA) oder der Firma FINNZYMES (Espoo, Finnland) bezogen.

Medienkomponenten: INVITROGEN (Karlsruhe), OXOID (Wesel), ROTH (Karlsruhe) und SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen).

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 ara\Delta 139$ $\Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL$ (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	(77)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F- <i>supE44 lacZ\Delta M15 \Delta lacU169 hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> λ^-	(80)
<i>Escherichia coli</i> JM109	F' <i>traD36 lacI^q \Delta(lacZ)M15 pro</i> <i>A⁺B⁺/e14⁻(McrA⁻) \Delta(lac-proAB) thi</i> <i>gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺)</i> <i>relA1 supE44 recA1</i>	(220)
<i>Escherichia coli</i> VCS 257	DP50 <i>sup</i> F[<i>supE44 supF58 hsd53(r_B</i> <i>m_B) dapD8 lacY1glnV44 \Delta(gal-uvrB)47</i> <i>tyrT58 gyrA29 tonA53 \Delta(thyA57)</i>]	STRATAGENE, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> Novablue (DE3)	<i>endA1 hsdR17(r_{K12}-m_{K12}⁺) supE44 thi-1</i> <i>recA1gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proA⁺B⁺</i> <i>lacI^qZ\Delta M15 ::Tn10</i>](DE3)	NOVAGEN, Madison, USA
<i>Escherichia coli</i> JM109 (DE3)	wie <i>Escherichia coli</i> JM109, (<i>\lambda</i> CIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i>)	PROMEGA, Madison, USA
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (<i>\lambda</i> CIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7</i> <i>gene1</i>)	(192, 193)

Fortsetzung Tab. 3

<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>thi pro hsdR^M</i> mit chromosomal integriertem [RP4-2-Tc::Mu:Km ^r ::Tn7, Tra ⁺ Tri ^r Str ^r] (186)
<i>P. aeruginosa</i> PABST7.1	$\Delta(^{3/4}lipA^{1/3}lipH)$, miniD-180 (Tc ^r lacI ^q) (100) P _{lacUV5} -T7 <i>gene1</i>)

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide

Vektoren für <i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
pUC18 / pUC19	ColE1 P _{lac} <i>lacZ'</i> Amp ^r	(220)
pBlueskriptII KS/SK	P _{T7} P _{T3} P _{lac} <i>lacZ'</i> Amp ^r ColE1	STRATAGENE, Heidelberg
pET16b	P _{T7} P _{lac} Amp ^r ColE1, His-Tag	NOVAGEN, Madison, USA
pET22b	P _{T7} P _{lac} Amp ^r ColE1, <i>pelB</i> Signalsequenz, His-Tag	NOVAGEN, Madison, USA
PQE-30	P _{T5} Amp ^r ColE1, His-Tag	QIAGEN, Hilden
pBELOBAC11	P _{T7} P _{SP6} λ cos ⁺ <i>lacZ'</i> <i>oriS</i> <i>repE</i> Cm ^r	(111)
pBADHISA	P _{BAD} <i>araC</i> Amp ^r , His-Tag	INVITROGEN, Karlsruhe
Vektoren mit weitem Wirtsbereich	Genotyp	Referenz
pLAFR3	Cosmid-Vektor aus pLAFR1, IncP1 λ cos ⁺ <i>rlx</i> Tc ^r	(67)
pBBR1MCS	<i>rep mob lacZ'</i> Cm ^R	(120)
pBR22b	<i>rep mob lacZ'</i> (MCS: pET22b)	(167)
pWE15	<i>Apr Neor</i> λ cos ⁺ Amp ^r	STRATAGENE, Heidelberg
rekombinante Plasmide	Genotyp	Referenz
pRK2013	<i>tra</i> (RK2) ⁺ Km ^r ColE1	(65)
pSWGFP	pTZ10 mit promotorlosem <i>gfp</i>	Wilhelm, unveröffentlicht
pMuExpressCm	pBluescriptIIKS Amp ^r mit Transposon MuExpress Cm ^r	(128)

Fortsetzung Tab. 4

pMuExpressKn	pBluescriptIIKS Amp ^r mit Transposon (128) MuExpress Kn ^r	
p11EstCL	pET11a mit <i>estCL</i>	diese Arbeit
p16EstCL	pET16b mit <i>estCL</i> , N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
p11LCL2	pET11a mit <i>lCL2</i>	diese Arbeit
p16LCL2	pET16b mit <i>lCL2</i> , N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
p22LCL2	pET22b mit <i>lCL2</i> , C-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pEAM11a	pET11a mit <i>amiE</i> aus <i>P. aeruginosa</i>	diese Arbeit
pEAM16b	pET16b mit <i>amiE</i> aus <i>P. aeruginosa</i> , N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pBRAMIE	pBBR1MCS mit <i>amiE</i> aus <i>P. aeruginosa</i>	diese Arbeit
pEXE22b	pET22b mit <i>lipB</i> (XE1), C-terminaler His-Tag	diese Arbeit
p16ESTA3	pET16b mit <i>estA3</i> , N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pETRANS	pET11a mit <i>amiBCRS</i> Operon aus <i>P. aeruginosa</i>	diese Arbeit
pATRANS	pBADHISA mit <i>amiBCRS</i> Operon aus <i>P. aeruginosa</i>	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen INTERAKTIVA (Ulm), bzw. QIAGEN (Hilden) bezogen.

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Merkmal/ Modifikation
EstCLup	AGAGACCATATGACCGATCCCTATGTGCG	<i>NdeI</i>
EstCLdw	CGGTTTGGATCCTCATGCTTCTGCCATAAC	<i>BamHI</i>
LCL2up	ACTATCCATATGAAAAGAAAAACAATCTTC	<i>NdeI</i>
LCL2dw	TAATTAGGATCCATTACTGCGGCAAACCTTG	<i>BamHI</i>
LCL2dwCHIS	TTAGTTAAGCTTCTGCGGCAAACCTTGCAAG	<i>HindIII</i>

Fortsetzung Tab. 5

EstA3-16b-up	AACCGCC <u>ATATG</u> AGCGCCGAAGAACTAGGG	<i>NdeI</i>
EstA3-16b-dw	GATCGAGGATCCTGATTTAGGCGGCGAGCG	<i>BamHI</i>
Ami1	TGAGCGCCATGGTTGACCAGTCCCGCCGGC	<i>NcoI</i>
Ami2	CGAAACGCTGTCCCAGGACCCCGGCGGCGA	<i>PpuMI</i>
Ami3	GGTCCGGATCGCCGCCGGGGTCCTGGGACA	<i>PpuMI</i>
Ami4	CTTTCCGAATTCCTGCTATGCCTTGAGCAC	<i>EcoRI</i>
AmiEup	AGAGACCATATGCGTCACGGCGATATTTCCA	<i>NdeI</i>
AmiEdw	GTCTTAGGATCCAGTCCGGAGGAAGAGGTC	<i>BamHI</i>
XE1upa	GATATACATATGGGTGTGTACGACNACAA	<i>NdeI</i>
XE1dwb	GGTGCTCGAGTGCCGCTTCCGCCGAGCAAATG	<i>XhoI</i>
XE1upc	CCGACGCCATGGATATCACGCTGNACNCCTATC	<i>NcoI</i>
XE1dwd	GGTGGGATCCTCATGCCGCTTCCGCCGAGCAAA	<i>BamHI</i>
XE1upe	CCGACCATATGGCGATCACGCTGNACNCCTATC	<i>NdeI</i>

Tab. 6: Übersicht der zur Hybridisierung in Array-Experimenten genutzten Oligonukleotide. Jedes Oligonukleotid wurde auf Ähnlichkeit zu Sequenzen in den Genomen aller vier verwendeten Bakterienstämmen überprüft. Abweichungen von Signatursequenzen sind unterstrichen. Die Identität zur nächstbesten Sequenz im eigenen Genom ist mit einem Pfeil markiert [→]. *C.g.*: *Corynebacterium glutamicum*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *A.t.*: *Agrobacterium tumefaciens*; *P.a.*: *Pseudomonas aeruginosa*. Abw.: Abweichung

Organismus/Enzym (Genbank)	Motiv	Abw.	DNA Sequenz / Bezeichnung	Identität
<i>C. glutamicum</i> Lipase (RCGL00090)	GHSQGG	-	GGCCACTCCCAAGGCGGC LC1	P.a. 16 C.g. 18 →12 E.c. 11 A.t. 13
<i>C. glutamicum</i> Lipase (RCGL01805)	GFSQGG	-	GGATTCTCCCAAGGAGGC LC2	P.a. 12 C.g. 18 →13 E.c. 11 A.t. 12
<i>C. glutamicum</i> Hydrolase (RCGL00101)	GHSMGG	-	GGCCATTCCATGGGTGGA LC3	P.a. 12 C.g. 18 →13 E.c. 12 A.t. 14
<i>C. glutamicum</i> Paranitrobenzyl Esterase (RCGL0134)	GESAGA	-	GGCGAATCCGCGGGCGCT LC4	P.a. 16 C.g. 18 →12 E.c. 12 A.t. 13
<i>C. glutamicum</i> Gyrase ORF6	GDSAGG	-	GGCGACTCCGCAGGTGGT LC5	P.a. 14 C.g. 18 →13 E.c. 12 A.t. 17

Fortsetzung Tab. 6

Organismus/Enzym (Genbank)	Motiv	Abw.	DNA Sequenz / Bezeichnung	Identität
<i>C. glutamicum</i> Esterase ORF 130	GDSAGG	-	GGTGACAGTGCCGGTGGA LC6	P.a. 15 C.g. 18 →13 E.c. 13 A.t. 14
<i>C. glutamicum</i> Lipase ORF 1378	GDSAGG	-	GGGGACAGCGCCGGTGGC LC7	P.a. 13 C.g. 18 →13 E.c. 13 A.t. 16
<i>A. tumefaciens</i> Esterase/Lipase (NP_532679)	GLSMGG	-	GGCCTCTCCATGGGCGGT LC8	P.a. 14 C.g. 14 E.c. 13 A.t. 18 →17
<i>A. tumefaciens</i> Esterase D (NC_003304)	GHSMGG	-	GGCCATTTCGATGGGCGGT LC9	E.c. 15 P.a. 13 C.g. 12 A.t. 18 →13
<i>A. tumefaciens</i> Arylester hydrolase (NP_535668)	PIVFBHG	-	CCCATCGTGTTCGTCCACGGC LC10	P.a. 16 C.g. 16/15 E.c. 14 A.t. 21 →13
<i>A. tumefaciens</i> konserviertes Protein (NC_003305)	PIVFLHG	-	CCGATCGTTTTCTGCATGGC LC11	P.a. 15 C.g. 14 E.c. 16 A.t. 21 →15
<i>A. tumefaciens</i> Hydrolase (NC_003304)	GYSMGA	-	GGCTATTCCATGGGTGCG LC12	P.a. 12 C.g. 13 E.c. 13 A.t. 18 →12
<i>A. tumefaciens</i> konserviertes Protein (NC_003304)	ILVWLFG	-	ATTCTCGTCTGGCTGTTCGGC LC13	P.a. 15 C.g. 12 E.c. 14 A.t. 21 →14
<i>A. tumefaciens</i> Lipase/Esterase (NP_535720)	GDSAGG	-	GGTGACAGTGCCGGCGGC LC14	P.a. 14 C.g. 14 E.c. 16 A.t. 18 →12
<i>E. coli</i> Lysophospholipase (6586)	AHSMGG	-	GCACATTTCGATGGGCGGT LC15	P.a. 12 C.g. 13 E.c. 18 →13 A.t. 15
<i>E. coli</i> Hydrolase (2103)	GHSMGG	-	GGTCACTCAATGGGTGGT LC16	P.a. 11 C.g. 12 E.c. 18 →13 A.t. 12
<i>E. coli</i> Hydrolase (4438)	GHSMGG	-	GGTCATTCTATGGGCGGG LC17	P.a. 11 C.g. 11 E.c. 18 →12 A.t. 12
<i>E. coli</i> Esterase (4592)	GHSMGG	-	GGTCACTCCATGGGCGGT LC18	P.a. 14 C.g. 14 E.c. 18 →11 A.t. 13
<i>E. coli</i> Esterase (4592)	PIVLVHG	-	CCCATCGTTCCTGTCCACGGT LC19	P.a. 13 C.g. 13 E.c. 21 →12 A.t. 15

Fortsetzung Tab. 6

Organismus/Enzym (Genbank)	Motiv	Abw.	DNA Sequenz / Bezeichnung	Identität
<i>E. coli</i> Hydrolase (2474)	PLLLIHG	-	CCGCTTTTACTCATTACGGT LC20	P.a. 12 C.g. 13 E.c. 21 →15 A.t. 14
<i>P. aeruginosa</i> Lipase LipC (U75975)	GHSQGG	-	GGCCACAGCCAGGGCGGC LC21	P.a. 18 →14 C.g. 13 E.c. 13 A.t. 13
<i>P. aeruginosa</i> Lipase LipC (U75975)	PIVLSHG	-	CCCATCGTGCTGTCCCACGGT LC22	P.a. 21 →19 C.g. 15 E.c. 12 A.t. 13
<i>P. aeruginosa</i> Lipase LipA (AY682924)	GSHHGG	-	GGCCACAGCCACGGCGGG LC23	P.a. 18 →13 C.g. 13 E.c. 13 A.t. 14
<i>P. aeruginosa</i> Lipase LipA (AY682924)	PIVLAHG	-	CCCATCGTGCTGGCCCCACGGC LC24	P.a. 21 →19 C.g. 12 E.c. 13 A.t. 13
<i>P. aeruginosa</i> Triacylglycerol Lipase Vorstufe (PA1771)	GHSLGG	-	GGCCACTCCCTCGGTGGG LC25	P.a. 18 →14 C.g. 14 E.c. 13 A.t. 14
<i>P. aeruginosa</i> Hydrolase (PA3132)	GHSLGG	-	GGTCATTCCCTGGGTGGC LC26	P.a. 18 →13 C.g. 13 E.c. 14 A.t. 13
<i>P. aeruginosa</i> Hydrolase (PA3132)	AVLLLHG	-	GCAGTCCTGCTGCTGCATGGC LC27	P.a. 21 →13 C.g. 13 E.c. 16 A.t. 16
<i>C. glutamicum</i> Lipase (RCGL01805)	GFSQGG	1	<u>AG</u> ATTCTCCCAAGGAGGC LC28	P.a. 12 C.g. 17 →12 E.c. 11 A.t. 12
		2	<u>AT</u> ATTCTCCCAAGGAGGC LC29	P.a. 12 C.g. 16 →12 E.c. 11 A.t. 13
		3	<u>AT</u> CTTCTCCCAAGGAGGC LC30	P.a. 12 C.g. 15 →12 E.c. 11 A.t. 12
		4	<u>ATCG</u> TCTCCCAAGGAGGC LC31	P.a. 12 C.g. 14 →12 E.c. 11 A.t. 12
		5	<u>ATCGA</u> CTCCCAAGGAGGC LC32	P.a. 12 C.g. 14 →13 E.c. 11 A.t. 12

Fortsetzung Tab. 6

Organismus/Enzym (Genbank)	Motiv	Abw.	DNA Sequenz / Bezeichnung	Identität
<i>C. glutamicum</i> Lipase ORF 1378	GDSAGG	1	GGGGACAGT <u>G</u> CCCGGTGGC LC33	P.a. 14 C.g. 17 →14 E.c. 14 A.t. 12
		2	GGGGACAGT <u>A</u> CCCGGTGGC LC34	P.a. 12 C.g. 16 →12 E.c. 12 A.t. 13
		3	GGGGACACT <u>A</u> CCCGGTGGC LC35	P.a. 11 C.g. 15 →12 E.c. 12 A.t. 12
		4	GGGGACACTAG <u>C</u> CGGTGGC LC36	P.a. 12 C.g. 14 →11 E.c. 11 A.t. 12
		5	GGGGAC <u>G</u> CTAGCGGTGGC LC37	P.a. 12 C.g. 13 →12 E.c. 13 A.t. 16
<i>A. tumefaciens</i> Hydrolase (NC_003304)	GYSMGA	1	GGCTATTCCATGGGTG <u>C</u> LC38	P.a. 13 C.g. 13 E.c. 12 A.t. 17 →12
		2	GGCTATTCCATGGGTG <u>A</u> LC39	P.a. 12 C.g. 13 E.c. 12 A.t. 16 →12
		3	GGCTATTCCATGGGT <u>T</u> AC LC40	P.a. 11 C.g. 12 E.c. 12 A.t. 15 →13
		4	GGCTATTCCATGGG <u>C</u> TAC LC41	P.a. 15 C.g. 13 E.c. 12 A.t. 14 →11
		5	GGCTATTCCATGGC <u>C</u> TAC LC42	P.a. 13 C.g. 11 E.c. 13 A.t. 13 →11
<i>A. tumefaciens</i> Esterase (NP_356705)	PIVFLHG	2	<u>G</u> CGATC <u>A</u> TTTTCTGCATGGC LC43	P.a. 14 C.g. 13 E.c. 13 A.t. 19 →13
		3	CCGATC <u>A</u> TTTTCTG <u>G</u> ATGGT LC44	P.a. 13 C.g. 13 E.c. 13 A.t. 18 →17
		4	<u>G</u> CGATC <u>A</u> TTTTCTG <u>G</u> ATGGT LC45	P.a. 13 C.g. 13 E.c. 16 A.t. 17 →16
		5	<u>G</u> CGATC <u>A</u> TTTGCTG <u>G</u> ATGGT LC46	P.a. 12 C.g. 12 E.c. 13 A.t. 16 →12

Fortsetzung Tab. 6

Organismus/Enzym (Genbank)	Motiv	Abw.	DNA Sequenz / Bezeichnung	Identität
<i>A. tumefaciens</i> Esterase (NP_356705)	PIVFLHG	5	CCG <u>T</u> TCATTTG <u>C</u> CCTGGAT <u>C</u> GC	P.a. 12
			LC47	C.g. 16
				E.c. 13
				A.t. 16 →13
<i>P. aeruginosa</i> Lipase <i>lipC</i> (U75975)	GHSQGG	1	<u>A</u> GCCACAGCCAGGGCGGC	P.a. 17 →15
			LC48	C.g. 13
				A.t. 13
				E.c. 13
		2	<u>A</u> TCCACAGCCAGGGCGGC	P.a. 16 →13
			LC49	C.g. 13
				A.t. 17
				E.c. 13
		3	<u>A</u> TTACAGCCAGGGCGGC	P.a. 15 →13
			LC50	C.g. 13
<i>P. aeruginosa</i> Lipase <i>lipA</i> (AY682924)	PIVLAHG	4	<u>A</u> TTGACAGCCAGGGCGGC	P.a. 14 →13
			LC51	C.g. 14
				A.t. 13
				E.c. 12
		5	<u>A</u> TTGCCAGCCAGGGCGGC	P.a. 13 →14
			LC52	C.g. 14
				A.t. 14
				E.c. 13
		1	CCCATCGT <u>T</u> CTGGCCACGGC	P.a. 20→15
			LC53	C.g. 13
<i>E. coli</i> Lysophospholipase (6586)	AHSMGG	2	CCCATCGT <u>T</u> GTGGCCACGGC	P.a. 19 →13
			LC54	C.g. 12
				A.t. 14
				E.c. 14
		3	CCCATCGT <u>T</u> GGGGCCACGGC	P.a. 18 →14
			LC55	C.g. 13
				A.t. 13
				E.c. 11
		4	CCCATCGT <u>T</u> GGCGCCACGGC	P.a. 17 →14
			LC56	C.g. 13
<i>E. coli</i> Lysophospholipase (6586)	AHSMGG	5	CCCATCGT <u>T</u> GGCACCACGGC	P.a. 16 →14
			LC57	C.g. 16
				A.t. 14
				E.c. 14
		1	GACATTCGATGGGCGG <u>A</u>	P.a. 12
			LC58	C.g. 13
				A.t. 14
				E.c. 17 →14
		2	GCACATTCGATGGGCGT <u>A</u>	P.a. 12
			LC59	C.g. 13
<i>E. coli</i> Lysophospholipase (6586)	AHSMGG	3	GCACATTCGATGGGC <u>C</u> TA	P.a. 12
			LC60	C.g. 14
				A.t. 12
				E.c. 16 →12
				E.c. 15 →11

Fortsetzung Tab. 6

Organismus/Enzym (Genbank)	Motiv	Abw.	DNA Sequenz / Bezeichnung	Identität
<i>E. coli</i> Lysophospholipase (6586)	AHSMGG	4	GCACATTCGATGGGGCTA	P.a. 12
			LC61	C.g. 13 A.t. 13 E.c. 14 →11
		5	GCACATTCGATGGAGCTA	P.a. 12
			LC62	C.g. 13 A.t. 12 E.c. 13 →11
<i>E. coli</i> Esterase (4592)	GHSMGG	2	CGTCACTCGATGGGCGGT	P.a. 13 C.g. 13 A.t. 12 E.c. 16 →11
			LC63	
		2	GGTCACTCGATGGGCGGA	P.a. 13 C.g. 13 A.t. 12 E.c. 16 →11
			LC64	
		2	CGTA ^A ACTCCATGGGCGGT	P.a. 14 C.g. 13 A.t. 12 E.c. 16 →13
			LC65	
		2	GGTCACTCCATGGGTGGA	P.a. 14 C.g. 12 A.t. 12 E.c. 16 →16/17
			LC66	
<i>P. aeruginosa</i> Lipase <i>lipC</i> (U75975)	GHSQGG	-	GGAGAAAGTCAACCTGATCG	P.a. 50 →38
			GCCACAGCCAGGGCGGCATG	C.g. 14
			ACCGTGCGCT	A.t. 15
			LC68	E.c. 14
<i>P. aeruginosa</i> Lipase <i>lipA</i> (AY682924)	PIVLAHG	-	CCAGACCAAATACCCCATCGT	P.a. 50 →30
			GCTGGCCCCGGCATGCTCGGC	C.g. 14
			TTCGACA	A.t. 15
			LC69	E.c. 15
<i>E. coli</i> Lysophospholipase (6586)	AHSMGG	-	AAACGCTATATACTGGCACAT	P.a. 13
			TCGATGGGCGGTGCGATCTCC	C.g. 16
			ACATTATT	A.t. 15
			LC70	E.c. 50 →16
<i>E. coli</i> Esterase (4592)	GHSMGG	-	CAATAATTCTCCCATCGTTCTT	P.a. 18
			GTCCACGGTCTGTTTGGCAGC	C.g. 14
			CTCGACA	A.t. 15
			LC71	E.c. 50 →18
<i>C. glutamicum</i> Lipase (RCGL01805)	GFSQGG	-	ACCGCTTGGCCTGTGGGGATT	P. a. 16
			CTCCCAAGGAGGCGGCGCCAC	C. g. 50 →16
			TGGCTGGG	A. t. 13
			LC72	E. c. 15
<i>C. glutamicum</i> Lipase (NP_600394.1)	GDSAGG	-	TCTAGTGGCAGTCGGCGGGGA	P. a. 19
			CAGCGCCGGTGGCAATATTGC	C. g. 50 →39
			GGCGGTCA	A. t. 16
			LC73	E. c. 14
<i>A. tumefaciens</i> Hydrolase (NC_003304)	GYSMGA	-	GGAAACGCATGTGATGGGCTA	P. a. 15
			TTCCATGGGTGCGCGGATTTC	C. g. 17
			CGCCTTTC	A. t. 50 →14
			LC74	E. c. 18

Fortsetzung Tab. 6

Organismus/Enzym (Genbank)	Motiv	Abw.	DNA Sequenz / Bezeichnung	Identität
<i>A. tumefaciens</i> Esterase (NP_356705)	PIVFLHG	-	AAGCAGACCTGCCGCCGATCG TTTTCTGCATGGCGCGAGCG CAAGTCTT LC75	P. a. 16 C. g. 15 A. t. 50 →15 E. c. 16
His-Abfolge	-	-	CATCATCATCATCATCAT LC76	keine Ähnlichkeit
GT-Abfolge	-	-	GTGTGTGTGTGTGTGTGT LC77	keine Ähnlichkeit
AC-Abfolge	-	-	ACACACACACACACACAC LC78	keine Ähnlichkeit
TAG-(Stop)Abfolge	-	-	TAGTAGTAGTAGTAGTAG LC79	keine Ähnlichkeit
ATG-Abfolge	-	-	ATGATGATGATGATGATG LC80	keine Ähnlichkeit
<i>Deinococcus radiodurans</i> Lipase	GHSAGG	-	GGGCACTCGGCGGGCGGG LC81	P. a.: 14 C. g.: 13 E. c.: 12 A. t.: 13

2.4 Nährmedien

LB-Medium: 10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefeextrakt

2x LB-Medium: 20g/l Trypton; 10 g/l NaCl; 10 g/l Hefeextrakt

LB/M9-Medium: 50 % (v/v) 2x LB/Medium; 10 % (v/v) M9-Lösung 1; 1 % (v/v) M9-Lösung 2; 1 % (v/v) M9-Lösung 3; 10 % (v/v) M9-Lösung 4

M9-Lösung 1: 40 g/l Glucose

M9-Lösung 2: 25 g/l MgSO₄ x 7H₂O

M9-Lösung 3: 2 g/l CaCl₂

M9-Lösung 4: 70 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O; 30 g/l KH₂PO₄; 5 g/l NaCl; 10 g/l NH₄Cl

Die Medien wurden vor der Anwendung autoklaviert. Nicht-hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm oder 0,45 µm, SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) und dem autoklavierten Medium nach dem Erkalten zugesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechenden Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

2.5 Anzucht und Lagerung von Bakterien

E. coli und *P. aeruginosa* Stämme wurden in LB-Medium angeimpft und bei 37°C bebrütet. Überexpressionskulturen wurden in LB/M9-Medium oder 2xLB angezogen. Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden im Reagenzglas auf dem Brutroller, Flüssigkulturen größerer Volumina wurden im Erlenmeyerkolben auf einem Brutschüttler (GFL, Burgwedel) bei 150 UpM bebrütet. Das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyerkolben entsprach stets 1:10. Übernachtskulturen wurden mindestens 16 h kultiviert. Hauptkulturen wurden jeweils aus einer Übernachtskultur mit 1/100 Volumen angeimpft. Stämme mit Plasmid-kodierten Resistenzmarken wurden stets unter Selektionsdruck durch Zugabe der in Tabelle 7 angegebenen Antibiotikakonzentrationen kultiviert. Zur dauerhaften Lagerung der Stämme wurden Übernachtskulturen mit 7,5 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C tiefgefroren.

Tab. 7: Übersicht der eingesetzten Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicillin	100 µg/ml	-
Carbenicillin	-	300 µg/ml
Tetracyclin	50 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml	-
Chloramphenicol	50 µg/ml	300 µg/ml

2.6 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde nach der von BIRNBOIM & DOLY (17) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder unter Verwendung von Plasmid-Isolationskits der Firma QIAGEN (Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA und der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Dabei wurde die von SAMBROCK *et al.* (171) beschriebene Methode angewendet. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 x TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM EDTA; pH 8,3) benutzt. Als Größenstandard für die DNA-Gele wurde die „1kb-ladder“ von INVITROGEN (Karlsruhe) verwendet. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese-Ergebnisse wurde das Videodokumentationssystem „Gel Jet Imager Plus“ der Firma INTAS (Göttingen) benutzt.

2.8 *In vitro* Rekombination von DNA

Die Restriktion und die Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach SAMBROCK *et al.* (171) sowie nach den Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme durchgeführt. Die Reaktionen wurden in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.9 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter Zellen von *E. coli* und *P. aeruginosa* sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden entweder nach der RbCl-Methode von HANAHAN (80) oder nach der Methode von FIEDLER & WIRTH (64) mittels Elektroporation durchgeführt.

2.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurden entweder als Auftragsarbeit von der Firma SEQUISERVE (Vaterstetten) oder am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen durchgeführt.

2.11 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von BRADFORD (21) spektralphotometrisch („UV-1602“, SHIMADZU, Duisburg) bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von

SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem (123), welches sich aus einem 5 %igen Sammelgel und aus einem 15 %igen Trenngel zusammensetzte. Dazu wurde die „Mini Protean II Dual Slap Cell“-Gelapparatur der Firma BIORAD (München) bei einer Spannung von 150 V verwendet. Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinproben in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und 10 min bei 98°C denaturiert. Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Elektrophorese durch eine TCA-Fällung präzipitiert und in A. dest. aufgenommen (149). Die aufgetrennten Proteine wurden mit „SimplyBlue SafeStain“ der Firma INVITROGEN (Karlsruhe) gefärbt.

2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach SAIKI *et al.* (170) durchgeführt. Standardmäßig wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 μ l angesetzt. Diese setzten sich wie folgt zusammen: 1 ng Plasmid-DNA als Matritzen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Taq*- oder *Pfu*-DNA-Polymerase. Die Reaktionen wurden in den $MgCl_2$ oder $MgSO_4$ enthaltenden Puffern der Hersteller durchgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Automaten („Mastercycler gradient“) der Firma EPPENDORF (Hamburg) durchgeführt. Dem ersten PCR-Cyklus ging eine 3 min Denaturierung bei 98°C voran und dem letzten PCR-Zyklus schloß sich ein einmaliger 7 min Verlängerungsschritt bei 72°C an. Die Hybridisierungstemperatur wurde zuerst 5°C niedriger als der errechnete Mittelwert der Schmelztemperaturen der eingesetzten Oligonukleotide gewählt und bei Bedarf erhöht oder erniedrigt. Die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen betrug 35-40. Zur Reinigung von PCR-Produkten wurde das „NucleoSpin Extract“-Kit der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren) nach Herstellervorschrift gebraucht.

2.14 Chromatographische Reinigung von Poly-Histidin-Fusionsproteinen aus Zellrohextrakt

Zur Aufreinigung der lipolytischen Enzyme in Form von Poly-Histidin-Fusionsproteinen wurde die immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) angewendet (151). Zur Elution der gebundenen Poly-Histidin-Fusionsproteine wurde Imidazol eingesetzt, welches die Histidinreste der Fusionsproteine von der Ni-NTA-Matrix verdrängt. Da bei der heterologen Expression in *E. coli* keine Sekretion ins Kulturmedium stattfindet, muß zur Reinigung der rekombinanten lipolytischen Enzyme ein Zellaufschluß durchgeführt werden. Dazu wurde das Bakterienpellet (entsprechend einer $OD_{580} = 10$) in 15 ml Lyse-Puffer resuspendiert. Es wurden 200 μ l Lysozym-Lösung und zur Senkung der Viskosität 20 μ l DNaseI zugegeben. Der Zellaufschluß durch Ultraschall erfolgte für 20 min diskontinuierlich (50 % cycle) bei 40 W (70 % power) in einem 50 ml Falcon-Tube auf Eis mit dem „BANDELIN Sonopuls HD60“ in Verbindung mit der „Kegelspitze KE66“. Anschließend wurde die Probe zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert (Sorvall, SS-34, 30 min, 18000 Upm, 4°C) und der dabei erhaltene Überstand filtriert (5 μ m Porengröße). Der so hergestellte Zellrohextrakt wurde nur kurz auf Eis gelagert und anschließend sofort zur Aufreinigung eingesetzt. Die Flußrate der Säule betrug hierbei 5 ml/min und der eingesetzte Gradient wurde von 20 mM auf 125 mM Imidazol kontinuierlich erhöht. Die Fraktionen wurden jeweils für eine Minute gesammelt und auf Esteraseaktivität untersucht, sowie durch SDS-PAGE analysiert.

2.15 Screening von Metagenombibliotheken

2.15.1 Detektion von Dehydrogenaseaktivität (nach (62))

Die Metagenombibliotheken wurden auf LB-Agarplatten überstempelt und über Nacht bei

37°C bebrütet. Anschließend wurden die Kolonien mit ca. 4 mm Agar (1,6 % Agar; 100 mM KPi pH 7,5; 0,2 % Triton X-100, 10 mM EDTA) überschichtet. Die Agarlösung mußte vor dem Überschichten auf eine Temperatur von unter 65°C abgekühlt sein. Nach dem Erstarren des Agars wurde fünfmal mit Aufschlußlösung (100 mM KPi, pH 7,5, 0,2 % Triton X-100, 10 mM EDTA) und fünfmal mit Waschlösung (100 mM KPi, pH 7,5) gewaschen (5 mm Flüssigkeitshöhe in den Platten). Zur Färbung wurden die Platten 2 mm hoch mit Färbelösung 1 (1,25 M Dehydrogenasesubstrat, 0,2 g/l Phenazinethiosulfat, 2 g/l Nitrotetrazoliumblau-Chlorid, 100 mM KPi pH 7,5) überschichtet und 10 min im Dunkeln vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde die Färbelösung 2 (50 mM NAD oder NADP) in einem Verhältnis von 1 ml Färbelösung 2 pro 100 ml Färbelösung 1 zugegeben und im Dunkeln ca. 15 min geschüttelt, bis die Höfe deutlich zu erkennen waren. Anschließend wird die Lösung abgeschüttelt, die Platten zweimal kurz mit Wasser gewaschen und zum Trocknen offen aufgestellt. Diffuse Höfe-bildende Kolonien konnten direkt von den Screeningplatten gepickt werden. Eine Aktivitätsbestimmung in Mikrotiterplatten wurde ebenfalls wie schon beschrieben durchgeführt (62).

2.15.2 Selektion von Klonen mit Amidaseaktivität

Die Metagenombibliotheken wurden in LB Medium in 96er Mikrotiterplatten überimpft und über Nacht bei 37°C und 600 Upm bebrütet. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und in 100 µl steriler Saline (0,9 % (w/v)) resuspendiert und gewaschen. Mikrotiterplatten wurden mit 200 µl Amidase-Selektionsmedium befüllt und mit 25 µl der gewaschenen Zellen beimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C und 600 Upm bebrütet. Positive Klone konnten anhand des Wachstums und einer Farbänderung von Rot nach Gelb identifiziert werden.

Amidase-Selektionsmedium:

Lsg. 1:

20 mM Benzamid, Methyl-Malonamid oder Propionamid (Endkonzentration)

NaCl 2,5 g

K₂HPO₄ 1,39 g

KH₂PO₄ 0,73 g

ad 450 ml A. dest. (evtl. aufkochen, dann autoklavieren)

Lsg. 2:

MgSO₄ 0,5 g

Phenolrot 0,012 g

ad 400 ml A. dest. (autoklavieren)

autoklavierte Lsg. 1 und 2 zusammengeben

+ 50 ml sterilfiltrierte Glukoselösung (40 g/l), entspricht 2 g/l Endkonzentration

2.15.3 Detektion von Amylaseaktivität

Die Metagenombibliotheken wurden auf einen Agar zur Detektion von Amylase produzierenden Klonen überimpft und bei 37°C bebrütet. Zur Herstellung dieses Agars wurde 10 g Stärke in 250 ml A. dest. gelöst, die anderen Komponenten (15g Agar, 5g Gelatine, 3g Beefextrakt) wurden in 500 ml A. dest. aufgenommen. Dann wurden beide Lösungen zum Kochen gebracht, vermischt und auf 1000 ml aufgefüllt (pH 6,8 ± 0.2). Nach drei Tagen Inkubation wurden die bebrüteten Platten mit Lugol'scher Lösung (MERK, Darmstadt) überschichtet, um nicht abgebaute Stärke anzufärben. Amylaseproduzenten bildeten klare Höfe um die Kolonien.

2.15.4 Detektion von Proteaseaktivität

Hierzu wurden die Metagenombibliotheken auf einen Agar zur Detektion von Protease-produzierenden Klonen überimpft und bei 37°C bebrütet. Zur Herstellung dieses Agars wurden 30 g Skim Milk in 500 ml A. dest. gelöst und 30 min bei 105°C autoklaviert. Die weiteren Komponenten (10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefe-Extrakt, 15 g Agar) wurden in 500 ml A. dest. gelöst und autoklaviert. Beide Lösungen wurden vereinigt und die Platten gegossen. Klare Höfe um die Kolonien zeigten Proteaseaktivität an.

2.15.5 Identifizierung von lipolytischen Klonen

Zur Detektion von Lipase produzierenden Klonen wurden die Metagenombibliotheken auf einen Rhodamin-Triolein Agar überstempelt (119). Aktive Klone gegen das Substrat Olivenöl zeigten nach drei bis vier Tagen eine leuchtend orange Fluoreszenz. Zur Identifizierung von Esterase-produzierenden Klonen wurden die Metagenombibliotheken auf einen Tributyrin-Agar überstempelt (118). Esteraseproduzenten zeigten nach frühestens drei Tagen klare Höfe.

2.16 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.16.1 Spektroskopische Methoden zur Bestimmung von Esterase-/Lipase-Aktivität

Die Lipaseaktivität wurde nach Winkler & Stuckmann bestimmt (216). In basischer Lösung absorbiert abgespaltenes *p*-Nitrophenol Licht der Wellenlänge $\lambda = 410 \text{ nm}$. Die O.D._{410nm} ist somit ein Maß für die Aktivität der Lipase. Substratemulsion: 207 mg Natriumdesoxycholat, 100 mg Gummi arabicum, 90 ml Sörensen Phosphatpuffer pH 8,0 (Lösung A: 8,9 g/l Na₂HPO₄, Lösung B: 0,68 g/l KH₂HPO₄ [A:B 17:1]); 30 mg *p*NP-Palmitat in 10 ml Isopropanol (kurz über dem Bunsenbrenner erhitzen). Pro Reaktion wurden 2,5 ml Substratemulsion mit 20-100 µl Probe vermischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die O.D._{410nm} der einzelnen Ansätze im Spektralphotometer (UV 1602, SHIMADZU, Duisburg) gemessen.

Zur Bestimmung der Esteraseaktivität wurden pro Reaktion 1,5 ml (V) Testlösung [25 µl *p*NPCaproat in 5 ml Ethanol gelöst; plus 100 ml Puffer (100 mM KPi pH 7,2; 10mM Mg₂SO₄)] mit 5-50 µl (v) Probe vermischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde auch hier die O.D._{410nm} der Ansätze im Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) bestimmt. Angegeben werden die Werte als relative Aktivität, wobei die O.D. bei 410 nm auf 1 ml Probenvolumen und auf die Zelldichte (O.D._{580nm}) bezogen ist ($[\text{O.D.}_{410\text{nm}}/\text{O.D.}_{580\text{nm}}]/\text{ml}$) oder als unit. Ein U (unit) Enzymaktivität ist definiert als Bildung von 1 µmol *p*NP/min, wobei der molare Extinktionskoeffizient ($\Sigma=12500 \text{ M}^{-1}$) mit einer Eichgeraden bestimmt wurde:

$$U = \text{O.D.}_{410\text{nm}}/\text{min} \cdot V/v \cdot \Sigma^{-1}$$

2.16.2 Titrimetrische Methode zur Bestimmung von Esterase-/Lipase-Aktivität

Die Enzymaktivitäten gegen Triglyceride und Vinylester wurden titrimetrisch durch einen so genannten „pH Stat“ (718 STAT Titrimo, METROHM, LTD., Herisau, Schweiz) bestimmt. Hierzu wurden 20 ml Puffer (2,5 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; pH 6,9) unter Rühren konstant auf 37°C gebracht. 5 ml des ebenfalls auf 37°C vorgewärmten Puffers wurde mit dem jeweiligen Lipasesubstrat versetzt (geschüttelt oder bei Bedarf emulgiert) und zum Gesamtansatz vereinigt. Der pH dieser Substratsuspension wurde auf einen konstanten Wert titriert. Die Autohydrolyse des Substrats und die Entstehung der entsprechenden Fettsäuren wurde durch die automatische Gegentitration von 0,01 M NaOH bei konstantem pH Wert über 2 min dokumentiert und diente als Kontrolle. Anschließend wurde gereinigtes Enzym in einer Konzentration von etwa 5 µg hinzugefügt und der Verbrauch von 0,01 M NaOH wurde über einen Zeitraum von 4 min dokumentiert. Über den Verbrauch an NaOH ließ sich der Substratumsatz in U/mg eingesetztes Enzym errechnen.

2.16.3 Gaschromatographische Analyse zur Bestimmung der Enantioselektivität lipolytischer Enzyme

Bei den GC-Analysen wurden sowohl die Substrate, als auch die korrespondierenden Alkohole nachgewiesen und quantifiziert. Vor den eigentlichen Messungen wurden die Retentionszeiten der Substrate (Tab. 8) und der jeweiligen Alkohole (Tab. 9) bestimmt, sowie eine für die Quantifizierung notwendige Kalibrierung des Systems vorgenommen. Dazu wurden 0,1 M Stammlösungen der Substrate und der korrespondierenden Alkohole in DMSO angesetzt. Aus diesen Stammlösungen wurden in DMSO verschiedene Verdünnungen (5 mM, 10 mM, 20 mM und 50 mM) hergestellt. Die GC-Proben setzten sich dann folgendermaßen zusammen: 895 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5; 5 µl 2 mM Glycin/NaOH pH 11; 100 µl Alkohol in DMSO. Die Ansätze enthielten somit 10 % (v/v) DMSO und die Endkonzentrationen der Alkohole lagen bei 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM und 10 mM. Zur Extraktion der Alkohole wurden aus diesen Ansätzen jeweils 250 µl entnommen und in ein neues Gefäß (ER) überführt. Dazu wurden 250 µl Essigsäureethylester gegeben und 1 min sorgfältig durchmischt (Vortex). Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt (5 min, 14000 Upm, EZ, RT). 100 µl der oberen, organischen Phase wurden abgenommen, in ein GC-Gefäß überführt und gaschromatographisch aufgetrennt (GC-17A, SHIMADZU, Duisburg). Zur Erstellung der Kalibrierungsgeraden wurden die erhaltenen Peakflächen graphisch gegen die Konzentrationen der Alkohole in den Probenansätzen aufgetragen.

Tab. 8: Übersicht der Substrate für die Bestimmung der Enantioselektivität

Ester	Bezugsquelle
Essigsäureester v. (+/-)-1-Octin-3-ol	*
Essigsäureester v. <i>cis</i> -1,2-Cyclohexandiol	*
Essigsäureester v. <i>trans</i> -1,2-Cyclohexandiol	*
Essigsäureester v. Trimethylsilylbutinol	*
Isopropylidenglycerinacetat (<i>Rac</i>)	**
Menthylacetat (+)	**
Menthylacetat (-)	**
Essigsäureester von Tetrahydronaphthylamin	*
Essigsäureester v. Phenylethylamin	*
Terpinylnacetat	FLUKA, Sternheim
Essigsäure-2,2,2-Trichlor-1-phenylethylester	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Linalylacetat	FLUKA, Sternheim

* Synthetisiert durch AG Prof. M. Müller, Institut f. Pharmaz. und Med. Chemie, Universität Freiburg

** AK Prof. M.T. Reetz, Max-Planck-Institut f. Kohlenforschung, Mülheim a.d. Ruhr

Tab. 9: Übersicht der Alkohole für die Bestimmung der Enantioselektivität

Alkohol	Bezugsquelle
(+/-)-1-Octin-3-ol	FLUKA, Sternheim
<i>cis</i> -1,2-Cyclohexandiol	FLUKA, Sternheim
<i>trans</i> -1,2-Cyclohexandiol	FLUKA, Sternheim
Trimethylsilylbutinol	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Phenylethylamin	FLUKA, Sternheim
Isopropylidenglycerin	FLUKA, Sternheim
Menthol	FLUKA, Sternheim

Zur Messung der Umsetzung der Substrate durch die lipolytischen Enzyme wurden jeweils 0,1 M Stammlösungen der Substrate in DMSO angesetzt. Die GC-Proben setzten sich dann folgendermaßen zusammen: 895 µl 1M Tris/HCl pH8; 5 µl Lipase (ca. 2 µg Enzym in 2 mM Glycin/NaOH pH11), 100 µl 0,1 M Substratstammlösung in DMSO. Die Endkonzentration der Substrate betrug somit 10 mmol/l. Zur Bestimmung der Retentionszeiten der Substrate sowie zur Überprüfung der Substrate auf Autohydrolyse wurden gleichzeitig Proben ohne Lipase angesetzt, indem die Lipaselösung durch 2 mM Glycin/NaOH pH11 ersetzt wurde. Die Probenansätze wurden sorgfältig durchmischt und für 24 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Extraktion gestoppt. Das Ende der Reaktion ist dabei auf das Verbleiben der Enzyme in der wässrigen Phase zurückzuführen, während die Alkohole und Substrate in die organische Phase übergehen. Dazu wurden 250 µl der Ansätze in ein neues Gefäß (ER) überführt, 250 µl Essigsäureethylester zugegeben und 1 min sorgfältig durchmischt (Vortex). Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt (5 min, 14000 Upm, EZ, RT). 100 µl der oberen, organischen Phase wurden abgenommen, in ein GC-Gefäß überführt und gaschromatographisch analysiert. Die freigesetzten Alkohole konnten anschließend mit Hilfe der Kalibrierungsgeraden aus den erhaltenen Peakflächen quantifiziert werden. Die Berechnung der *ee*-Werte erfolgte nach folgender Formel:

$$ee [\%] = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right) * 100\%$$

n₁: Stoffmenge 1.Enantiomer
n₂: Stoffmenge 2.Enantiomer

Die *ee*- Werte wurden in dieser Arbeit durch Auswertung von GC-Chromatogrammen ermittelt, deswegen wurden in die Berechnung keine Stoffmengen n, sondern die Peakflächen A wie folgt eingesetzt:

$$ee [\%] = \left(\frac{A_1 - A_2}{A_1 + A_2} \right) * 100\%$$

A₁: Peakfläche 1.Enantiomer
A₂: Peakfläche 2.Enantiomer

2.16.4 HPLC-Analyse zur Bestimmung der Amidaseaktivität

Die Amidase AmiE aus *P. aeruginosa* wurde in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Die Zellen wurden 3 h nach der Induktion mit IPTG (0,4 mM) geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellaufschlüsse wurden auf eine $OD_{580} = 10$ aufkonzentriert und durch eine SDS-PAGE Analyse wurde die Menge an löslicher Amidase abgeschätzt. Der Aktivitätstest wurde für 30 min bei 30°C in Na-Phosphatpuffer (100 mM, pH 2,5) und einer Substratkonzentration (Propionamid) von 20 mM sowie 10 - 20 µl des Zellaufschlusses in einem Gesamtvolumen von 200 µl durchgeführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 800 µl Acetonitril gestoppt und durch RP-HPLC-Analyse (SIL-A10, SHIMADZU, Duisburg, mit Säule Chromosphere C18, VARIAN) bei RT quantifiziert. Hierzu wurde der Ansatz zunächst zentrifugiert und sterilfiltriert. 10 µl wurden dann zur Analyse eingesetzt (Laufmittel: 10 % Methanol, 90 % 25 mM H_3PO_4 , pH 2,5; Flußrate: 0,3 ml/min). Der Umsatz konnte anhand der Integrale und dem Vergleich mit einer zuvor mit Propionsäure erstellten Eichgerade berechnet werden. Ein unit (U) entsprach hierbei der Menge an Enzym, die 1 µmol/min an Propionsäure freisetzte.

2.17 Bestimmung der pH-Stabilität von Esterasen

Die gereinigten Enzyme EstCL, EstCE und EstA3 wurden in Puffern (50 mM Endkonzentration) bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 2-3: Glycin/HCl; pH 4-6: Na_2HPO_4 ; pH 7-9: Tris/HCl; pH 10-12: Glycin/NaOH) in einer Konzentration von ca. 2 µg/ml verdünnt und für 48h bei Raumtemperatur inkubiert. Die lipolytische Restaktivität wurde spektrophotometrisch mit *p*-Nitrophenylcaproat als Substrat bestimmt (2.16.1).

2.18 Bestimmung des pH-Optimums von Esterasen

Das pH-Optimum der drei Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 wurde titrimetrisch bestimmt. Als Substrat wurde Tributyrin (2 mM Endkonzentration) verwendet, welches erst bei pH-Werten > 11 oder < 4 zu einer extremen Autohydrolyse neigt, so dass eine Messung unmöglich wurde. Zur Messung der Aktivitäten in einem pH-Bereich von 4-11 wurden unterschiedliche Puffersysteme in einer Konzentration von jeweils 2,5 mM eingesetzt: pH 4-7 Na_2HPO_4 ; pH 7-11 Tris/HCl; pH 9-11 Glycin. Die Messung wurde analog zur Bestimmung des Substratspektrums (2.16.2) durchgeführt.

2.19 DNA-Isolation aus Umweltproben (modifiziert nach (222))

5 g Probe wurden in 13,5 ml DNA-Extraktionspuffer (DEP (pH 8,0): 100 mM Tris; 100 mM Na_2 -EDTA; 100 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 M NaCl; 1 % CTAB) aufgenommen und nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (10mg/ml) unter Schütteln 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml 10 % SDS (w/v) zugegeben und der Ansatz 2 h bei 65°C leicht geschüttelt. Dann folgte eine 10 minütige Zentrifugation (4000 g, RT) zur Gewinnung des Überstands. Zweimal wurde das Pellet erneut extrahiert (je + 4,5 ml DEP und 1 ml 10 % SDS, 10 min bei 65°C). Die Überstände wurden vereinigt und anschließend mit dem gleichen Volumen Phenol/Isoamylalkohol (24:1) vermischt und 3 min bei 4000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein frisches RG überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt. Wiederum folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 4000 g und die obere Phase wurde in ein frisches SS34 Röhrchen überführt. Zur weiteren Reinigung der DNA wurde eine Isopropanolfällung vorgenommen (171). Das Pellet wurde anschließend in 500 µl A. dest. aufgenommen. Anschließend wurden bei Bedarf verschiedene kommerziell verfügbare chromatographische DNA-Reinigungskits der Firma BIOMOL (Plymouth Meeting, USA) oder INVITROGEN (Karlsruhe) benutzt, um evt. störende Kontaminationen zu eliminieren.

2.20 Klonierung metagenomischer DNA

Um ideale Enzymkonzentrationen für den partiellen DNA-Verdau der Metagenompräparationen zu ermitteln, wurden Verdünnungsreihen mit der Restriktionsendonuklease *Sau3a* getestet. Hierzu wurden etwa 0,5 µg der isolierten Metagenom-DNA für 60 min mit 1U; 0,1 U; 0,01 U und 0,001 U Restriktionsenzym bei 37°C inkubiert. Nach der Restriktion wurden die Proben durch die Auftrennung in einem 0,5 %igem Agarosegel analysiert. Im Anschluß wurde für jede einzelne Metagenom-DNA-Probe eine partielle Restriktion im präparativen Maßstab durchgeführt. Hierzu werden jeweils 5 µg DNA mit der zuvor bestimmten, optimalen Verdünnung von *Sau3a* erneut 60 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 min. Anschließend wurden die Metagenom-DNA-Fragmente in den vorbereiteten Vektor (mit *Bam*HI linearisiertes Plasmid/Cosmid) ligiert. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 11°C inkubiert und am darauffolgenden Tag in einen geeigneten *E. coli* Stamm transformiert bzw. mittels des Gigapack Gold Kits (STRATAGENE, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers transduziert. Rekombinante Klone wurden stichprobenartig durch Restriktionsanalyse überprüft und entweder von den Platten als Pools abgeschwemmt oder in Mikrotiterplatten überführt, jeweils über Nacht bebrütet und mit 20 % Glycerol zur Lagerung bei -80°C versetzt.

2.21 Transposition mit MuExpress

Der Vektor pMuExpress(Cm^r/Km^r) wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*II verdaut, so dass MuExpress als etwa 1200 bp (Km^r) oder 1400 bp (Cm^r) großes Fragment ausfällt. MuExpress wurde anschließend mittels Gelelution isoliert und konnte zur Transposition eingesetzt werden. Dazu wurde folgender Ansatz hergestellt (20 µl Endvolumen): 30 ng MuExpress; 600-1200 ng Cosmid-DNA (Pool); 1 U Transposase; 1x Transposasepuffer. Der Transpositionsansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch eine Inkubation für 10 min bei 75°C gestoppt. Der Ansatz wurde dann entweder in geeignete *E. coli* Stämme mittels Elektroporation transformiert oder in Phagen verpackt und anschließend transduziert. Hierbei wurde das Gigapack Gold Kit (STRATAGENE, Heidelberg) benutzt und es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Klone mit inseriertem MuExpress wurden durch die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (Km^r/Cm^r) selektiert.

2.22 DNA-Array Experimente

Die Hybridisierungsexperimente wurden im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen in Kooperation mit der AG Ehrenreich durchgeführt. Hierzu wurden die benötigten Geräte in einem klimatisierten Reinraum zur Verfügung gestellt (Abb. 6).

2.22.1 Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Glasträgern

Das Spotten der Oligonukleotide erfolgte mit dem Lucidea Spotter der Firma AMERSHAM BIOSCIENCES nach dem Prinzip des ‚contact printings‘. Ein Druckkopf mit 24 Nadeln nimmt aus Mikrotiterplatten pro Nadel ca. 200 nl auf, um dann mit hoher Präzision 100 pl Flüssigkeit pro Spot auf die Chipoberfläche zu setzen. Auf diese Weise ist es möglich, 20.000 einzelne Spots auf ein Microarray mit den Maßen eines Objektträgers (2,5 cm x 7,5 cm) zu setzen, wobei jeder Spot einen Durchmesser von 150 µm aufweist und der minimale Abstand der Spots 30 µm beträgt. In dieser Arbeit wurden die mit einem „Amino-Anker“ am 5′ Ende modifizierten Oligonukleotide kovalent an einen aktivierten Glasträger gebunden (Code-Link Slide, AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg). Hierzu wurden die Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 20 nmol/ml in 1x Auftragspuffer (150 mM Na-Phosphat, pH 8,5) auf den Glasträger gestempelt. Da die kovalente Bindung eine feuchte Atmosphäre erfordert, wurden die beladenen Glasträger für 24 h in einer geschlossenen Kammer über einer gesättigten Kochsalzlösung inkubiert. In dieser Kammer herrscht eine Luftfeuchtigkeit von

etwa 75 %. Zur längeren Haltbarkeit wurden die beladenen Glaträger in einem Exsikkator unter Vakuum aufbewahrt.

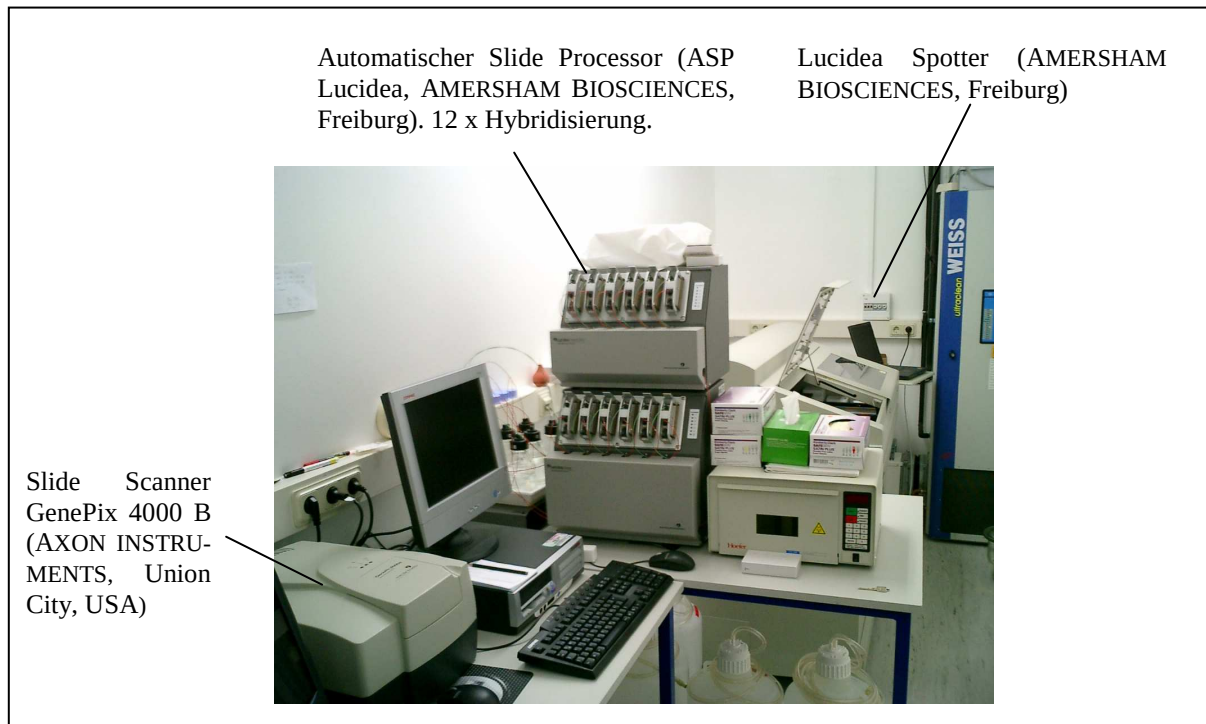


Abb. 6: Klimatisierter Reinraum mit Geräten zur Nutzung der „Array-Technologie“ des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen.

2.22.2 Nachweis der Immobilisierung von Oligonukleotiden durch Vistra-Green Färbung

Zum Nachweis der Immobilisierung der Oligonukleotide auf der Glasoberfläche wurde Vistra Green (AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg) 1:10.000 in TE Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) verdünnt. Der Träger wurde 10 min in 20 ml der gepufferten Vistra Green Lösung inkubiert, danach 2 x in A.dest. gewaschen, getrocknet und mit dem Slide-Scanner (AXON INSTRUMENTS, Union City, USA) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 532$ nm analysiert.

2.22.3 Markierung genomischer DNA

Die genomische DNA wurde entweder durch Ultraschall (Sonopuls HD60, BANDELIN) oder durch partiellen Verdau mit dem Enzym *Sau3A* auf eine Größe von etwa 2-3 kb fragmentiert. Die DNA wurde anschließend aus einem Agarosegel eluiert und gereinigt. Etwa 2 μ g der DNA Fragmente wurden in einem Volumen von 21 μ l A. dest. aufgenommen. Dann wurden 20 μ l Zufallsprimer/Reaktionspuffer Mix zugegeben (750 μ g/ml Zufallsprimer (Hexamer), 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 12,5 mM MgCl₂; 25 mM β -Mercaptoethanol) und der Ansatz für 5 min im Wasserbad gekocht und anschließend auf Eis gestellt. Dem Ansatz wurde zunächst 5 μ l dNTP Mix (1,2 mM je dATP; dGTP und dTTP; sowie 0,6 mM dCTP in 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) und dann erst 3 μ l Cy5-dCTP oder Cy3-dCTP (1 mM, AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg) zugefügt. Anschließend wurde 1 μ l (5 U) Klenow Fragment zugefügt und der Ansatz für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 5 μ l EDTA (0,5 mM, pH 8) gestoppt. Anschließend wurde die DNA durch eine Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt (171). Die Qualität der markierten DNA wurde bei einer verdünnten Probe spektrophotometrisch durch die Analyse des Absorptionsspektrums im Wellenlängenbereich von $\lambda = 280-700$ nm

bestimmt. Der Absorptionspeak bei 550 nm (Cy3) oder bei 650 nm (Cy5) mußte hierbei größer sein, als der unmittelbar davorliegende Peak, da sonst ein „Quenching“ der Probe vorlag, d.h. die Bildung von intermolekularen Interaktionen und Aggregaten. Die Menge an inkorporierten Cy3/5 Molekülen wurde mit den Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 150.000$ (Cy3) bzw. 250.000 (Cy5) auf folgende Art berechnet:

$$\text{pmol Cy3} = (A_{550} / 150.000) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times (z \text{ } \mu\text{l}) \times (w \text{ cm}) \times 10^{12}$$

$$\text{pmol Cy5} = (A_{650} / 250.000) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times (z \text{ } \mu\text{l}) \times (w \text{ cm}) \times 10^{12}$$

mit A_{550} bzw. A_{650} = Absorption bei den Wellenlängen 550 und 650 nm; ($z \text{ } \mu\text{l}$) = Volumen der Probe nach der Reinigung; ($w \text{ cm}$) = optischer Pfad der Küvette in cm.

2.22.4 Hybridisierung der immobilisierten Oligonukleotide mit genomischer DNA und Auswertung der Daten

Die Hybridisierung der immobilisierten Oligonukleotide mit der markierten genomischen DNA erfolgte vollautomatisch mit dem Automatischen Slide Processor (ASP Lucidea, AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg). Vorbereitend wurde die genomische DNA denaturiert und die benötigten Hybridisierungskammern des ASP gespült. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch 2 minütiges Inkubieren bei 95°C, anschließender Abkühlung auf Eis und der Zugabe von 50 μl Hybridisierungspuffer. Der Ansatz wurde gemischt, bei 13000 Upm kurz abzentrifugiert und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Anschließend wurden 200 μl des Hybridisierungsansatzes mit einer Hamiltonspritze in die Hybridisierungskammer des ASP, in welche bereits ein beladener Microarray eingespannt wurde, injiziert. Die Hybridisierung erfolgte mit dem folgenden Standardprogramm, welches allerdings in vielen Parametern zu Testzwecken variiert wurde:

01	Flush	Leeren der Schläuche und Kammern
02	Heat,	Kammern auf 38°C aufheizen
03	Flush	Kammern mit Isopropanol spülen und leeren
04	Flush	Kammern mit Wasser spülen und leeren
05	Air Pump	Kammern für 60 s mit Luft spülen
06	Heat Off	Heizung ausschalten
07	Prime	Schläuche mit Wash1 füllen
08	Wait	INSERT TEST SLIDES - test slides einlegen
09	Heat	Kammern auf 42°C aufheizen
10	Wait	Inject probe solution - Proben Lösung injizieren
11	Mix	mischen der Lösungen in den Kammern für 3-12 h
12	Flush	mit Wash1 spülen
13	Heat	Kammern auf 45°C aufheizen
14	Mix	Mischen mit Wash1 für 10 min
15	Prime	Schläuche mit Wash2 füllen
16	Flush	Mit Wash 2 spülen
17	Mix	Mischen mit Wash2 für 10 min
18	Flush	mit Lösung Wash2 spülen
19	Mix	Mischen mit Wash2 für 4 min
20	Prime	Schläuche mit wash3 füllen
21	Flush	mit Lösung Wash3 spülen
22	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen
23	Flush	mit Isopropanol spülen
24	Flush	Kammern mit Luft spülen
25	AirPump	Kammern mit Luft trocknen
26	Heat	Heizung ausschalten
27	Wait	REMOVE TEST SLIDES

Fortsetzung des Standardprogramms:

Test slides entfernen und mit dummy slides ersetzen

28	Heat	Heizen auf 48°C
29	Flush	mit Lösung Wash2 spülen
30	Mix	Mischen mit Wash2 für 5 min
31	Prime	Schläuche mit Wasser füllen
32	Flush	mit 6 ml Wasser spülen
33	Mix	Mischen mit Wasser für 5 min
34	Flush	mit 6 ml Wasser spülen
35	Flush	mit Luft spülen
36	Prime	Schläuche mit Isopropanol füllen
37	Flush	mit Isopropanol spülen
38	Flush	mit Luft spülen
39	Air Pump	Kammern mit Luft trocknen
[Ende]		

Erläuterung der Programmbefehle:

Flush:	Spülen der Hybridisierungskammern und Schläuche
Prime :	Füllen der Schläuche bis zur Hybridisierungskammer
Mix:	Mischen der Lösung innerhalb der Kammer durch Vor- und Zurückpumpen
Heat:	Heizen der Kammer auf eine bestimmte Temperatur
Air Pump:	Trocknen der Kammer durch Luft
Wait:	Warten bis zu einer Bestätigung vom Benutzer

Lösungen:

Lösung 1:	Wasser (bidest) (Minimales Volumen 200ml)
Lösung 2:	Wash 3 (0,1 x SSC)
Lösung 3:	Wash 1 (1 x SSC; 0,2 % SDS)
Lösung 4:	Wash 2 (0,1 x SSC; 0,2 % SDS)
Lösung 5:	Isopropanol

Zur Verarbeitung der Hybridisierungsdaten wurden diese mit dem Scanner GenePix 4000B (AXON INSTRUMENTS, Union City, USA) und dem Programm GenePix visualisiert. Für die Quantifizierung der Fluoreszenzwerte und zur Identifizierung jedes einzelnen Spots in GenePix wurde zunächst eine Schablone auf den Chip gelegt, womit jedem Spot das entsprechende Oligonukleotid zugewiesen und der auszuwertende Bereich festgelegt wurde. Mit Hilfe eines eigens dafür entwickelten Computerprogramms (Ehrenreich, unveröffentlicht) wurde die Schablone, basierend auf einer Excel-Belegungsliste, in Form eines „gal files“ generiert. Die Ausrichtung dieser Schablone wurde für jeden einzelnen Spot manuell überprüft.

2.23 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA-, und Aminosäuresequenzen sowie Protein-Strukturuntersuchungen erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme „Clone Manager für Windows 7.0“, „Plasmid MapEnhancer 3.0“ (SCIENTIFIC AND EDUCATIONAL SOFTWARE, Durham, USA), „CS ChemDraw Pro 7.0“ (CAMBRIDGESOFT, Cambridge, USA) und „Cn3D4.1 des NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Homologie- und Sequenzvergleiche wurden mittels der Internet-Datenbank des „NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION“ mit den BLAST-Algorithmen (3) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe eines Scanners („HP Precisionscan Pro 3.1“, HEWLETT PACKARD, Böblingen), einer digitalen Kamera sowie einer Videodokumentationsanlage digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Bei diesen Ergebnissen handelt es sich um die Abbildungen der Agarosegelelektropho-

rese, der SDS-PAGE-Analysen, sowie der Indikatorplatten für die qualitativen Enzymnachweise. Während der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Änderungen der Abbildungen vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von Biokatalysatoren durch Aktivitäts-Screening

Um die Vielfalt der mikrobiellen Diversität vollständig zu untersuchen und zu nutzen, muss eine Anzucht der Organismen vermieden werden, da nur etwa 1 % unter Standardlaborbedingungen kultiviert werden können (4). Zur Lösung dieses Problems wird seit einigen Jahren der sogenannte Metagenom-Ansatz durchgeführt, um mikrobielle Lebensgemeinschaften zu analysieren und biotechnologisch zu nutzen. Die direkte Isolierung der Gesamt-DNA einer Umweltprobe, also des Metagenoms, ist der erste Schritt dieser Methodik. Anschließend kann dann die mikrobielle Zusammensetzung durch 16S rRNA Analyse bestimmt oder Screening-verfahren zur Isolierung von z.B. Biokatalysatoren durchgeführt werden.

3.1.1 DNA-Isolierung und Konstruktion von Metagenombibliotheken

Bei der Isolierung von DNA aus Umweltproben unterscheidet man zwei Vorgehensweisen; *ex situ* und *in situ*. Bei der *ex situ* Methode werden die Zellen zunächst von der Matrix entfernt und anschließend die genomische DNA aus diesen vorgereinigten Zellen gewonnen, bei der *in situ* Methode kann die DNA ohne vorherige Trennung der Zellen direkt isoliert werden (121, 165). Nach der *in situ* Methode, die den Vorteil einer schnelleren Durchführung hat, wurde DNA aus Bodenproben des botanischen Gartens der Universität Bochum von verschiedenen Standorten isoliert (Abb. 7a).

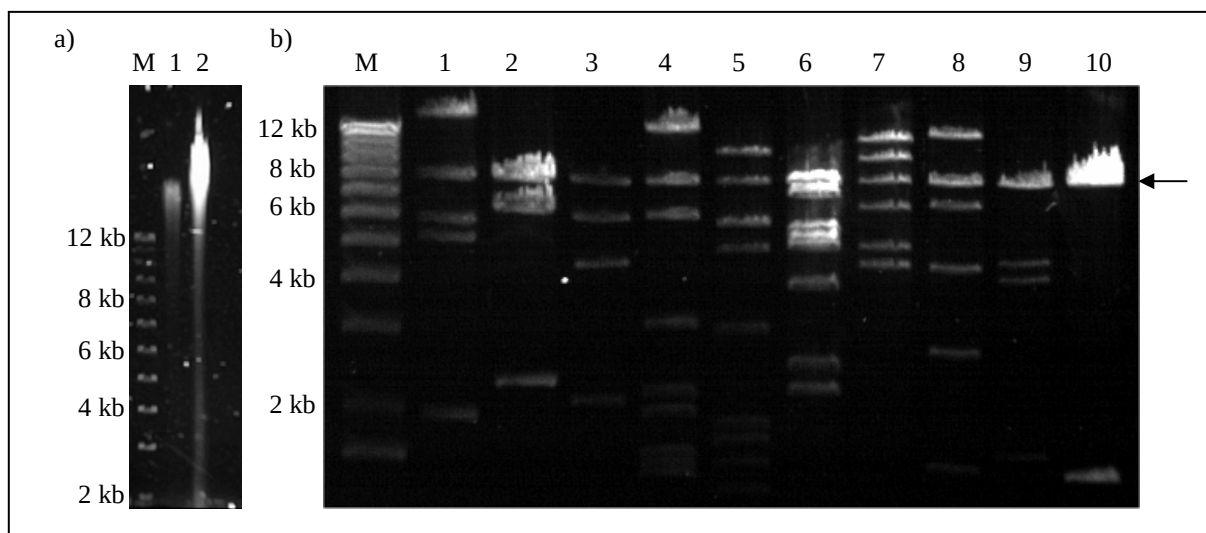


Abb. 7: Isolation von metagenomischer DNA aus einer Bodenprobe des botanischen Gartens der Universität Bochum und Restriktionsanalyse der resultierenden Cosmid-Bank. (a) Die DNA wurde nach der *in situ* Methode isoliert und gereinigt. Je 5 µl wurden in einem Agarosegel (0,5 %) aufgetrennt. (b) Zur Restriktionsanalyse der Metagenombibliothek wurde von 10 zufällig ausgewählten Klonen die Cosmid-DNA isoliert und ein Aliquot mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* hydrolisiert. Bei dieser Restriktion entsteht neben den unterschiedlichen DNA-Fragmenten der inserierten Metagenom-DNA ein für den Vektor pWE15 typisches DNA Fragment von 8 kb Größe (s. Pfeil).

Um aus der isolierten DNA eine Metagenombank herzustellen, wurde diese anschließend partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* verdaut, welches aufgrund der vier Basenpaar-Erkennungssequenz sehr häufig schneidet. Die DNA-Fragmente mit einer Größe von über 20 kb wurden aus einem Agarosegel isoliert und in Cosmide kloniert. Diese wurden anschließend in Phagen verpackt, mit welchen ein geeigneter *E. coli* Stamm infiziert werden konnte. Die rekombinanten und unter Selektionsdruck gewachsenen *E. coli* Klone bildeten die jeweils entstehende Metagenombibliothek, welche entweder als Einzelklone in Mikrotiterplatten oder als von den Agarplatten abgeschwemmte Pools bei -80°C gelagert wurden. Einige Klone wurden zufällig ausgewählt, die Cosmid-DNA isoliert und eine Restriktionsanalyse durchgeführt, woraus auf die Qualität, also die Anzahl der Cosmide mit unterschiedlichen Inserts und die durchschnittliche Fragmentgröße der Metagenombank geschlossen werden kann (Abb. 7b). Für die abgebildete Metagenombank ergibt sich eine durchschnittliche Insertgröße von etwa 21 kb, wobei weder ein Leervektor noch identische Klone detektierbar waren. So hergestellte Metagenombibliotheken konnten nun für verschiedene Arten von Screenings benutzt werden.

Tab. 10: Überblick der in dieser Arbeit hergestellten, bzw. zur Verfügung gestellten Metagenombibliotheken für ein Screening nach neuen Biokatalysatoren. (* ausschließlich von AG Streit durchmustert)

Herkunft	Vektor	Anzahl Klone	Ø Insert	Quelle/ Referenz
Trinkwasserbiofilm (TWB) I	Cos pLAFR3	2100	15 kb	(175, 176)
TWB II	BAC-Vektor	1800	30 kb	(175, 176)
TWB III	Cos pWE15	1700	30 kb	(175, 176)
Expressionsbank aus TWB III	+ Transposon	3400	30 kb	diese Arbeit, (s. 3.3.3)
Bochum-Boden	Cos pWE15	600 (Pool)	21 kb	diese Arbeit
Agarolytisches Konsortium	Cos pWE15	1500	30 kb	(208)
Öl-kontaminierter Boden*	Cos pWE15	2500	30 kb	(56)
Diesel-Wasser Biofilm*	Cos pWE15	600	25 kb	Streit, unveröffentlicht
Harz-Boden	Cos pWE15	~ 4000 (Pool)	25 kb	(57)
Pferdeexkremente	Cos pWE15	~ 800 (Pool)	25 kb	(57)
USA-Vulkanboden	Cos pMCL210	~ 300 (Pool)	10 kb	(57)
Göttingen-Boden	Cos pWE15	~ 2500 (Pool)	25 kb	(57)
Indonesien-Boden	pBluescript	600 (Pool)	6 kb	Santosa, unveröffentlicht
Kamschatka-Boden	Cos pWE15	2100	10 kb	Daniel, unveröffentlicht
Expressionsbank aus Kamschatka-Boden	+ Transposon	~ 15000 (Pool)	10 kb	diese Arbeit (s.3.3.3)
Gesamt		~ 38.000	Ø 20 kb	

Weitere Metagenombibliotheken wurden in Kooperation mit der AG Streit aus Biofilmen konstruiert, bzw. zur Verfügung gestellt. Insgesamt standen 15 verschiedene Banken mit insgesamt etwa 38.000 Klonen zur Verfügung, was bei einer durchschnittlichen Insertgröße von etwa 20 kb einem Volumen von 760 Mb an metagenomischer DNA entspricht (Tab. 10).

3.1.2 Das Screening: Identifizierung von Biokatalysatoren

Um eine möglichst große Anzahl an Klonen testen zu können, muss ein Screeningsystem dazu geeignet sein, im Hochdurchsatz Screening (High Throughput Screening, HTS) Verfahren angewendet zu werden. Dazu geeignet sind beispielsweise einfache Agarplatten-Assays oder Selektionsmethoden, wogegen Aktivitätsmessungen, die einen größeren Zeit-, bzw. Arbeitsaufwand erfordern (z.B. HPLC Messungen) eher ungeeignet sind. Neben der Nutzung bereits bewährter Screeningtechnologien war es daher nötig, auch innovative neue Screeningmethoden zu etablieren oder zu entwickeln, um interessante Biokatalysatoren zu identifizieren.

Lipolytische Enzyme

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (s. 1.4) handelt es sich bei den lipolytischen Enzymen um biotechnologisch sehr interessante Enzyme, für die bereits zwei einfache Plattenassays zur Verfügung standen. Zum einen kann der kurzkettige Glycerolester Tributyrin als Substrat eingesetzt werden. Es bildet mit dem Agar eine Emulsion und verursacht eine Trübung. Bei Esteraseaktivität wird der Glycerolester in den Alkohol und die korrespondierenden Fettsäuren gespalten und es entsteht ein klarer Hof um aktive Kolonien, wie in Abbildung 8 dargestellt ist (118).

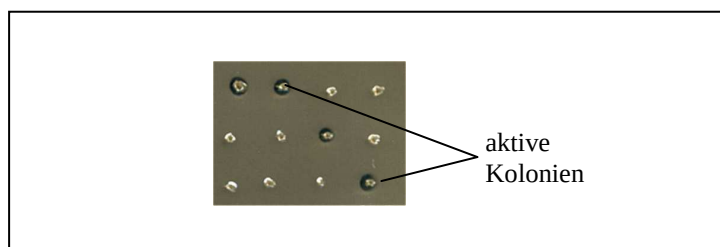


Abb. 8: Detektion von lipolytischen Enzymen mit dem Substrat Tributyrin. Bei lipolytisch aktiven Kolonien von rekombinanten *E. coli* Stämmen mit plasmidkodierter Lipase ist nach 3-4 Tagen eine Hofbildung um die Kolonien zu erkennen.

Bei dem anderen verwendeten Substrat Olivenöl handelt es sich um eine Mischung von Ölen mit vorwiegend längerkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Durch die Zugabe von Rhodamin in den Agar kann eine Spaltung dieser Ester im UV-Licht sichtbar gemacht werden (119). Beim Screening im heterologen Wirt *E. coli* dauert es etwa drei Tage bis es zur

Hofbildung um die Kolonien kommt, da kein funktionaler Sekretionsweg ins umgebende Medium existiert und erst Zellen lysieren müssen, um eine Aktivität sichtbar zu machen.

Amidasen

Zur Detektion von Amidasen musste zunächst ein Selektionssystem entwickelt werden, um große Metagenombibliotheken zu untersuchen. Bei der enzymatischen Umsetzung von Amiden entsteht im Fall eines primären Amids die entsprechende Säure und Ammoniak (Abb. 9). Diese Reaktionsprodukte sollten zur Selektion und Detektion genutzt werden.

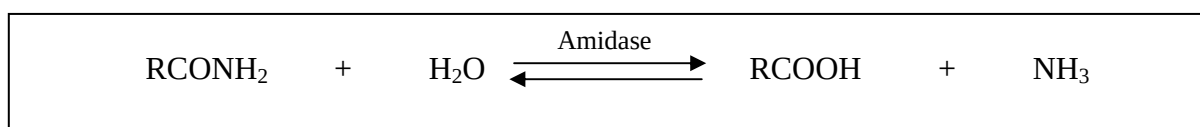


Abb. 9: Reaktionsschema der durch eine Amidase katalysierten Hydrolyse eines primären Amids zur entsprechenden Säure und Ammoniak.

Ammoniak kann der heterologe Screeningwirt *E. coli* als Stickstoffquelle und die produzierte Säure möglicherweise als Kohlenstoffquelle nutzen. Außerdem führt die Entstehung der Säure zu einer Verschiebung des pH-Werts, welche durch den Zusatz eines pH-Indikators detektiert werden kann. Um dieses Selektionssystem zu entwickeln, wurde die bereits eingehend regulatorisch und biochemisch charakterisierte aliphatische Amidase (AmiE, Genbank Accession No.: M27612) aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (61, 109) kloniert und überexprimiert, um die bereits bekannten optimalen Substrate als Testsubstanzen für den Assay einzusetzen. Nach der Klonierung und Überexpression von AmiE wurde die Menge an löslicher Amidase im Ganzzellextrakt von *E. coli* durch SDS-PAGE Analyse bestimmt und ein Aktivitätstest mit Propionamid als Substrat durchgeführt und mittels HPLC-Analyse quantifiziert. Die Aktivität der exprimierten Amidase lag danach bei etwa 400 U/mg Enzym, was der Aktivität von käuflich erhältlichem Enzym entspricht (SIGMA ALDRICH). Das Screeningsystem sollte sowohl im flüssigen Medium für einen Mikrotiterplattenassay (Abb. 10), als auch für einen Agarplattenassay entwickelt werden. Als pH-Indikator wurde Phenolrot eingesetzt, welches im alkalischen Bereich rot und beim Übergang in den sauren Bereich gelb wird. Wie in der Abbildung 10 zu erkennen ist, funktioniert der Assay in Amidase-Minimalmedium mit Propionamid (20 mM) als alleiniger Stickstoffquelle nur, wenn Glukose (2 g/l) als zusätzliche Kohlenstoffquelle angeboten wird (obere Reihe, erste und zweite Spalte). Nur die Kulturen mit überexprimierter Amidase zeigen ein Wachstum (als Trübung zu erkennen) sowie auch den erwarteten Farbumschlag.

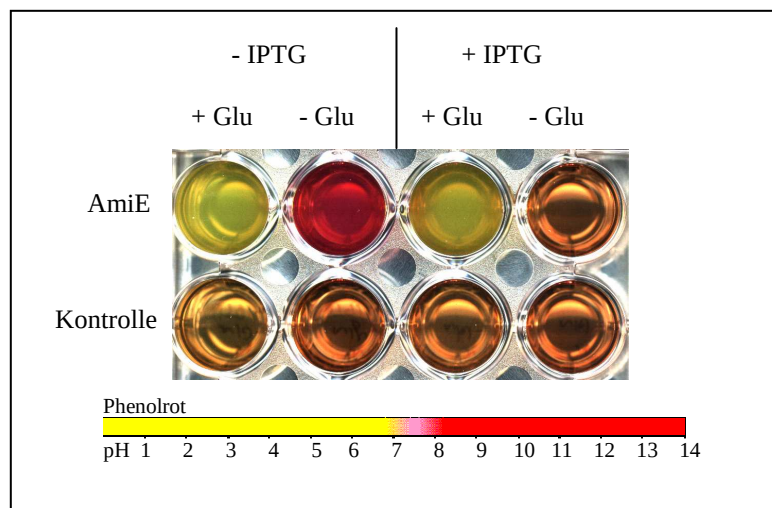


Abb. 10: Amidaseassay mit überexprimierter Amidase AmiE aus *P. aeruginosa*. *E. coli* Überexpressionskulturen (AmiE) und Kontrollkulturen mit Leervektor wurden über Nacht im Vollmedium angezogen, gewaschen und anschließend in Amidase-Minimalmedium überimpft. Aktive Kulturen zeigten eine Trübung und eine Ansäuerung des Mediums (von rot nach gelb). Gezeigt sind die Kulturen nach 24 h mit und ohne Zugabe von Glukose (+/- Glu) und mit und ohne Zugabe von IPTG zur Induktion.

Dagegen bleiben sämtliche Kontrollen pH stabil und zeigen kein Wachstum. Auffällig war außerdem, dass die Expression und die Aktivität von AmiE auch ohne Induktion mit IPTG ausreicht, um ein Wachstum der Kulturen zu ermöglichen. Allerdings fiel auf, dass das Wachstum des rekombinanten *E. coli* Stammes trotz ausreichender Expression und Aktivität sehr langsam war. Im Genom von *P. aeruginosa* ist das Amidasegen *amiE* in einem Operon mit zwei regulatorischen Genen *amiRC* und zwei Genen *amiBS*, die putative Transportproteine kodieren, organisiert. Das schwache Wachstum von *E. coli* könnte also durch den fehlenden Transport des Substrats in die Zelle oder die Entsorgung der entstehenden, möglicherweise toxischen Säure aus der Zelle hinaus, verursacht sein. Deshalb wurde das komplette AmiCBRS Operon kloniert, um es zusätzlich zur Amidase und evtl. beim später angestrebten Screening zusätzlich zu exprimieren.

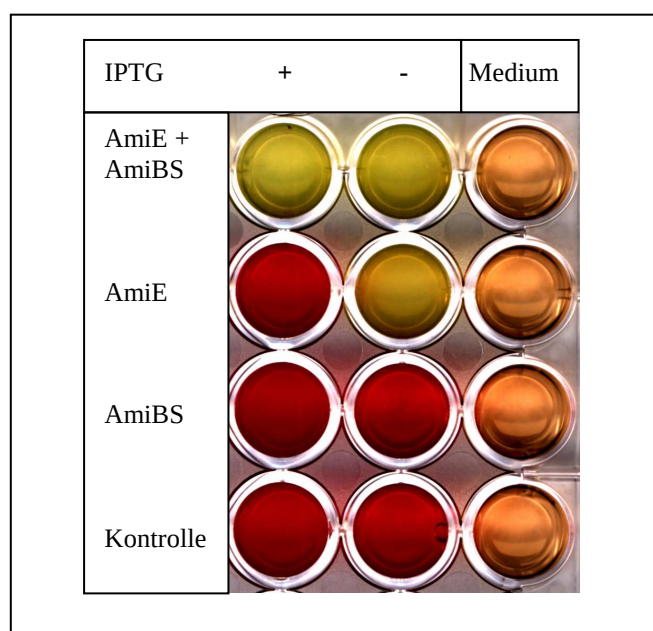


Abb. 11: Expression der Amidase AmiE aus *P. aeruginosa* im heterologen Wirt *E. coli* bei gleichzeitiger Coexpression der putativen Transportproteine AmiBS. Die Kulturen wurden über Nacht im Vollmedium angezogen, gewaschen und anschließend in Amidase-Minimalmedium überimpft. Gezeigt sind mit IPTG induzierte sowie nicht induzierte Kulturen und zur Kontrolle unbeimpftes Medium (rechte Spalte) nach 12 h Wachstum. In der oberen Reihe ist die Expression der Amidase (AmiE) bei gleichzeitiger Coexpression der putativen Transportproteine AmiBS abgebildet. Darunter ist jeweils nur die Expression der Amidase, der putativen Transportproteine bzw. die Leervektor-kontrolle (Kontrolle) gezeigt.

Das Operon wurde in einen durch Arabinose induzierbaren Expressionsvektor (schwache Expression) sowie einen ebenfalls durch IPTG induzierbaren Expressionsvektor (starke Expression) kloniert. Eine Coexpression mit der Amidase AmiE brachte bei beiden Überexpressionen allerdings nicht den gewünschten Wuchsvorteil. Es konnte aber bei der Coexpression der putativen Membranproteine AmiBS bei der Induktion mit IPTG eine stärkere Ansäuerung des Mediums beobachtet werden (Abb.11).

Dehydrogenasen

Eine weitere biotechnologisch interessante Klasse von Enzymen stellen die Oxidoreduktasen dar. Diese Gruppe stellt den zweitgrößten Anteil an biotechnologisch genutzten Enzymen nach den Hydrolasen (60, 130). Die Oxidoreduktasen werden nach der Art des Elektronendonors in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Wichtigsten sind die Klassen EC 1.1.1 (Donor: Alkohol), EC 1.2.1 (Donor: Aldehyd- oder Carbonyl-Gruppe) und EC 1.4.1 (Donor: Amin). Allen Klassen gemeinsam ist die Notwendigkeit eines Cofaktors; bei 80 % aller bekannten Redoxreaktionen handelt es sich hierbei um NADH/NAD⁺, bei weiteren 10 % um NADPH/NADP⁺ (122). Beim Cofaktor kann es sich aber auch um zweiwertige Ionen (Fe²⁺, Mg²⁺ oder Zn²⁺) oder um weitere komplexe organische, bzw. metallorganische Moleküle handeln. Um ein Hochdurchsatzscreening dieser Enzymklassen zu gewährleisten, sollte ein bereits entwickelter Plattenassay und ein Mikrotiterplattentest für die Metagenomanwendung etabliert werden (62). Beim Plattenassay wurden die Metagenombibliotheken zunächst auf Vollmedium-Agarplatten überstempelt und nach einer Bebrütung bei 37°C durch einen Topagar fixiert. Gleichzeitig wurden die Zellen durch diese Verfahrensweise teilweise aufgeschlossen, was wegen der intrazellulären Lokalisation der Dehydrogenasen und somit zur Detektion beim Screening obligat war. Nach Zugabe und Inkubation mit einer weiteren Aufschlusslösung, einer Aktivitätsfärbelösung und NAD als Cofaktor bildeten aktive Kolonien einen diffusen, dunklen Hof, während bei nicht aktiven Kolonien nur die Zellen selbst angefärbt wurden (z.B. Formiatdehydrogenaseassay, Abb. 12). Allerdings konnten bei dem Screening mit dem gezeigten Plattenassay zur Detektion von Formiatdehydrogenasen (FDH) nur die wenigsten aktiven Kolonien auch tatsächlich mittels spektrophotometrischer Verfahren, bzw. gaschromatographischer Analyse als positiv bestätigt werden. Im Fall der FDH lag die Anzahl der tatsächlich positiven rekombinanten Zellen bei etwa 10 %, bei den Leucindehydrogenasen (LeuDh) und den Alkoholdehydrogenasen (ADH) noch niedriger. Deswegen wurde die Metagenombibliothek auch mit einem Mikrotiterplattentest nach aktiven Klonen durchsucht. Bei diesem Test wurden die Kolonien

über Nacht bei 37°C in Mikrotiterplatten angezogen und anschließend pelletiert. Nach dem Aufschluss der Zellen durch einen geeigneten Puffer wurde die Aktivität gegen verschiedene Substrate spektrophotometrisch bei 30°C in einem Mikrotiterplattenphotometer verfolgt. Mit dieser Screeningmethode konnte jeweils eine Formiat-, Alkohol- und Leucindehydrogenase, sowie 38 Glukosedehydrogenasen identifiziert werden.

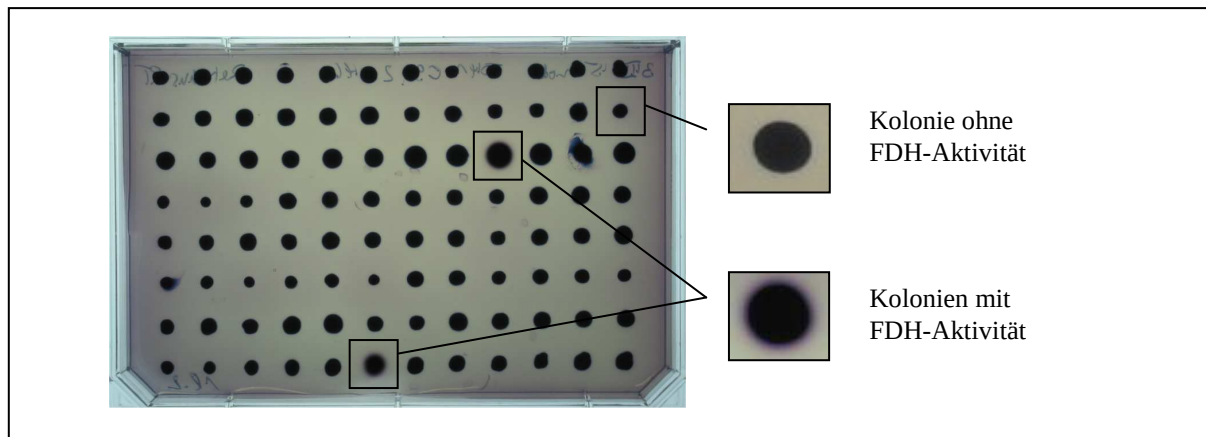


Abb. 12: Aktivitätsassay zur Detektion von Formiatdehydrogenasen in Metagenombibliotheken. Die Metagenombibliotheken wurden auf eine Vollmedium Agarplatte überstempelt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden die Zellen mit einem Top-Agar fixiert, aufgeschlossen, gewaschen und einem lichtempfindlichen Färbenachweis zur Detektion des NADH-Verbrauchs unterzogen (62). Positive Klone, die Formiatdehydrogenaseaktivität zeigten, wiesen einen diffusen, dunklen Hof um die Kolonien auf, während bei negativen Klonen nur die Kolonie selbst gefärbt wurde.

Identifizierte Biokatalysatoren

Nachdem die verschiedenen Screeningsysteme etabliert waren, konnte die Suche nach neuen Biokatalysatoren in den verschiedenen Metagenombibliotheken beginnen. Dabei wurden nicht immer alle zur Verfügung stehenden Banken untersucht, da einige wie schon unter 3.1.1 beschrieben, als Pools vorlagen. Der Arbeitsaufwand für ein Screening von Klonen in Mikrotiterplatten wurde dadurch zu hoch, da diese erst ausplattiert und in Mikrotiterplatten übertragen werden mussten. In den verschiedenen Metagenombibliotheken wurden insgesamt 56 Biokatalysatoren durch die beschriebenen, unmodifizierten Screeningsysteme identifiziert (Tab. 11). Im Falle des Amidasescreenings mit den beiden Substraten Benzamid und Malonsäureamid gelang es trotz des Screenings aller verfügbaren Metagenombanken allerdings nicht, einen positiven Klon zu entdecken, während andererseits ein Screening von nur 2100 Klonen ausreichte, um 38 Klone mit Glukosedehydrogenaseaktivität zu identifizieren. Des Weiteren konnten beim Screening des Trinkwasserbiofilms III jeweils ein Klon mit Formiatdehydrogenase-, Alkoholdehydrogenase- und Leucindehydrogenaseaktivität erkannt werden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. W. Streit (Universität

Duisburg-Essen) wurden insgesamt 15 lipolytische Enzyme aus unterschiedlichen Metagenombibliotheken detektiert.

Tab. 11: Übersicht der identifizierten Biokatalysatoren aus verschiedenen Enzymklassen

Enzymklasse	Substrat	Screeningsystem	Untersuchte Klone	Anzahl aktive Klone
Esterase/Lipase	Tributyrin/Olivenöl	Plattenassay	~ 20.000	15*
Amidase	Benzamid	Selektion MT	~ 20.000	-
Amidase	Malonsäureamid	Selektion MT	~ 20.000	-
FDH	Formiat	MT/Plattenassay	1700	1
ADH	Phenylethanol	MT/Plattenassay	1700	1
LeuDH	Leucin	MT/Plattenassay	1700	1
GlukDH	Glukose	MT	2100	38

* in Zusammenarbeit mit der AG Streit identifizierte Biokatalysatoren

Es konnten Metagenombibliotheken sowohl konstruiert, wie auch schon bestehende Banken genutzt werden, so dass insgesamt ca. 38.000 Klone mit etwa 760 Mb an metagenomischer DNA zum Screening zur Verfügung standen. Nach der Etablierung verschiedener Aktivitätsassays konnten diverse Lipasen und Dehydrogenasen identifiziert werden.

3.2 Identifizierung von Biokatalysatoren durch Sequenz-abhängiges Screening

Erst in jüngerer Zeit wird versucht, den Metagenom-Ansatz auch durch Sequenz-abhängige Verfahren, wie „gene mining“ oder Amplifikation von interessanten Biokatalysatoren mittels Signatursequenzen, zu nutzen ((16, 129), siehe auch 1.3). Als Signatursequenzen werden dabei Teilsequenzen bezeichnet, die in allen Enzymen oder zumindest in Enzymgruppen einer Klasse konserviert sind.

3.2.1 Erklärung der prinzipiellen Vorgehensweise

Erstmalig sollten nun metagenomische Enzyme durch Hybridisierung mit Hilfe eines DNA-Array Systems identifiziert werden (Abb. 13). Um diese Idee umzusetzen, muss zunächst metagenomische DNA isoliert und z.B. durch Ultraschall fragmentiert werden.

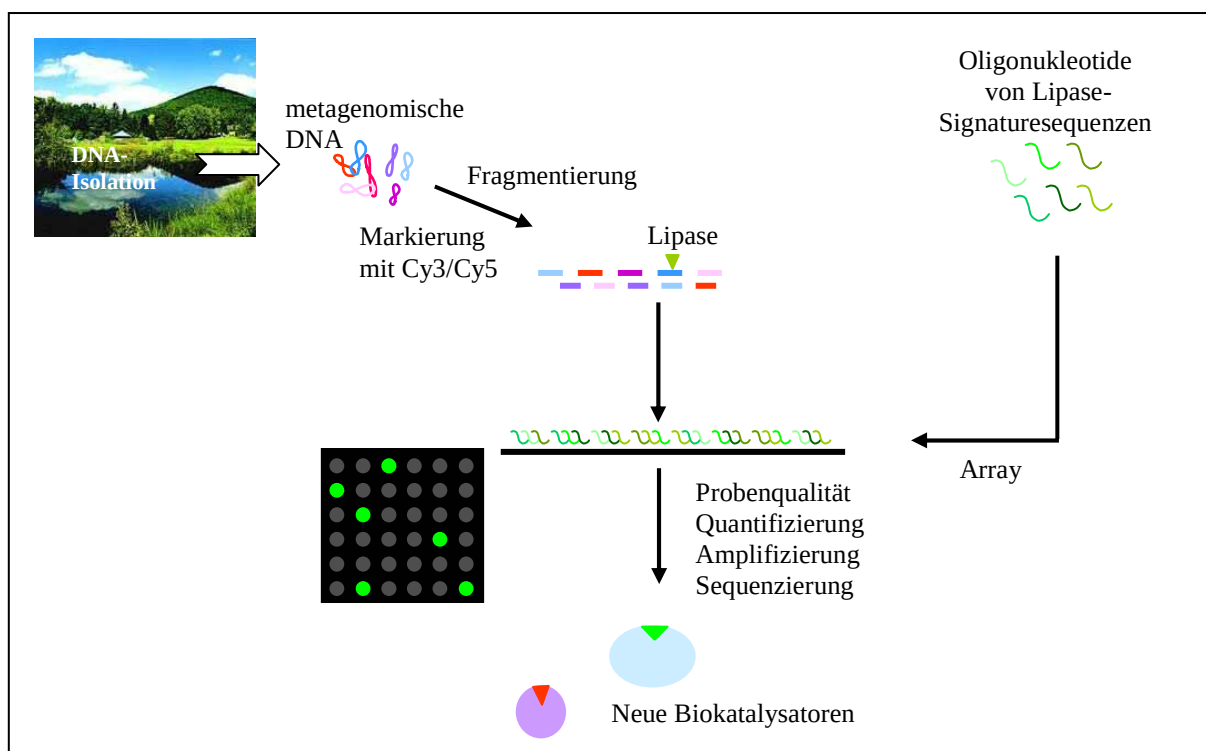


Abb. 13: Schematische Vorgehensweise bei der Identifikation von Biokatalysatoren durch Hybridisierung. Nähere Erläuterungen im Text.

Die DNA-Fragmente werden anschließend mit fluoreszierenden Molekülen markiert, gereinigt und denaturiert. Daraufhin kann die Hybridisierung mit Signatursequenzen verschiedener Biokatalysatorgene durchgeführt werden, welche auf einem DNA-Chip immobilisiert sind. Theoretisch könnten bis zu 20.000 verschiedene Signatursequenzen auf

einem einzigen Träger immobilisiert sein. Fluoreszierende Spots nach der Hybridisierung sollen dann auf die Anwesenheit des entsprechenden Biokatalysators hinweisen. Anhand des resultierenden Musters des Arrays kann geschlossen werden, welche Arten von Biokatalysatoren in der Probe vorhanden sind (Probenqualität) und möglicherweise zeigt die Intensität der jeweiligen Spots an, in welcher Quantität sie zu finden sind. Letztlich sollte es auch möglich sein, mit Hilfe der identifizierten Spots das entsprechende Oligonukleotid und das komplementäre Gegenstück in einer Sequenzierung einzusetzen und so die komplette Sequenz des Biokatalysatorgens zu entschlüsseln. Beim Einsatz von bereits bestehenden Metagenombanken mit eher kurzen Insertgrößen sollten sich die identifizierten Biokatalysatoren mit dem auf dem Spot immobilisierten Oligonukleotid sowie einer auf dem entsprechenden Vektor kodierten Primersequenz amplifizieren lassen.

3.2.2 Die Auswahl der Signatursequenzen

Zunächst wurde ein einfaches Modellsystem entwickelt, um Biokatalysatorgene in der genomischen DNA von verschiedenen Mikroorganismen zu detektieren. Hierzu wurden die vier bereits sequenzierten Bakterien *E. coli* K-12 (18), *P. aeruginosa* PAO1 (188), *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (103), und *Agrobacterium tumefaciens* C58 (75) ausgewählt. Als Biokatalysator wurden die Lipasen ausgewählt: zum einen, weil es sich um eine biotechnologisch sehr interessante Enzymklasse handelt, zum anderen, weil die meisten Lipasen über konservierte Bereiche in der Sequenz verfügen (16, 97). Bei den Lipasen handelt es sich um Serinhydrolasen, deren aktives Zentrum von einer katalytischen Triade, bestehend aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat oder Glutamat, gebildet wird. Die höchste Konservierung ist dabei um das nukleophile Serin zu finden, die abgeleitete Konsensussequenz entspricht der Aminosäuresequenz [GA]-X-S-X-G. Die Konservierung der Region um die anderen beiden katalytisch aktiven Aminosäuren ist gering (97). Eine weitere konservierte Region bildet das so genannte „oxyanion hole“, welches für die Stabilisierung eines Übergangszustandes während der Katalyse essentiell ist (107, 124, 181). Durch Genomanalyse wurden 27 Lipase-Signatursequenzen der vier ausgewählten Organismen mit einer Länge von 18-21 Basenpaaren identifiziert, die entweder die Region um das nukleophile Serin oder das „oxyanion hole“ kodierten. Zu jeweils zwei Signatursequenzen der vier Mikroorganismen wurden weitere Oligonukleotide konstruiert, so dass Abweichungen von der zu 100 % passenden Sequenz mit abnehmender Genauigkeit von einer bis zu fünf Fehlpaarungen auftraten. Bei diesen abweichenden Oligonukleotiden wurden die Positionen der Fehlpaarungen variiert, d.h. am 5' Ende, 3' Ende oder in der Mitte. Beispielsweise wurde

die Sequenz vom aktiven Zentrum einer Lipase von *C. glutamicum* wie in Tabelle 12 dargestellt verändert, die Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.3 aufgeführt (Tab. 6). Außerdem wurden sechs Kontrollsequenzen erstellt, die nach einem Homologievergleich keine signifikante Übereinstimmung mit in den verwendeten Genomen vorkommenden Sequenzen aufwiesen. Zudem wurden noch acht 50mere synthetisiert, die ebenfalls einen Teil von Lipasesequenzen der vier verschiedenen Organismen enthielten.

Tab. 12: Repräsentatives Beispiel des Oligonukleotiddesigns am Beispiel der Signatursequenz einer putativen Lipase aus *C. glutamicum*. Ausgehend von der Signatursequenz des aktiven Zentrums wurden weitere fünf Oligonukleotide so konstruiert, dass die Identität jeweils um eine Base abnahm. Die zufällig veränderten Basen sind hierbei unterstrichen. Jedes Oligonukleotid wurde auf die Identität zu Sequenzen in den Genomen aller vier verwendeten Bakterienstämmen überprüft (Spalten 3-6 rechts). Die Identität zur nächstbesten Sequenz im eigenen Genom ist mit einem Pfeil markiert [→]. *C.g.*: *Corynebacterium glutamicum*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *A.t.*: *Agrobacterium tumefaciens*; *P.a.*: *Pseudomonas aeruginosa*.

Signatursequenz <i>C. glutamicum</i> ORF 1378		Abwei- chung	Identitäten nach Genomic-Blast: blastn (3, 38)			
Motiv: GDSAG	Bezeichnung		<i>C. g.</i>	<i>E.c.</i>	<i>A.t.</i>	<i>P.a.</i>
GGGGACAGCGCCGGTGGC	(LC 7)	0	18 [→13]	14	12	14
GGGGACAGT <u>G</u> CCCGGTGGC	(LC 28)	1	17 [→14]	14	12	14
GGGGACAGT <u>A</u> CCCGGTGGC	(LC 29)	2	16 [→12]	12	13	12
GGGGACA <u>C</u> TACCGGTGGC	(LC 30)	3	15 [→12]	12	12	11
GGGGACA <u>C</u> TAGCGGTGGC	(LC 31)	4	14 [→12]	11	12	12
GGGGAC <u>G</u> CTAGCGGTGGC	(LC 32)	5	13 [→12]	13	16	12

Alle benutzten Oligonukleotide wurden auf die Identitäten zu anderen vorkommenden Sequenzen im eigenen Genom, sowie im Genom der anderen drei Organismen untersucht. Diese Ähnlichkeiten sind ebenfalls in der Oligonukleotidtablelle aufgeführt. Es sollte bei der Auswertung der Hybridisierungsmuster mit genomischer DNA aus den vier Bakterien untersucht werden, in welchem Umfang diese Homologien Aufschluss über den Schwellenwert geben, bei der eine Hybridisierung gerade noch stattfindet und um evtl. vorkommende falsch positive Hybridisierungen zu erklären.

3.2.3 Immobilisierung der Signatursequenzen

Zunächst mußte ein Protokoll für die Bindung der verhältnismäßig kurzen Oligonukleotide an die Glasoberfläche des Microarray-Chips etabliert werden. Dazu wurden verschiedene Varianten von Auftragspuffern mit unterschiedlichen Glaträgern getestet. Die Problematik besteht bei so kurzen Oligonukleotiden darin, dass Sie durch die Hybridisier- und besonders die Waschschrirte von der Glasoberfläche abgelöst werden. Daher wurde zunächst durch eine Vistra-Green Färbung nach einem Test-Hybridisierungslauf geprüft, ob die immobilisierte DNA tatsächlich noch am Glaträger haftet. Vistra Green bindet vermutlich nicht kovalent an DNA, ist auch nur dann fluoreszierend und zwar zehnmal sensitiver als eine Markierung mit Ethidiumbromid (5). Obwohl schon eine Kopplung von Nonameren im Rahmen eines Microarray-Fingerprintings beschrieben wurde (112), konnte mit unmodifizierten Oligonukleotiden bei den von uns getesteten Systemen keine reproduzierbare Immobilisierung erzielt werden (Tab. 13).

Tab. 13: Immobilisierungseigenschaften modifizierter und unmodifizierter Oligonukleotide (18-21 Basen) zweier Array-Slides mit verschiedenen Auftragspuffern. (-) keine Kopplung detektiert, (+) mäßige bis (+++) gute Immobilisierung, n.b.: nicht bestimmt.

Auftragspuffer	CodelinkSlide (AMERSHAM BIOSCIENCES)		Epoxy-Slide (QUANTIFOIL)	
	Ja	Nein	Ja	Nein
Quantifoil Solution I	+++	-	++	+
Quantifoil Solution II	n.b.	n.b.	+	-
Quantifoil Solution III	n.b.	n.d.	+	-
Quantifoil Solution IV	++	-	n.b.	n.b.
Quantifoil Solution V	+	-	n.b.	n.b.
150 mM NaPO ₄ , pH 7	+++	-	+	+

Die Sequenzen wurden mit einem „Amino-Anker“ am 5' Ende versehen, so dass die modifizierten Oligonukleotide unter bestimmten Reaktionsbedingungen eine kovalente Bindung (Schiff-Base) zu einer auf der Glasoberfläche immobilisierten Aldehydgruppe eingehen können (131, 221). Die besten Ergebnisse wurden mit Amino-modifizierten

Oligonukleotiden (NH₂-Linker), Codelink-Slides (AMERSHAM BIOSCIENCES) und 150 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7) als Auftragspuffer erzielt (Abb. 14).

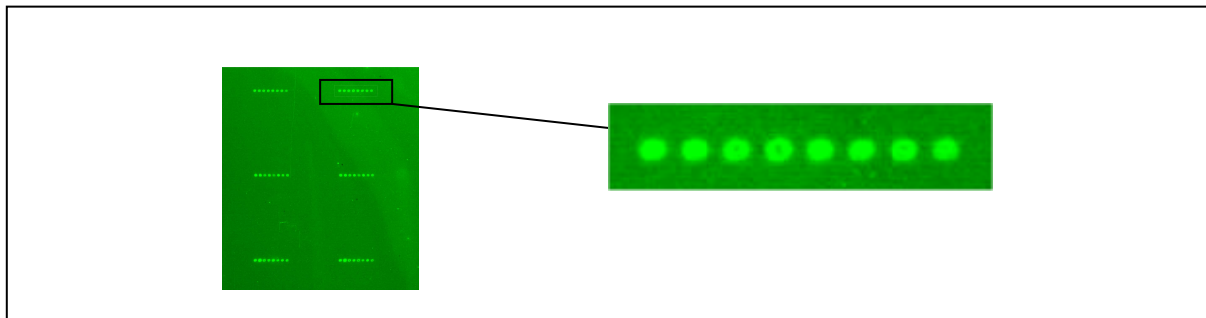


Abb. 14: Nachweis der Immobilisierung von Lipase-Signatursequenzen. Oligonukleotide wurden in 150 mM Na-Phosphat Auftragspuffer aufgenommen und auf einem Codelink-Slide (AMERSHAM BIOSCIENCES) mittels Arraytechnologie immobilisiert. Die Qualität der Immobilisierung wurde durch eine unspezifische DNA-Färbung durch Vistra-Green sichtbar gemacht.

3.2.4 Testscreening mit genomischer DNA

Nachdem ein verlässliches Protokoll für die Immobilisierung der Oligonukleotide etabliert war, wurden Hybridisierungen mit genomischer DNA durchgeführt. Die DNA wurde aus den verschiedenen Organismen isoliert, durch Ultraschall fragmentiert, denaturiert und anschließend durch „Random priming“ und matrizenabhängiger Auffüllreaktion durch das Klenow-Enzym mit dem Nukleotid-Analogon Cy3-dCTP (grüne Fluoreszenz), bzw. Cy5-dCTP (rote Fluoreszenz) markiert. Die Markierung wurde spektrophotometrisch geprüft und lag bei mindestens 3 eingebauten fluoreszierenden Molekülen pro 100 Basen. Die beladenen Glaträger wurden zwischen 3 und 24 Stunden mit 2,5 - 3,5 µg genomischer DNA bei unterschiedlichen Temperaturen (25 - 42°C), sowie verschiedenen Puffern hybridisiert. Abbildung 15 zeigt ein repräsentatives Beispiel einer Hybridisierung mit genomischer DNA aus *P. aeruginosa* mit ausgewählten Oligonukleotiden (linke Seite), sowie eine Hybridisierung mit genomischer DNA aus *E. coli* (rechte Seite), wobei die Auswahl der abgebildeten Oligonukleotide gleich war. Im Teil (a) der Abbildung 15 sind die Hybridisierungen der Signatursequenzen von Lipasen aus *P. aeruginosa* abgebildet. Nicht alle zu 100 % übereinstimmenden Positivsequenzen (LC 21-27; 50mere LC 68, 69) zeigten das erwartete intensive Signal (LC 22, 24, 26, 27, Abb. 15a). Zwar zeigten die beiden Spots der positiven 50mere LC 68 und LC 69 eine gute Hybridisierung an, jedoch konnte eine nahezu ähnliche Hybridisierungseffizienz auch mit genomischer DNA aus *E. coli* erzielt werden, obwohl die Homologie zu den jeweiligen Oligonukleotiden sehr viel geringer ist (Abb. 15 a, rechts). Die Negativsequenzen zeigten, bis auf das Oligonukleotid LC81, bei beiden

Hybridisierungen nur sehr schwache Signale (Abb. 15b). LC 81 wies immer eine hohe Signalstärke auf. Diese Probe ist insofern außergewöhnlich, weil LC81 einen extrem hohen GC-Gehalt von 88,9 % besitzt. In der unteren Reihe ist eine Abfolge der von links nach rechts immer um eine Base in der Identität abnehmende Reihe von Oligonukleotiden (LC 48-53) bei einer Hybridisierung mit der entsprechenden genomischen DNA aus *P. aeruginosa* abgebildet (Abb. 15c). Die abnehmende Intensität der Spots bestätigt die jeweils um eine Base schlechter werdende Homologie zur in der genomischen DNA von *P. aeruginosa* vorkommenden Zielsequenz. Die Hybridisierung der gleichen Oligonukleotide mit genomischer DNA aus *E. coli* zeigten nur ein sehr schwaches Signal.

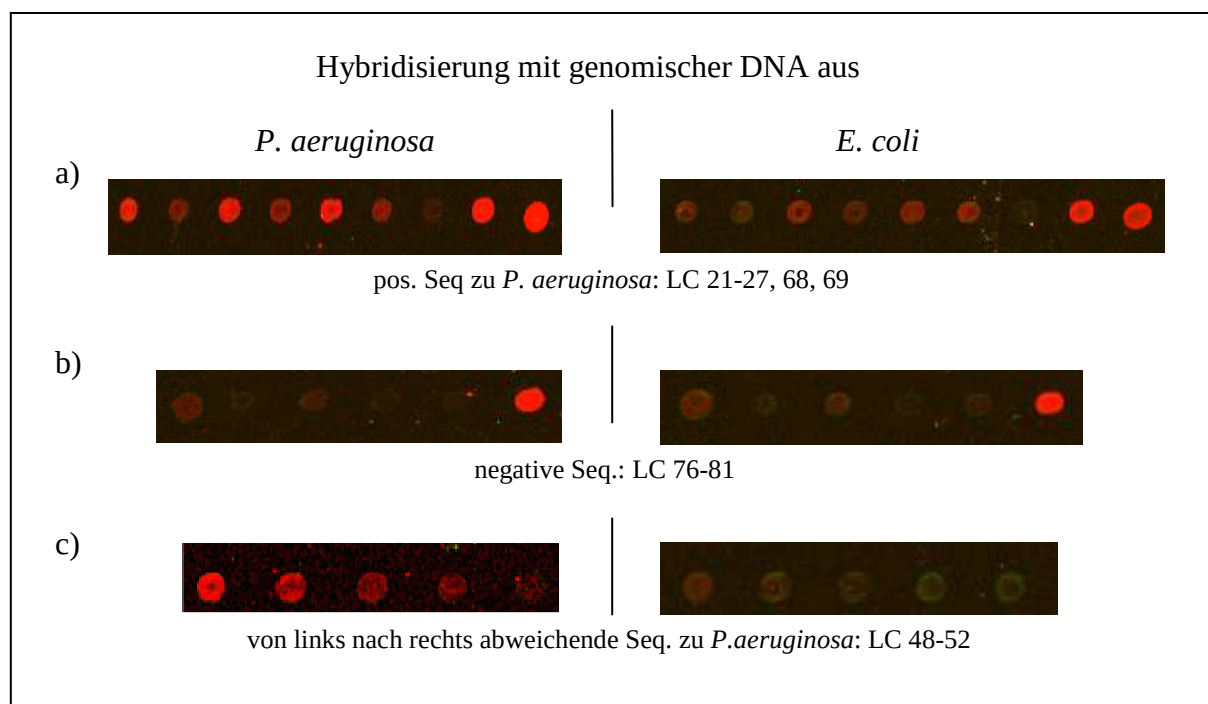


Abb. 15: Hybridisierung von genomischer DNA aus *P. aeruginosa* (links) und *E. coli* (rechts) mit verschiedenen Lipasesignatursequenzen. a) Hybridisierung mit Lipasesignatursequenzen aus *P. aeruginosa*, LC 21-27 entsprechen Oligonukleotiden von 18 bzw. 21 bp Länge, LC 68 und 69 entsprechen Oligonukleotiden von 50 bp Länge, b) Negativsequenzen, die keine signifikante Ähnlichkeit zu allen vier Genomen aufweisen (18 bp), c) Von links nach rechts (LC48-52) abnehmende Homologie von einer bis zu fünf Fehlpaarungen zur *P. aeruginosa* Signatursequenz

Allerdings waren bei diesen ersten Versuchen die entscheidenden Parameter für eine reproduzierbare Durchführung der Hybridisierungen noch nicht bekannt, so dass die Daten der meisten Oligonukleotide nicht mit unseren Erwartungen übereinstimmten (ohne Abb.). Die beobachtete Intensität der Hybridisierung deckte sich meist nicht mit der jeweiligen Homologie was nahe legt, dass noch weitere Parameter zu verstehen und zu optimieren sind. Somit machte zu diesem Zeitpunkt der Arbeiten eine Hybridisierung mit metagenomischer

DNA noch keinen Sinn, da zunächst weitere Verbesserungen an der Methodik zu erarbeiten waren.

Zur erstmaligen Anwendung eines Array-Hybridisierungssystems zur Detektion von Biokatalysatoren aus dem Metagenom wurden 81 Oligonukleotide synthetisiert. Diese konnten reproduzierbar auf den Glasoberflächen immobilisiert werden. Testhybridisierungen mit genomischer DNA zeigten ansatzweise die erwarteten Ergebnisse, d.h. Signatursequenzen konnten je nach Identität ihren komplementären Sequenzen aus genomischer DNA der jeweiligen Organismen aufgrund der Intensität der Signale zugeordnet werden.

3.3 Identifizierung von Biokatalysatoren durch Erhöhung der Expression nach Insertion eines Transposons

Bei der Detektion von Biokatalysatoren im Metagenom durch Aktivitätstests wird nicht jedes Enzym mit genau der gesuchten Aktivität identifiziert, wobei unterschiedliche Gründe vorliegen können (vgl. 1.3, Tab. 2). Somit ergibt das Screening mit einfachen Plattenassays keine vollständige Ausbeute der tatsächlich vorhandenen Biokatalysatoren (70, 87).

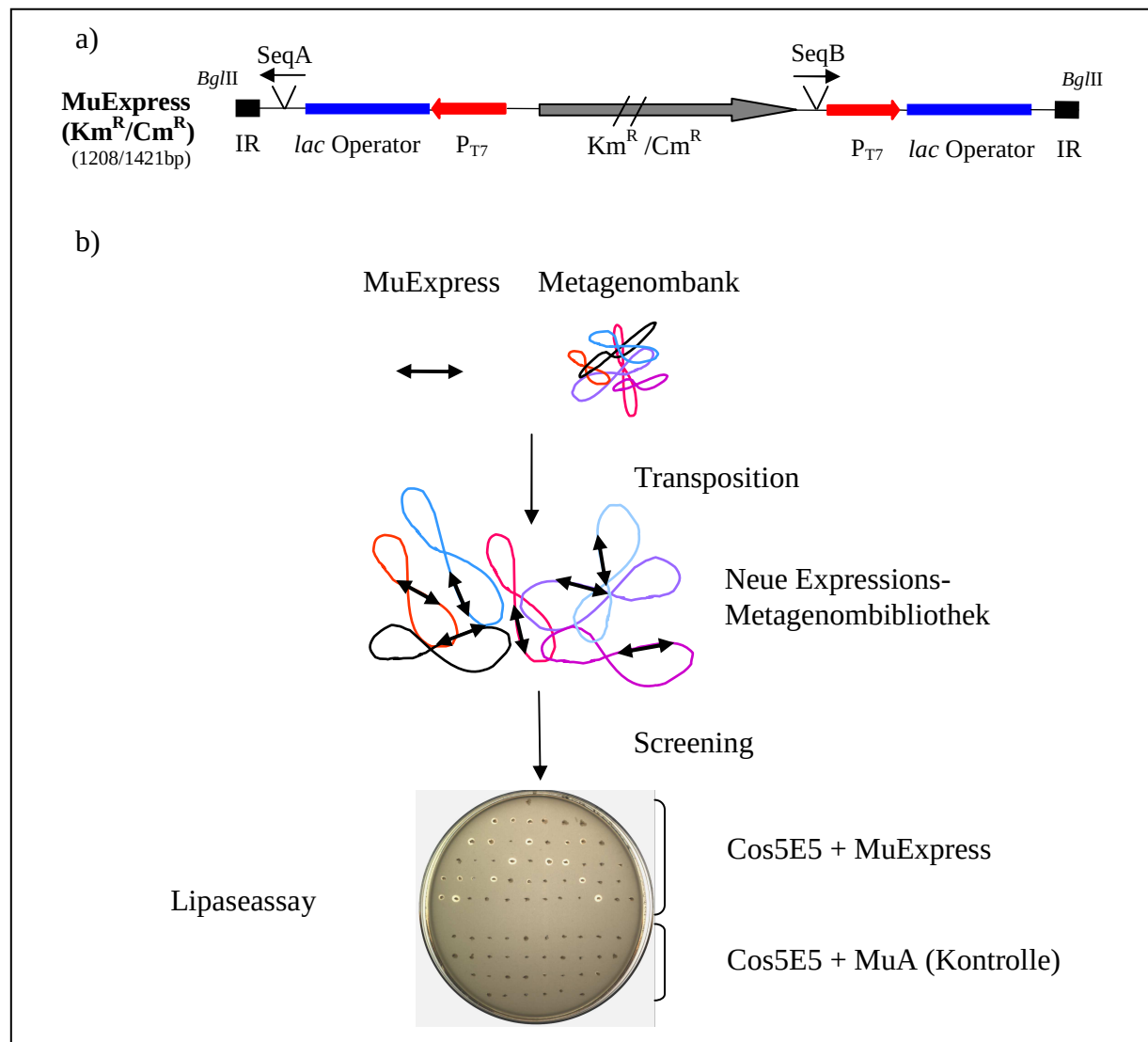


Abb. 16: Schematische Darstellung von MuExpress und der Vorgehensweise bei der Konstruktion von neuen Expressions-Metagenombibliotheken. a) MuExpress verfügt über starke, durch IPTG (*lac* Operator) induzierbare Promotoren (P_{T7}) in beide Richtungen, sowie Primerbindestellen zur flankierenden Sequenzierung (SeqA/B). MuExpress besitzt entweder eine Kanamycin (Km^R) oder eine Chloramphenicol (Cm^R) Resistenz. IR: Insertionssequenz. b) Durch Transposition integriert MuExpress *in vitro* zufällig in Cosmide bereits bestehender Metagenombibliotheken, so dass eine neue Expressionsbank entsteht. Im geeigneten Wirt kann anschließend ein Aktivitätsscreening durchgeführt werden, z.B. ein Lipaseassay. Gezeigt ist der Aktivitätsassay eines schwach lipolytisch aktiven Klon (pCos5E5) nach der Transposition mit MuExpress und einem promotorlosen Transposon (MuA). Höfe um die Kolonien zeigten lipolytische Aktivität an (vgl. Abb. 8).

Eine Ursache könnte die fehlende Expression der in den Metagenombibliotheken kodierten Biokatalysatoren sein, denn die Promotoren bleiben oft vom heterologen Wirt *E. coli* unerkannt. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein Transposon (MuExpress) konstruiert, welches über starke T7-Promotoren verfügt, welche sowohl stromabwärts wie -aufwärts vom zufälligen Insertionsort die Expression ermöglichen (128). Nach der Sequenzunabhängigen Integration in bereits bestehende Metagenombibliotheken kann ein Screening in einem *E. coli* Stamm durchgeführt werden, der über eine chromosomal kodierte T7-Polymerase verfügt (Abb. 16).

3.3.1 MuExpress verfügt über starke Promotoren und ist zur Sequenzierung geeignet

Das Transposon MuExpress basiert auf einem sogenannten Mu-Transposon, welches kommerziell zur Insertionssequenzierung genutzt wird (Entranceposon, FINNZYMES, Finnland). In dieses Transposon, welches schon über die Sequenzierprimerbindestellen SeqA/B verfügt (Abb. 16) wurden flankierende T7-Promotoren mit jeweils stromabwärts liegenden *lac*-Operatoren zur IPTG abhängigen Induktion einkloniert (128). Das Transposon wurde wegen der größeren Anwendungsvariabilität mit verschiedenen Vektorsystemen sowohl mit Kanamycin-, als auch mit Chloramphenicolresistenz konstruiert. Nach der *in vitro* Transposition soll MuExpress die Expression ermöglichen bzw. steigern. Das führt somit zu einer detektierbaren Aktivität von in großen DNA-Fragmenten kodierten Biokatalysatoren, deren nativer Promotor von *E. coli* oder anderen heterologen Expressionswirten nicht erkannt wird. Voraussetzung für ein erneutes Screening ist die Verwendung eines Bakterienstammes, der in der Lage ist, die T7-Polymerase zu exprimieren. Bei diesem Aktivitätsscreening positiv auffallende Klone können direkt über die Primerbindestellen SeqA/B in beide Richtungen sequenziert werden. Weiterhin kann MuExpress auch zur schnellen Insertionsmutagenese dienen, um die Sequenz von aktiven Klonen in Metagenombibliotheken zu entschlüsseln. Nach der Mutagenese können Klone mit Aktivitätsverlust aufgrund der Durchbrechung des Leserahmens durch MuExpress ebenfalls flankierend sequenziert werden. MuExpress ist auf einem Plasmid kodiert (pMuExpressKM/pMuExpressCM) und kann durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*III und anschließender Reinigung aus einem Agarosegel isoliert werden. Das Transposon kann also problemlos auch in großem Maßstab produziert werden.

3.3.2 MuExpress ist funktional

Zunächst sollte nach erfolgreicher Konstruktion gezeigt werden, ob MuExpress tatsächlich in der Lage ist, zufällig *in vitro* in Plasmide zu inserieren und dort eine induzierbare Expression

mit Hilfe der T7 Polymerase zu ermöglichen. Hierzu wurde ein promotorloses Fusionsvektorsystem mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) genutzt (pSWGFP, Wilhelm, unveröffentlicht). Das Transposon soll nach zufälliger Integration im geeigneten Wirt (*E. coli* BL21(DE3), NOVAGEN) zur Expression des GFP führen. Zur Kontrolle wurde zum einen der Leervektor auf Fluoreszenz geprüft, als auch dieselbe Transposition mit dem ursprünglichen, promotorlosen MuA Transposon durchgeführt. Bei der Transposition mit MuExpress konnte bei ca. 40 % der Klone eine Fluoreszenz mit bloßem Auge detektiert werden, während bei der Leervektorkontrolle und bei der Kontrolltransposition bei keinem der Klone eine Fluoreszenz festgestellt werden konnte (Abb. 17).

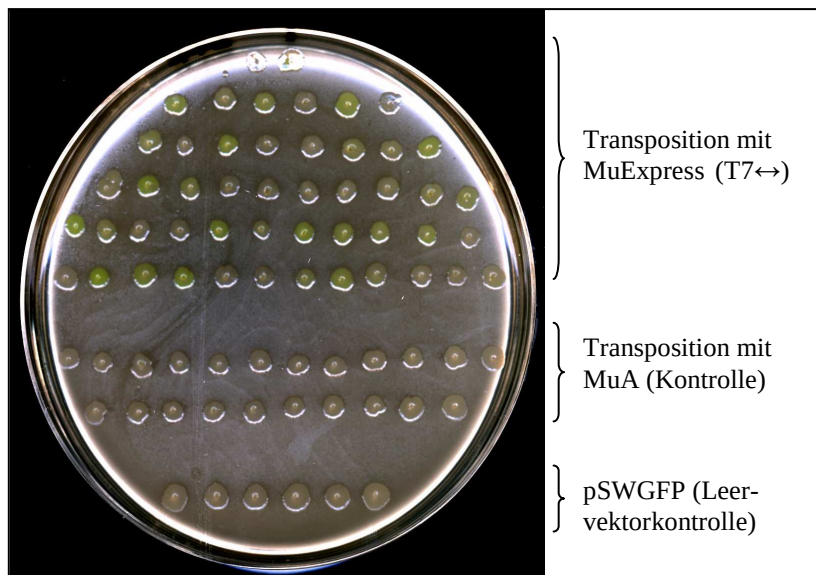


Abb. 17: GFP-Expression vom zufällig inserierten Transposon MuExpress. Der promotorlose, GFP kodierende Vektor pSWGFP wurde *in vitro* zum einen mit MuExpress, zum anderen mit dem promotorlosen Transposon MuA transponiert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Zufällig ausgewählte Klone der beiden Transpositionen, sowie von *E. coli* BL21(DE3) pSWGFP wurden auf eine Agarplatte übertragen. Klone mit exprimiertem GFP leuchten Grün.

Zur weiteren Funktionsprüfung von MuExpress wurde eine Transposition von einer Cosmid-kodierten, schwach gegen das Substrat Tributyrin aktiven Esterase durchgeführt, welche in der Metagenombibliothek des Trinkwasserbiofilms III (s. 3.1.1) identifiziert wurde. Durch eine Restriktionsanalyse wurde ermittelt, dass das Cosmid eine Insertgröße von etwa 35 kb besitzt (o. Abb.). Es wurden ebenfalls Kontrollen mit dem Leervektor, sowie mit dem promotorlosen Transposon durchgeführt. Etwa 10 % der mit MuExpress transponierten Klone wiesen eine erhöhte Aktivität auf, während beide Kontrollen nur Kolonien mit einer schwachen Aktivität zeigten (Abb. 18). In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass MuExpress die Expression und damit auch die Detektierbarkeit eines lipolytischen Enzyms aus einer Metagenombibliothek signifikant erhöhen konnte.

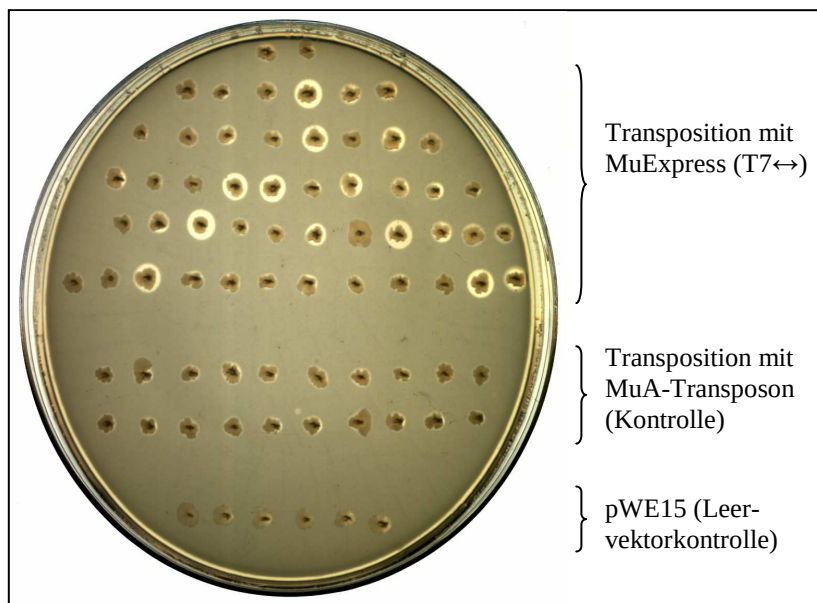


Abb. 18: Lipase-Expression vom zufällig inserierten Transposon MuExpress. Ein Cosmid aus einer Metagenombibliothek mit schwacher Lipaseaktivität wurde *in vitro* zum einen mit MuExpress, zum anderen mit dem promotorlosen Transposon MuA transponiert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Zufällig ausgewählte Klone der beiden Transpositionen, sowie von *E. coli* BL21(DE3) pWE15 wurden auf eine Agarplatte übertragen. Klone mit exprimierter Lipase zeigen Hofbildung.

3.3.3 Identifizierung einer neuen Esterase durch MuExpress

Das Transposon MuExpress sollte nun bei der vorgesehenen Anwendung, nämlich bei der Erstellung neuer Expressionsbanken aus bestehenden Metagenombibliotheken und anschließendem Screening, erprobt werden. Hierzu wurde zunächst die 1700 Einzelklone umfassende Cosmidbank mit einer durchschnittlichen Insertgröße von ca. 35 kb des gut analysierten Trinkwasserbiofilms III als Ausgangsmaterial benutzt (175, 176). Zunächst wurde ein Aktivitätstest zur Analyse der bereits in dieser Bank detektierbaren Biokatalysatoren vorgenommen. Dabei handelte es sich um lipolytische, proteolytische und amylolytische Aktivitäten. Hierbei wurden fünf lipolytische Enzyme detektiert, allerdings keine der anderen beiden Aktivitäten. Anschließend wurden alle Klone in Mikrotiterplatten angezogen und zu Pools von 300 - 400 Klonen vereinigt, bevor die Plasmid-DNA isoliert wurde. Anschließend wurde die Transposition mit MuExpress durchgeführt und dieser Transpositionsansatz wurde in Phagen verpackt, mit welchen dann ein geeigneter *E. coli* Stamm transduziert werden konnte. Unter dem Selektionsdruck der Cosmid-, als auch der Transposon-kodierten Resistenz wuchsen nur Klone, welche ein inseriertes Transposon trugen. Einige der Klone wurden mittels Restriktionsanalyse überprüft (Abb. 19). Alle untersuchten Klone wiesen ein für MuExpress typisches, etwa 1200 bp großes DNA-Fragment nach einem *Bam*HI Verdau auf und es bestätigte sich außerdem die durchschnittliche Insertgröße von etwa 35 kb. Die Ausbeute lag bei ca. 1000 Kolonien pro μ l Phagenverpackungsansatz. Das entspricht einer Transpositionseffizienz von etwa 2 % bei

einer Transformationsrate von etwa 50.000 Klonen insgesamt (Gesamtzahl der Transformanden mit und ohne MuExpress). Es wurde eine neue Expressionsbank erstellt, die 3400 Klone enthielt, was einer zweifachen Größe der Ursprungsbank entsprach. Diese wurden dann wiederum den verschiedenen Aktivitätstests unterzogen, wobei die Zellen mit IPTG (0,1 mM) induziert wurden. Es konnte ein Klon mit lipolytischer Aktivität gegen das Substrat Tributyrin identifiziert werden. Die Insertgröße des isolierten Cosmids betrug etwa 30 kb und eine erste Sequenzierung von den beiden Transposon-kodierten Sequenzierprimerbindestellen SeqA und SeqB zeigte keine Homologie zu lipolytischen Enzymen. MuExpress lag also zu weit stromaufwärts des ORFs der putativen Esterase um in einer Sequenzierreaktion vom Transposon aus den entsprechenden Leserahmen zu entschlüsseln. Deswegen wurde die Sequenz durch eine Subklonierung des Cosmids ermittelt. Das Cosmid wurde durch die Restriktionsendonuklease *Sau3a* partiell verdaut. Dieses Enzym besitzt eine Erkennungssequenz von nur vier Basenpaaren und schneidet somit sehr häufig in verschiedensten Sequenzen. Die entstehenden 5' Überhänge sind kompatibel mit *Bam*HI restringierten Sequenzen. DNA-Fragmente mit einer Größe von 2-5 kb wurden aus einem Agarosegel isoliert und in einen durch *Bam*HI linearisierten Klonierungsvektor ligiert. Von aktiven Transformanden wurden die Plasmide isoliert und durch Restriktionsanalyse die Insertgröße ermittelt. Zwei Klone mit der kleinsten Insertgröße wurden sequenziert und es konnte ein ORF identifiziert werden, welcher LCL2 genannt wurde.

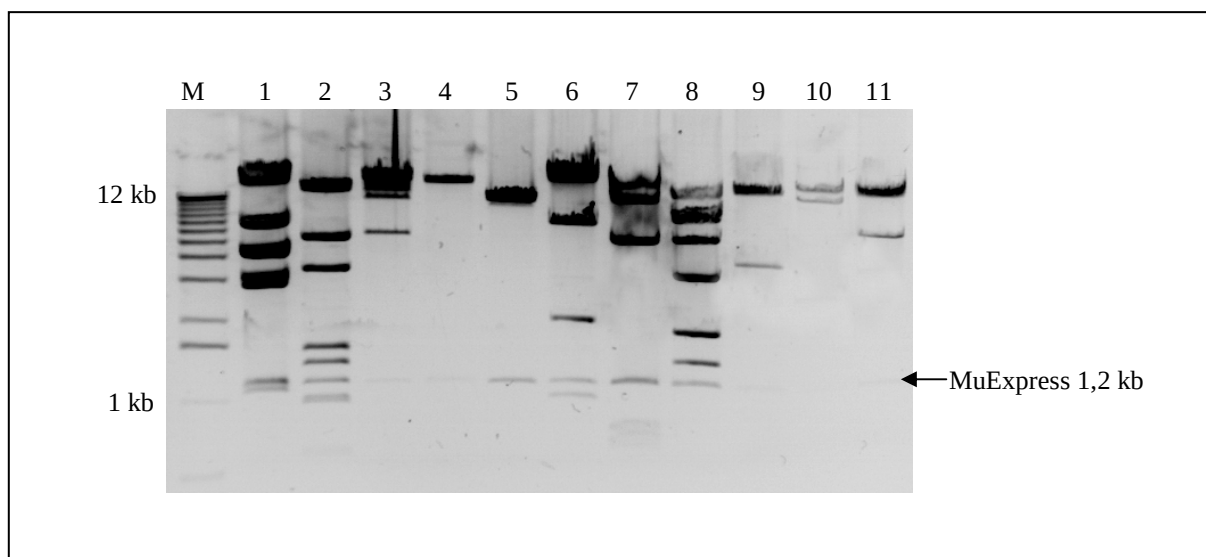


Abb. 19: Restriktionsanalyse von Cosmiden zufällig ausgewählter Klone der neu konstruierten Expressions-Metagenombibliothek des Trinkwasserbiofilms III. Von den elf zufällig ausgewählten Klonen (Spur 1-11) wurde die Cosmid DNA isoliert und mit *Bam*HI vollständig hydrolysiert. Alle Restriktionsanalysen besaßen ein für MuExpress typisches, etwa 1200 bp großes DNA Fragment (s. Pfeil).

Bei der neu identifizierten Esterase LCL2 handelte es sich um eine neue Esterase mit nur geringen Homologien zu einer Depolymerase aus *Acidovorax delafieldii* (32 % Identität), einer Dienelactone Hydrolase aus *Thermobifida fusca* (32 %) und einer Lipase aus *Streptomyces coelicolor* A3[2] (32 % Identität). Diese Esterase wurde in die Überexpressionsvektoren pET22b mit einer C-terminalen- und pET16b mit einer N-terminalen His-Tag Fusion kloniert, jedoch konnte auch unter diversen Anzuchtbedingungen und mit verschiedenen Expressionswirten nur eine sehr geringe, im SDS-Gel nicht detektierbare Überexpression erzielt werden, so dass eine Reinigung nicht möglich war (ohne Abb.). Jedoch konnte in den Ganzzelleextrakten der LCL2- Überexpression eine schwache Aktivität gegen kurzkettige Glycerolester und Vinylester (C2-C6; unter 1U/ml), nicht jedoch gegen länger-kettige Substrate nachgewiesen werden, während Kontrollkulturen (uninduziert bzw. nur Leervektor) keine Aktivität zeigten (ohne Abb.).

Es wurde ein Transposon MuExpress konstruiert, welches die Expressionseffizienz von Biokatalysatorgenen erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass MuExpress zufällig in verschiedene Vektoren *in vitro* inseriert und dann in der Lage ist, die Expression von GFP, bzw. Lipasegenen zu ermöglichen oder zu erhöhen. Mit Hilfe von MuExpress konnte ein in umodifizierten Metagenombanken zuvor nicht detektierbarer Klon mit lipolytischer Aktivität identifiziert werden.

3.4 Biochemische Charakterisierung von Biokatalysatoren

Um eine Schnittstelle zwischen der Identifizierung von Biokatalysatoren und deren biotechnologischen Anwendung herzustellen, reicht es nicht aus, nur die Sequenz eines bestimmten, aktiven Enzyms zu ermitteln. Neben der Grundvoraussetzung einer unkomplizierten Produktion (Überexpression) und Reinigung des Biokatalysators ermöglicht erst eine eingehende biochemische Charakterisierung die realistische Einschätzung des Nutzens von zur Verfügung stehenden Enzymen.

3.4.1 Die Auswahl der Biokatalysatoren

Insgesamt wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. W. Streit (Universität Duisburg-Essen) 15 verschiedene lipolytische Enzyme in den verschiedenen Metagenombibliotheken gefunden, von denen einige zur näheren biochemischen Charakterisierung ausgewählt wurden. In der Metagenombibliothek des agarolytischen Konsortiums, einer Anreicherung von einer Göttinger Bodenprobe auf einem Minimalmediumagar, wurde ein Klon (XE1) mit lipolytischer Aktivität gegen das Substrat Tributyrin entdeckt. Die komplette Sequenzierung des Cosmids ergab eine Insertgröße von etwa 25 kb mit 18 putativen ORFs. Zwei möglicherweise für die Aktivität verantwortliche Lipasegene wurden in einem Cluster neben anderen hypothetischen Enzymen identifiziert (Genbank Accession No. AY240957, komplette Sequenzen und weitere Informationen unter <http://wwwuser.gwdg.de/~biofilm/genemining.htm>). Die Aminosäuresequenzen der beiden putativen Enzyme zeigen Ähnlichkeiten zu Lipasesequenzen von *P. brassicacearum* (50 % Identität zu LipA) und *P. spec UB48* (80 % Identität zu LipB). Die beiden Lipasegene sind neben Genen lokalisiert, die Ähnlichkeit zu einem Typ I Sekretionssystem besitzen (*aprEF*, Abb. 20).

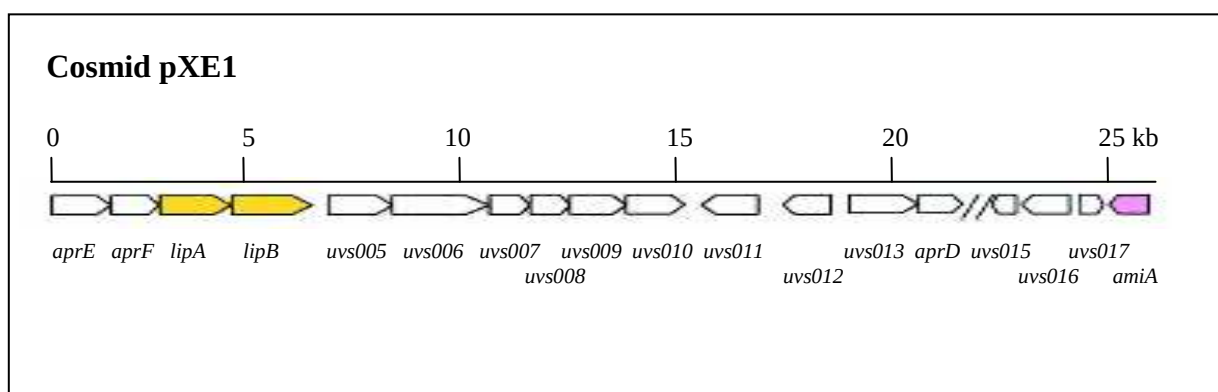


Abb. 20: Schematische Darstellung der Genregion des komplett sequenzierten Cosmids pXE1 (208).

Beide Lipasen sollten in pET-Vektoren kloniert und überexprimiert werden. Jedoch scheiterte die Amplifikation von *lipA* trotz zahlreicher Parameteränderungen der PCR-Bedingungen, wie Zugabe von DMSO in verschiedenen Konzentrationen, Variation der Hybridisierungstemperatur, sowie der Endkonzentrationen von Template und Primer. Das zweite Lipasegen *lipB* wurde in den Expressionsvektor pET22b kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) unter der Kontrolle des T7 Promotors überexprimiert. Bei der Überexpression bildeten sich allerdings unlösliche, inaktive Proteinkomplexe (inclusion bodies), die auch bei einer Verringerung der Wuchstemperatur und/oder der IPTG Konzentration beobachtet wurden (ohne Abb.). Auch die Expression in anderen *E. coli* Stämmen brachte keine Verbesserung. Da das Protein Ähnlichkeit zu *Pseudomonas*-Lipasen besitzt (s. oben), wurde *lipB* in den Vektor pBR22b umklontiert, um eine Expression in dem T7-Überexpressionstamm *P. aeruginosa* PABST7.1 zu ermöglichen. Auch in diesem Versuch wurde jedoch nur unlösliches, inaktives Protein produziert (o. Abb.).

Die bei den Experimenten mit dem Expressionstransposon MuExpress identifizierte Esterase LCL2 ließ sich unter keiner der verwendeten Variationen zur Überexpression in ausreichenden Mengen zur Reinigung gewinnen (vgl. 3.3.3). Die nähere biochemische Untersuchung der bisher genannten Enzyme LipA, LipB und LCL2 konnte wegen der fehlenden Produktion von gereinigtem Enzym nicht detailliert durchgeführt werden (Tab. 14).

Tab. 14: Übersicht über die Biokatalysatoren, welche für eine weiterführende biochemische Charakterisierung in Frage kamen.

Enzym	Herkunft (s. 3.1.1)	Größe	Klonierung	Expression	Aktivität	Reinigung
LipA	Agarolytisches Konsortium	566 AS	Nicht möglich	Nein	Nein	Nein
LipB	Agarolytisches Konsortium	617 AS	Ja	Ja (IB)	Nein	Nein
EstCL	Trinkwasserbiofilm	318 AS	Ja	Ja	Ja	Ja
LCL2	Trinkwasserbiofilm nach Transposition mit MuExpress	301 AS	Ja	schwach	Ja	Nein
EstA3	Trinkwasserbiofilm	389 AS	Ja	Ja	Ja	Ja
EstCE	Öl-kontaminierter Boden	397 AS	Ja	Ja	Ja	Ja

IB: inclusion bodies

Die drei lipolytischen Enzyme EstCE (Öl-kontaminierter Boden), EstA3 und EstCL (beide Trinkwasserbiofilm) wurden kloniert, überexprimiert und mit Affinitätschromatographie gereinigt (Tab. 14), wobei die gereinigten Enzyme EstCE und teilweise EstA3 (neben eigener

Klonierung und Reinigung) von der Arbeitsgruppe Streit zur Verfügung gestellt wurden. Diese drei neuen Enzyme aus bisher unkultivierten Bakterien wurden anschließend detailliert biochemisch charakterisiert.

3.4.2 Reinigung und theoretische Eigenschaften der lipolytischen Enzyme

Die Enzyme wurden zur besseren Reinigung als His-Tag Fusionsprotein exprimiert. Hierzu wurde *estCL* und *estA3* in den Vektor pET16b zur Expression mit einem N-terminalem 6x Histidin-Tag kloniert. Rekombinante Klone konnten hierbei jeweils direkt auf Esterase-Indikatorplatten mit dem Substrat Tributyrin identifiziert werden. Eine Sequenzierung bestätigte die korrekte Insertion der jeweiligen Esterasegene. Nach einer Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) konnte bei einer SDS-Gel-Analyse der Ganzzelleextrakte jeweils eine zusätzliche Proteinbande bei der entsprechenden theoretischen Größe der Enzyme gegenüber einer Kontrollkultur beobachtet werden. Die beiden Proteine wurden anschließend durch eine Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA Säule bis zur Homogenität gereinigt (Abb. 21, Tab. 15).

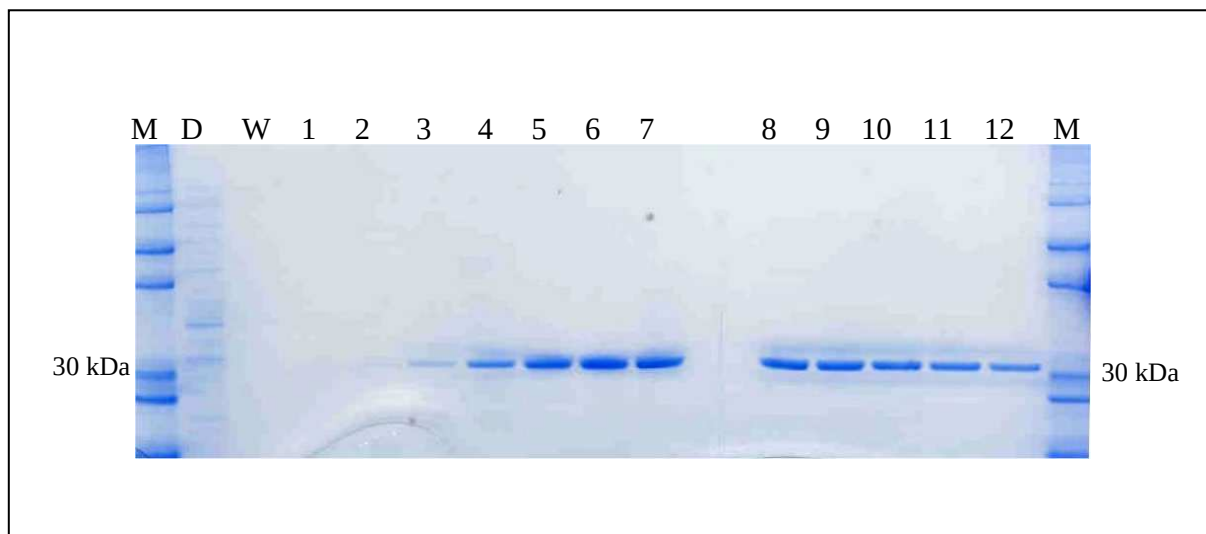
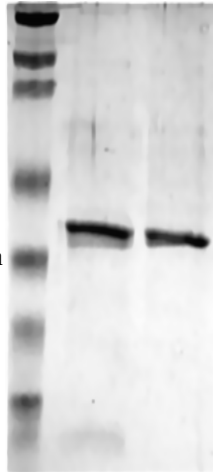


Abb. 21: SDS-PAGE Analyse der Reinigung von EstCL. Die Esterase EstCL wurde als His-Tag Fusionsprotein in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Nach dem Aufschluss der Zellen wurde das Lysat auf eine Ni-NTA Säule gegeben und nach einem Waschvorgang wurde EstCL (33 kDa) mittels eines Imidazol-Gradienten eluiert. In den Spuren 1-12 sind Aliquots der Fraktionen mit Esteraseaktivität aufgetragen. M: Proteinmarker, D: Durchlauf, W: Waschfraktion.

Das theoretische Molekulargewicht der drei Esterasen lag in einem Bereich von 33-43 kDa. Gereinigtes EstA3 lief in einem SDS-Gel allerdings etwas höher als erwartet (ca. 46 kDa, Tab. 15). Bei EstA3 war zusätzlich ein weiterer Reinigungsschritt nach dem Größenausschlussverfahren mittels Gelfiltration nötig (Tab. 15, Spur 2).

Tab. 15: SDS-PAGE der gereinigten Enzyme EstCL, EstCE und EstA3 und deren theoretische Eigenschaften. Die drei Enzyme wurden als His-Tag Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie gereinigt. EstA3 wurde zusätzlich durch Gelfiltration gereinigt (Spur 2). Angegeben sind die theoretischen Proteindaten, sowie die signifikanteste Homologie des Enzyms über die gesamte Länge.

	EstCL	EstCE *	EstA3
Reinigung			
Größe kDa	33	42	43 (aktives Multimer ^{**})
Sequenz	954 bp / 318 AS	1167 bp / 389 AS	1191 bp / 397 AS
Isoelektrischer Punkt	4,6	5,3	4,8
Signifikanteste Identität nach blastp (3)	51% Esterase <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	46 % Esterase <i>Burkholderia gladioli</i>	54 % β -Lactamase <i>Rhodopseudomonas palustris</i>
Motiv	G-X-S-X-G Esterase	S-X-X-K β -Lactamase	S-X-X-K β -Lactamase

* Reinigung und SDS-PAGE. von C. Elend (AG Streit), ** nachgewiesen durch Gelfiltration und Enzymogramme von C. Schmeisser (AG Streit) (175).

Alle drei Enzyme besitzen einen isoelektrischen Punkt im sauren Bereich. Bei allen drei Enzymen handelt es sich um neue Biokatalysatoren, die größten Identitäten liegen zwischen 47 und 54 %. Während EstCL und EstCE Homologien zu Esterasen aufweisen (*Novosphingobium aromaticivorans*, bzw. *Burkholderia gladioli*) ist EstA3 am ehesten mit einer β -Lactamase aus *Rhodopseudomonas palustris* verwandt. Interessanterweise besitzt nicht nur EstA3, sondern auch EstCE statt eines typischen Esterase-Motivs (G-X-S-X-G) ein β -Lactamase-Motiv (S-X-X-K), wobei das Serin durch Mutationsanalyse als die für die Esteraseaktivität essentielle, nukleophile Aminosäure identifiziert wurde (56, 175). Diese Art von Esterasen mit Ähnlichkeit zu β -Lactamasen werden von Arpigny & Jaeger der Klasse

VIII der Lipasen zugeordnet (7). Alle drei Esterasen standen im Maßstab von einigen Milligramm als bis zur Homogenität gereinigtes Enzym zur Verfügung (Tab. 15)

3.4.3 Die Esterasen bevorzugen kurzkettige Triglyceride und Vinylester als Substrate

Ester unterschiedlicher Struktur und Kettenlänge sollten dazu dienen, ein Substratspektrum der drei lipolytischen Enzyme zu erstellen und zu ermitteln, ob es sich bei den Enzymen tatsächlich um Esterasen handelt. Alle in Tabelle 16 aufgelisteten Aktivitäten wurden mit einer Titrationsmethode ermittelt. Hierbei wurde eine Kinetik der Esteraseaktivität über einen Zeitraum von fünf Minuten, bei einer Enzymzugabe von 2-4 µg und einer Substratkonzentration über der jeweiligen kritischen Mizellenkonzentration ermittelt (Grenzwertkonzentration, bei der das Substrat Mizellen bildet).

Tab. 16: Aktivitäten der drei Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 gegenüber Triglyceriden und Vinylestern unterschiedlicher Kettenlängen. Die Ergebnisse wurden titrimetrisch im pH Stat (METROHM, Schweiz) gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus jeweils drei voneinander unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen lagen jeweils unter 10 %. n.b.: nicht bestimmt.

Substratklasse	Name/Kettenlänge	EstCL [U/mg]	EstCE [U/mg]	EstA3 [U/mg]
Triglyceride	Triacetin / C2	120	27	148
	Tripropionin / C3	200	33	n.b.
	Tributylin / C4	333	55	168
	Tricapronin / C6	n.b.	n.b.	0
	Tricaprylin / C8	0	0	0
	Tricaprin / C10	0	0	0
	Trilaurin / C12	0	0	0
Vinylester	V-Acetat / C2	0	13	108
	V-Propionat / C3	173	13	380
	V-Butyrat / C4	553	16	388
	V-Capronat / C6	n.b.	0	238
	V-Caprylat / C8	80	0	155
	V-Laurinat / C12	0	0	7,5
	V-Myristinat / C14	0	0	n.b.

Durch die Entstehung der entsprechenden Fettsäuren der eingesetzten Substrate und die damit verbundene Ansäuerung des Reaktionspuffers war der Verbrauch an 10 mM NaOH zur Konstanthaltung des pH Werts ein Maß für die Aktivität. Die Esterase EstCL zeigt gegen den

Vinylsäureester von Butyrat die höchste aller gemessenen Aktivitäten (553 U/mg). EstCL und EstCE setzten keine Triglyceride oder Vinylester mit einer Kettenlänge von 6 oder mehr Kohlenstoffatomen um. EstA3 hingegen zeigte gegen Vinylcaproat eine relativ hohe (238 U/mg) und auch noch gegen Vinyl Laurinat eine schwache Aktivität (7,5 U/mg), spaltete allerdings keine Triglyceride dieser Kettenlängen. EstA3 setzte grundsätzlich Vinylester besser um als Triglyceride und die höchste Aktivität wurde mit dem Substrat Vinylbutyrat gemessen (388 U/mg). Ähnliche Aktivitäten zeigte auch EstCL, welche ebenfalls Vinylbutyrat als Substrat bevorzugt (553 U/mg), aber auch hohe Aktivitäten gegen Tributyrin oder Tripropionin aufwies (333 bzw. 200 U/mg). Der Vinylester von Caprylat (C8) wird ebenfalls noch umgesetzt (80 U/mg). Relativ schwache Aktivitäten wies die aus dem Öl-kontaminierten Boden isolierte Esterase EstCE auf, wobei der höchste Umsatz mit dem auch zum Screening verwendeten Substrat Tributyrin zu verzeichnen war (55 U/mg).

3.4.4 Die Esterasen sind nicht interphasenaktivierbar

Schon 1958 wurde festgestellt, dass einige Lipasen keine klassische Michaelis-Menten Kinetik zeigten (173). Bei Überschreiten der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) des Substrats zeigten diese Enzyme einen sprunghaften Anstieg der Aktivität (Interphasenaktivierung).

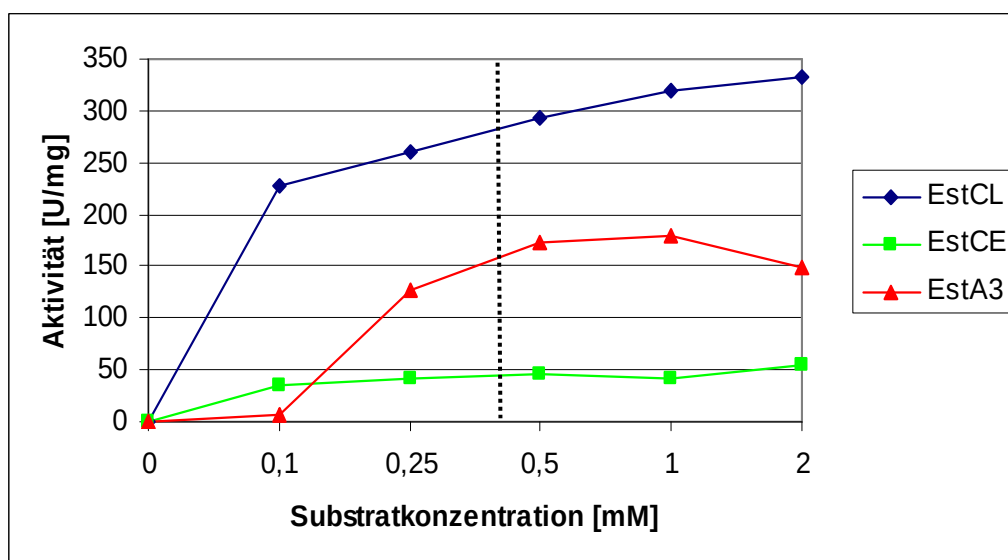


Abb. 22: Kinetik und Interphasenaktivierbarkeit der drei Esterasen EstCL, EstCE und EstA3. Die Aktivität der drei gereinigten Enzyme wurde titrimetrisch mit steigenden Substratkonzentrationen bestimmt. Die gestrichelte Linie markiert die Substratkonzentration der kritischen Mizellenkonzentration des hier eingesetzten Substrats Tributyrin.

Lipasen sind zwar durch dieses Kriterium nicht von Esterasen abzugrenzen, aber die Kinetik eines lipolytischen Enzyms ist weiterhin ein biochemisches Charakteristikum (30, 207). Die Kinetik und damit die Interphasenaktivierbarkeit der drei Esterasen wurde mit der Titrationsmethode (vgl. 3.4.3) bei jeweils ansteigenden Substratkonzentrationen bestimmt. Ein Enzym kann durchaus nur bei bestimmten Substraten eine Interphasenaktivierung aufweisen, wie für die Lipase aus *Staphylococcus hyicus* gezeigt wurde (205), deshalb wurde die Kinetik mit verschiedenen Substraten gemessen. In Abbildung 22 sind die Kinetiken der drei Enzyme gegen das Substrat Tributyrin, welches von allen gut umgesetzt wurde (vgl. 3.4.3), wiedergegeben. Die Kinetik dieses Substrats steht repräsentativ für andere gemessene Substrate, wie Triacetin, Tripropionin oder Propionsäurevinylester. Das Substrat Tributyrin bildet ab einer Konzentration von 0,41 mM Mizellen (Abb. 22 gestrichelte Linie). Bei keinem der drei Enzyme ist ein sprunghafter Anstieg der Aktivität bei dieser Konzentration zu beobachten, stattdessen folgt die Aktivität bei Steigerung der Substratkonzentration einer Michaelis-Menten Kinetik. Dieser Verlauf wurde auch mit den anderen getesteten Substraten beobachtet. Die lipolytischen Enzyme EstA3, EstCE und EstCL sind demnach nicht interphasenaktivierbar.

3.4.5 Die Esterasen sind alkalistabil

Ein weiteres klassisches biochemisches Charakteristikum ist die Stabilität von Enzymen gegenüber verschiedenen pH-Werten. Zur Durchführung dieser Untersuchung wurden die gereinigten Enzyme in einer Konzentration von 0,5 µg für 48 h bei Raumtemperatur in verschiedenen Puffersystemen (je 50 mM Glycin, Tris oder Na-Phosphat) inkubiert. Anschließend konnte die Restaktivität der Enzyme gegenüber dem Substrat pNPC (para-Nitrophenylcaproat) bestimmt werden (Abb. 23). EstCL ist im alkalischen Bereich von pH 10 am stabilsten, behält aber auch bei pH 11 noch fast 60 % der Aktivität, während die Aktivität im neutralen Bereich um 50 % abnimmt. Bei einem pH unterhalb von 6 ist EstCL sehr instabil und die Aktivität sinkt um etwa 90 %. EstCL ist demnach ein alkalistabiles Enzym. Ein ähnliches Stabilitätsspektrum zeigt auch die Esterase EstCE, mit dem Unterschied, dass sie noch alkalistabiler ist. Sogar bei einer Inkubation bei pH 12 verliert sie nur unwesentlich an Aktivität (Restaktivität etwa 85 %), während die Aktivität im neutralen und sauren Bereich sehr stark abfällt. Unterhalb von pH 6 wird EstCE komplett inaktiviert. Dagegen ist EstA3 über einen breiten pH-Bereich stabil und behält von pH 5 bis 11 über 60 % der Ursprungsaktivität. Am stabilsten ist die Esterase EstA3 im leicht alkalischen Bereich (pH 8).

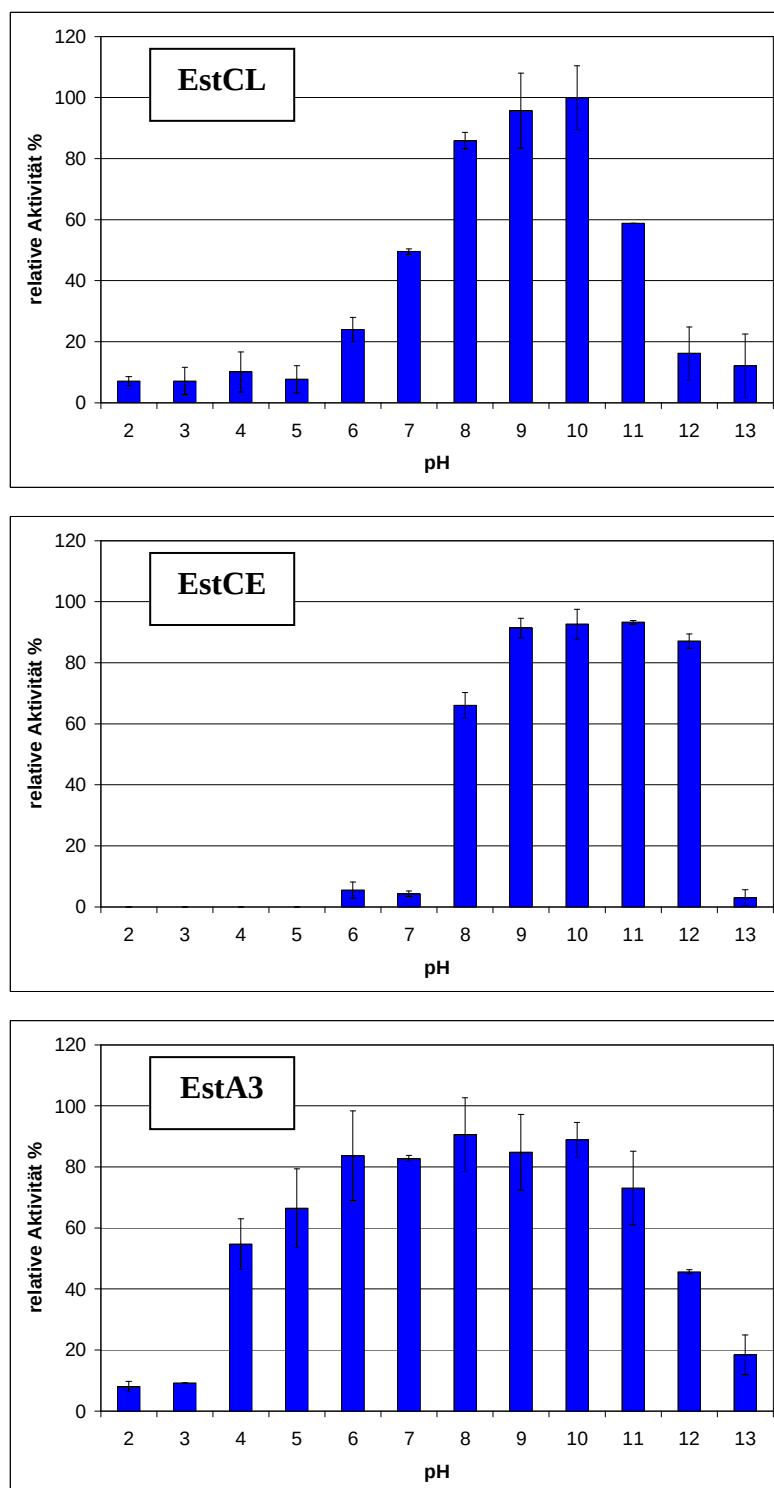


Abb. 23: Stabilität der drei Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 gegenüber verschiedenen pH-Werten. Etwa 0,5 µg der gereinigten Enzyme wurden in 50 mM Puffer der verschiedenen pH-Werte (pH 2-3: Glycin/HCl, pH 4-6: NaPhosphat, pH 7-9: Tris/HCl, pH 10-13: Glycin/NaOH) aufgenommen und 48 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Restaktivität spektrophotometrisch gegenüber dem Substrat pNP-Caproat (C6) bestimmt. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Messungen

Alle drei Esterasen sind demnach alkalistabil, während nur EstA3 gleichzeitig auch saure pH-Werte verträgt und somit über einen weiten pH-Bereich stabil ist. Auffällig ist weiterhin, dass alle drei Enzyme allgemein sehr stabil bei Raumtemperatur sind. Sie verlieren höchstens 10 % ihrer Aktivität nach zwei Tagen Inkubation bei den jeweils optimalen pH-Werten, EstCL behält sogar annähernd 100 % Restaktivität.

3.4.6 Die Esterasen besitzen ein Aktivitäts-Optimum im alkalischen Bereich

Die Stabilität eines Enzyms bei bestimmten pH-Werten lässt noch keine Aussage über das pH-Optimum, d.h. den pH-Wert, bei dem das Enzym die höchste Aktivität zeigt, zu.

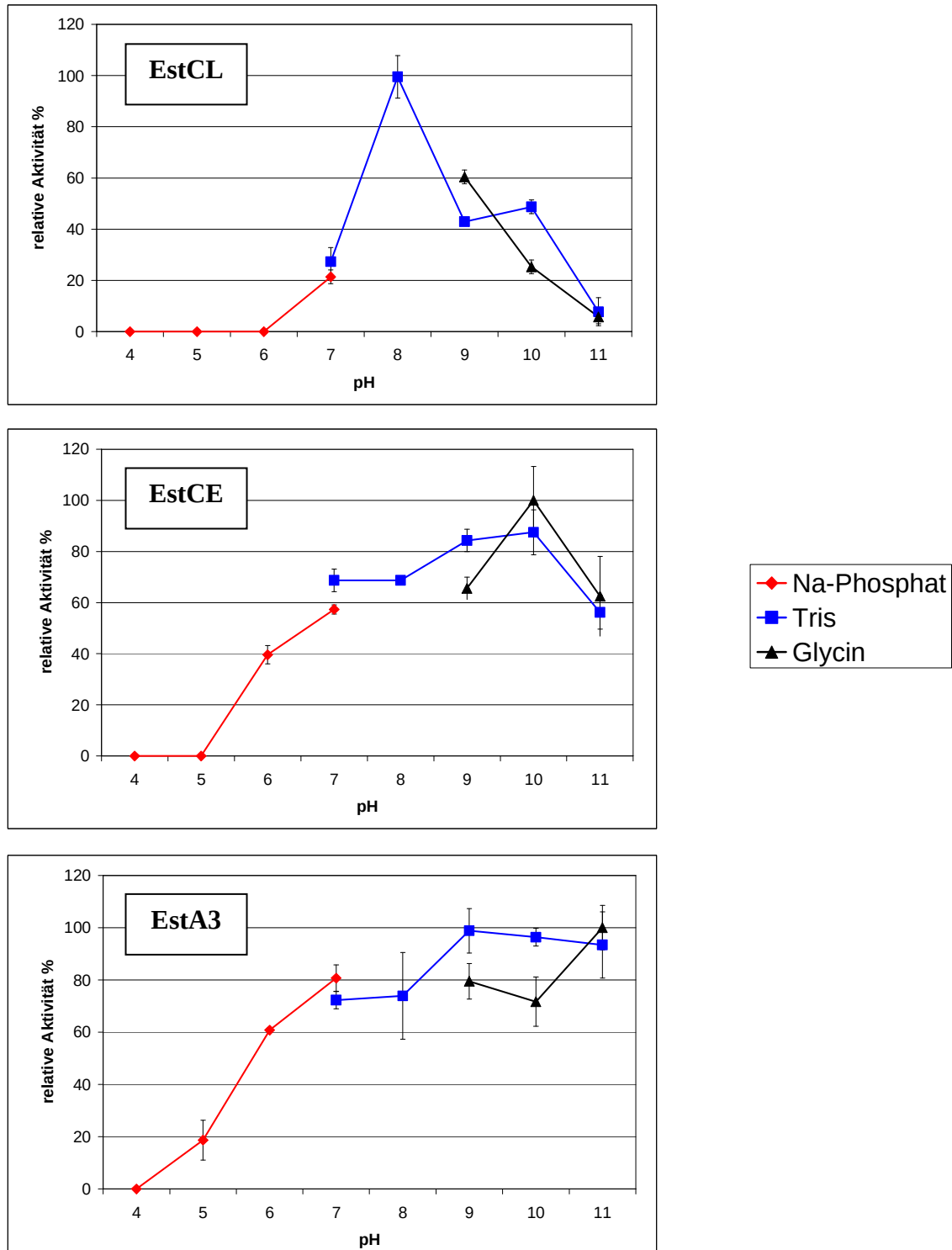


Abb. 24: Bestimmung der optimalen pH-Werte von EstCL, EstCE und EstA3. Die Aktivität von etwa 2 µg der gereinigten Enzyme wurde titrimetrisch gegen Tributyrin bei den verschiedenen pH-Werten und über einen Zeitraum von 5 min bestimmt. Die höchste gemessene Aktivität wurde gleich 100 % relative Aktivität gesetzt. Bei den Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils zwei voneinander unabhängigen Messungen.

Um diese Werte zu ermitteln, muss der eigentliche Aktivitätstest bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt werden. Bei der Durchführung der Messung wurden unterschiedliche Puffersysteme (hier Na-Phosphat: pH 4-7; Tris/HCl: pH 7-11; Glycin: pH 9-11) benutzt, um den pH Wert während der Messung stabil zu halten. Als Substrat wurde Tributyrin eingesetzt, welches bei den unterschiedlichen pH Werten (pH 4-11) relativ stabil bleibt, also nur zu geringer Autolyse neigt. Die zuvor bestimmte Autolyserate wurde bei den Ergebnissen berücksichtigt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Aktivität der lipolytischen Enzyme in Prozent angegeben, wobei die höchste Aktivität in Bezug auf den pH-Wert mit 100 % gleichgesetzt wurde (Abb. 24). Die höchste Aktivität und somit das pH-Optimum zeigt EstCL bei einem pH-Wert von 8. Sowohl bei höheren, als auch bei niedrigeren pH-Werten fällt die Aktivität stark ab. Bei einem pH-Wert unter 7 ist EstCL nicht mehr aktiv, während die Aktivität bis pH 10 nur um 50 % abnimmt und auch bei pH 11 noch eine Restaktivität zu beobachten ist. Die Esterase EstCE besitzt ein pH-Optimum im alkalischen Bereich, die höchste Aktivität ist bei pH 10 zu beobachten. Im Gegensatz zu EstCL fällt die Aktivität nicht bei höheren oder niedrigeren pH-Werten stark ab, sondern die Aktivität bleibt im alkalischen (bis pH 11) bis in den neutralen Bereich auf einem hohen Niveau (über 60 %). Unter einem pH-Wert von 6 ist EstCE nicht mehr aktiv. Auch die Esterase EstA3 zeigt ähnlich wie EstCE ein recht breites pH-Optimum im alkalischen bis neutralen Bereich, wobei sich das pH-Optimum bei pH 9 - 11 befindet. Als einzige der drei Esterasen besitzt EstA3 auch bei einem sauren pH-Wert von 5 eine signifikante Aktivität (etwa 20 %). Während also EstA3 und EstCE im alkalischen bis in den neutralen Bereich eine relativ hohe Aktivität zeigen, besitzt EstCL ein schmales pH-Optimum und ist nur bei pH 8 besonders aktiv.

3.4.7 Die drei Esterasen hydrolisieren verschiedene Substrate enantioselektiv

Zur Erweiterung des schon vorgestellten Substratspektrums der drei lipolytischen Enzyme EstCL, EstCE und EstA3 gegen Vinylester und Triglyceride verschiedener Kettenlängen (vgl. 3.4.3), wurden zusätzlich biotechnologisch relevante Substrate oder solche mit Modellcharakter auf eine hydrolytische und teilweise enantioselektive Aktivität hin geprüft. Die gereinigten Enzyme (Konzentration 2 µg) wurden für 24 Stunden bei einer Substratkonzentration von 10 mM bei Raumtemperatur inkubiert. Der pH Wert während des Aktivitätstests wurde hierbei auf pH 8 eingestellt, da bei diesem Wert alle drei Enzyme gute Aktivitäten gegen das Substrat Tributyrin zeigen (vgl. 3.4.6). Die Reaktion wurde anschließend durch die Extraktion der Substrate, bzw. freigesetzten Alkohole gestoppt. Die Umsetzung der Substrate wurde anschließend mittels Gaschromatographie analysiert. Anhand

der Peakflächen der Substrate und der freigesetzten Alkohole konnte der Umsatz ermittelt werden. Die Enantioselektivität der Enzyme konnte ebenfalls durch die Quantifizierung des Umsatzes enantiomerenreiner Substrate ((+)- und (-)-Menthylacetat) und durch die Verwendung einer chiralen GC-Säule bei der Spaltung von Racematen bestimmt und als *ee*-Wert (enantiomeric excess) berechnet werden. Bei der Umsetzung racemischer Substrate konnte allerdings in einigen Fällen nicht bestimmt werden, welches der beiden Enantiomere bevorzugt gespalten wird, da keine enantiomerenreinen Alkohole zur Kalibrierung zur Verfügung standen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 17: Bestimmung der Aktivitäten von EstCL, EstCE und EstA3 gegenüber racemischen oder enantiomerenreinen Substraten. Zur Bestimmung der Aktivität wurden etwa 2 µg der gereinigten Enzyme mit den verschiedenen Substraten für 24 h bei RT inkubiert. Nach dem Abbruch der Reaktion wurden die Umsetzungen durch eine gaschromatographische Analyse bestimmt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Messungen, wobei die Standardabweichung unter 10 % lag. Die Strukturen der einzelnen Verbindungen sind im Anhang dargestellt. E= Enantiomer.

Substrat	EstCL			EstCE			EstA3		
	Umsatz % pro 1. E	2. E	<i>ee</i> %	Umsatz % pro 1. E	2. E	<i>ee</i> %	Umsatz % pro 1. E	2. E	<i>ee</i> %
Acetatester v. (+/-)-1-Octin-3-ol	0	0	-	64	60	3	24	18	12
Acetatester v. cis-1,2-Cyclohexandiol	n. b.	n.b.	n.b.	100 ¹	100 ¹	0	0	0	-
Acetatester v. trans-1,2-Cyclohexandiol	n. b.	n.b.	n.b.	100	45	38	0	0	-
Acetatester v. Tetrahydronaphthylamin	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Acetatester v. Phenylethylamin	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Acetatester v. R-(+)-3-Chlor-1-Phenyl-1-Propanol	n. b.	n.b.	n.b.	100 ²		-	6 ²		-
Acetatester v. Trimethylsilylbutinol	n. b.	n.b.	n.b.	100 ²		-	45 ²		-
cis-3,5-Diacetoxy-1-Cyclopenten	100	0	> 99	12	59	66	24	0	> 99
Isopropylidenglycerinacetat (Rac)	0	35	> 99	100 ¹	100 ¹	0	0	0	-
Menthylacetat (1. Enantiomer (+), 2. E (-))	0	0	-	100	0	> 99	0	0	-

¹ Substratumsatz nach 12 h, ² hier konnte nur der Gesamtumsatz gemessen werden

Während EstCL den Essigsäureester von (+/-)-1-Octin-3-ol nicht umsetzt, werden beide Enantiomere des Esters von EstCE und EstA3 zu etwa 60 % bzw. 20 % umgesetzt. Beide Enzyme zeigen hierbei nur eine geringe Enantioselektivität. Die Essigsäureester der Diastereomeren von *cis*- und *trans*-1,2-Cyclohexandiol werden ausschließlich von EstCE umgesetzt. Hierbei wird jedoch nicht das jeweilige Diol gebildet, sondern es entstand in beiden Fällen nur monoacetyliertes 1,2-Cyclohexandiol. Dabei wird sowohl das (*R,R*), als auch das (*S,S*) Enantiomer des *cis*-Isomers auch schon bei Verkürzung der Inkubationszeit zu 100 % umgesetzt. Eine Enantioselektivität von 38 % *ee* zeigt EstCE dagegen bei der Hydrolyse des *trans*-Isomers, wobei das (*S,S*) Enantiomer bevorzugt gespalten wird. Die Essigsäureester von Phenylethylamin und Tetrahydronaphthylamin werden von keinem der drei Enzyme hydrolysiert. Die Essigsäureester von *R*-(+)-3-Chlor-1-Phenyl-1-Propanol und Trimethylsilylbutinol werden zu 100 % von EstCE umgesetzt, während EstA3 schwächere Aktivität gegenüber diesen Substraten zeigt (6 %, bzw. 45 %). Alle drei Enzyme setzen das Substrat *cis*-3,5-Diacetoxy-1-Cyclopenten um. EstCL und EstA3 sind dabei hoch selektiv (> 99 % *ee*). Bei EstCL ist eine Umsatzrate von 100 % zu beobachten, während EstA3 nur 24 % des Enantiomers in 24 h umsetzt. EstCE zeigt eine Enantioselektivität von 66 % gegenüber diesem Substrat, bevorzugt allerdings im Gegensatz zu den anderen beiden Enzymen das zweite Enantiomer. Isopropylenglycerinacetat wird von EstCL enantioselektiv hydrolysiert (> 99 % *ee*), bei einer Umsatzrate von 35 %. EstCE zeigt zwar keine Enantioselektivität gegenüber diesem Substrat, jedoch ist eine vollständige Umsetzung schon nach 12 h Inkubation zu beobachten. Das Modellsubstrat Menthylacetat wird nur von EstCE mit einem *ee*-Wert von > 99 % bei ausschließlicher Hydrolyse des (+) Enantiomers und gleichzeitigem hohen Umsatz von 100 % umgesetzt.

3.4.8 Enzym-Fingerprinting der Esterasen

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. J.-L. Reymond von der Universität Bern (Department of Chemistry and Biochemistry) wurden die drei Metagenomesterasen EstCL, EstCE und EstA3 mit einem so genannten enzymatischen Fingerprinting detaillierter charakterisiert (74). Hierbei wurden die gereinigten Enzyme in einer Einschritt-HPLC-Analyse auf die Hydrolyse von 20 enantiomerenreinen primären und sekundären Glykolestern untersucht. Die sekundären Ester (C3, C4, E3 und E4) behindern hierbei die enzymatische Spaltung sterisch, was die Aktivität gegenüber diesen Substraten erschwert. Die Ester lagen jeweils als (+) und (-) Isomer vor, so dass insgesamt 40 Substrate analysiert wurden (Abb. 25). Die Hydrolyse der Substrate wurde je nach Quantität des Umsatzes anhand eines

Farbcodes dokumentiert, was für jedes Enzym ein charakteristisches Muster ergab, die jeweils typischen enzymatischen Fingerprints (Abb. 26). Die Zuordnung der Substrate kann anhand der nummerierten Kästchen im Vergleich mit der bei den Strukturen der Substrate verwendeten Nummerierung ermittelt werden. Auf der linken Seite ist das Muster für die *R*-Enantiomere und rechts für die *S*-Enantiomere dargestellt. In Rot ist für jedes Enzym die höchste gemessene Umsatzrate wiedergegeben, welche auch auf der rechten Seite in Prozentwerten angegeben ist. Die Farbgebung der anderen Substratumsätze wurden in Abhängigkeit von diesem Wert als relative Einheiten angegeben. Die höchsten Umsätze der drei Esterasen liegen zwischen 78 und 89 %, wobei die Substrate in allen Fällen verschieden sind.

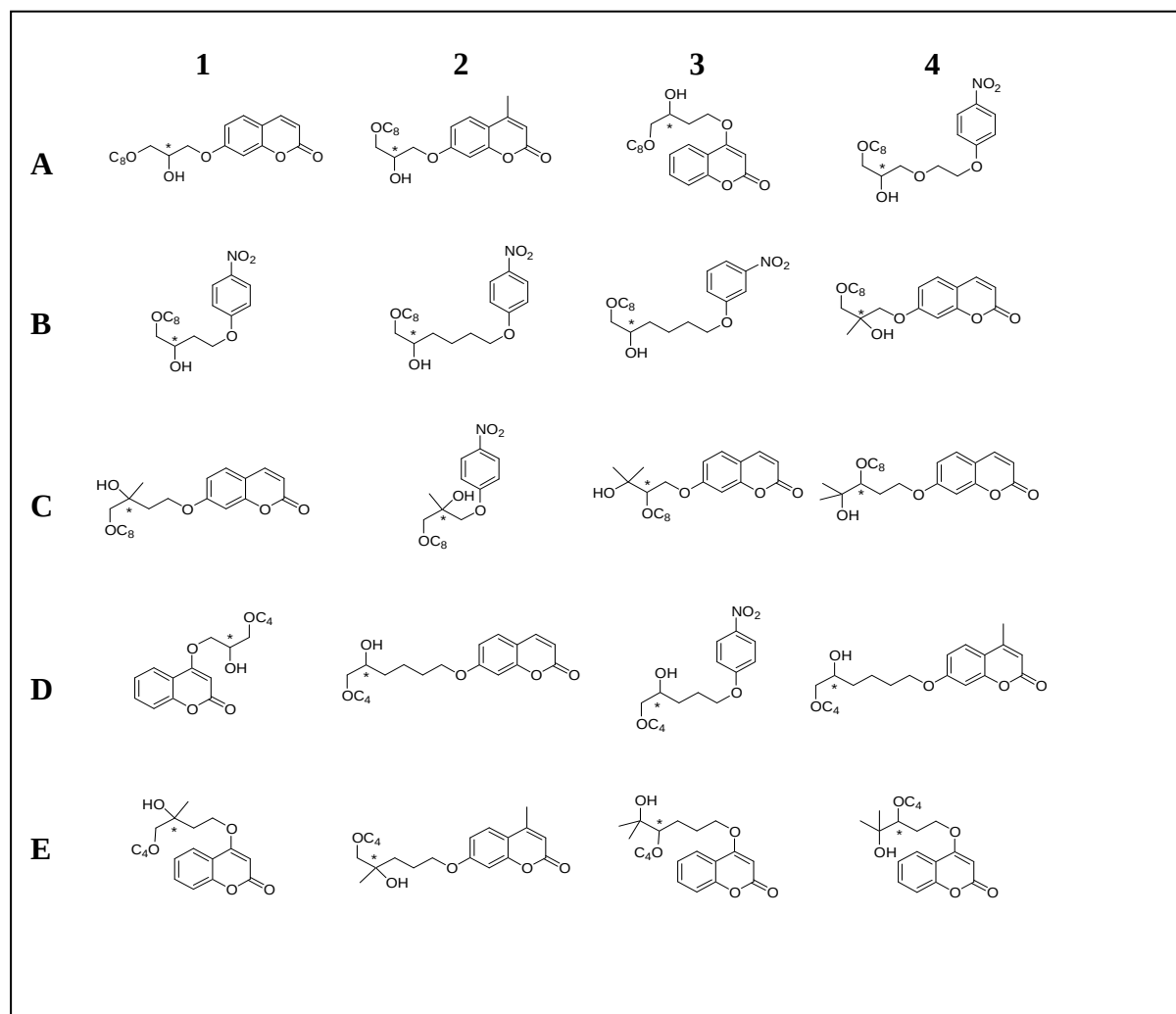


Abb. 25: Strukturen der zum enzymatischen Fingerprinting verwendeten Substrate. Bei den Substraten handelt es sich um primäre und sekundäre Glycolester, die in der Arbeitsgruppe von Prof. J. L. Reymond synthetisiert wurden.

Alle drei Esterasen spalten primäre Glycerolester mit der höchsten Effizienz, während sekundäre Glycerolester (Substrate C,E 3 und 4) nicht oder kaum umgesetzt werden. Anhand des Musters kann ebenfalls abgelesen werden, dass einige Substrate enantioselektiv umgesetzt werden, wie von EstCE und EstA3 das Substrat B4. Interessanterweise wird von EstCE fast ausschließlich das *S*-Enantiomer gespalten, wogegen EstA3 das *R*-Enantiomer bevorzugt. Die drei Enzyme können anhand dieses Substrat-Fingerprints eindeutig unterschieden werden, und es wird ebenfalls deutlich, dass sie trotz teilweise ähnlicher Strukturen (β -Lactamase Motiv von EstCE und EstA3) sehr spezifische Substratspektren besitzen.

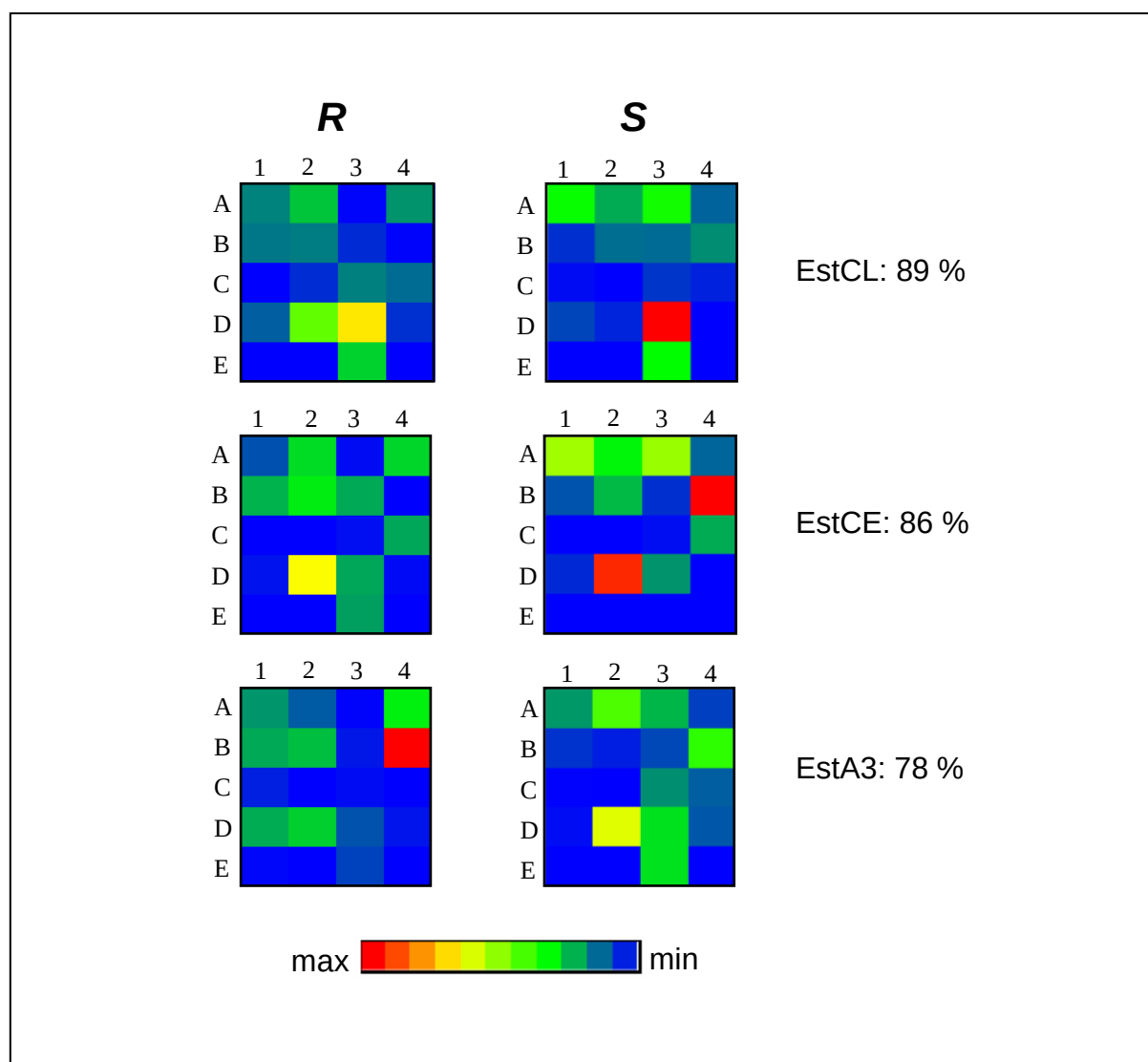


Abb. 26: Enzymatisches Fingerprinting der drei metagenomischen Esterasen EstCL, EstCE und EstA3. Die Aktivität der Enzyme gegenüber den in Abb. 25 mit derselben Nummerierung dargestellten Substrate wurde in einer „Ein Schritt HPLC-Analyse“ bestimmt und der jeweils höchste Umsatz ist in Prozent angegeben. Dieser Wert wurde nach dem Farbcodierung in Rot wiedergegeben. In Abhängigkeit von diesem Wert wurden die anderen Umsetzungen für jedes Enzym getrennt in das abgebildete Farbschema von Rot (maximale Aktivität) bis nach Blau (minimale Aktivität) eingeordnet.

Diese Spektren lassen sich auch mit anderen käuflichen und auch in der Industrie verwendeten Enzymen vergleichen. Die HPLC-Analyse wurde mit 35 lipolytischen Enzymen durchgeführt, die nicht nur bakteriellen, sondern auch eukaryotischen Ursprungs sind (74). Die Übereinstimmungen der jeweiligen Spektren können einander gegenübergestellt in einem Farbdigramm dargestellt werden (Abb. 27). Schwarze Kästchen stehen dabei für eine völlige Übereinstimmung des Spektrums, während bei abnehmender Ähnlichkeit die Farben über Rot und Gelb nach Weiß immer heller werden. Anhand der jeweiligen Ähnlichkeiten lassen sich mittels einer multivariablen Analysesoftware (frei über das Internet verfügbare Programme WINIDAMS: <http://www.unesco.org/idams> oder VISTA: <http://www.visualstats.org>) die einzelnen Enzyme zu Gruppen mit der besten Übereinstimmung zusammenfassen. So sind also Enzyme mit ähnlichem Substrat-Fingerprint in unmittelbarer Nähe zueinander angeordnet. Zwei Gruppierungen von Enzymen sind in der Tabelle markiert; die Esterasen sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet und die prokaryontischen, lipolytischen Enzyme sind in grüner Schrift dargestellt. Obwohl die Gruppierungen nicht in durchgängigen Clustern angeordnet sind, lässt sich trotzdem eine grobe Einteilung beobachten. Esterasen sind durchweg in der oberen Hälfte zu finden, während die prokaryontischen Enzyme vorwiegend in der unteren Hälfte angeordnet sind. Die Enzyme EstCE und EstA3 befinden sich beide im oberen Drittel im Umfeld von weiteren Esterasen. EstA3 zeigt ein ähnliches Substratspektrum wie beispielsweise die biotechnologisch interessante Schweineleberesterase (PLE1 und PLE2), während EstCE Ähnlichkeit zu einer Esterase aus *Candida antarctica* (CALA) aufweist. EstCL wird in der Gruppe der prokaryontischen Enzyme eingeordnet und besitzt ausschließlich signifikante Ähnlichkeit zum Spektrum einer Esterase aus *Pseudomonas spec.* (PSL), während Ähnlichkeiten zu anderen Enzymen sehr gering sind. Dieses enzymatische Fingerprinting zeigte und bestätigte, dass es sich bei den drei Enzymen EstCL, EstCE und EstA3 um voneinander unterschiedliche, neue Biokatalysatoren mit bisher unbekanntem Substratspektrum handelt.

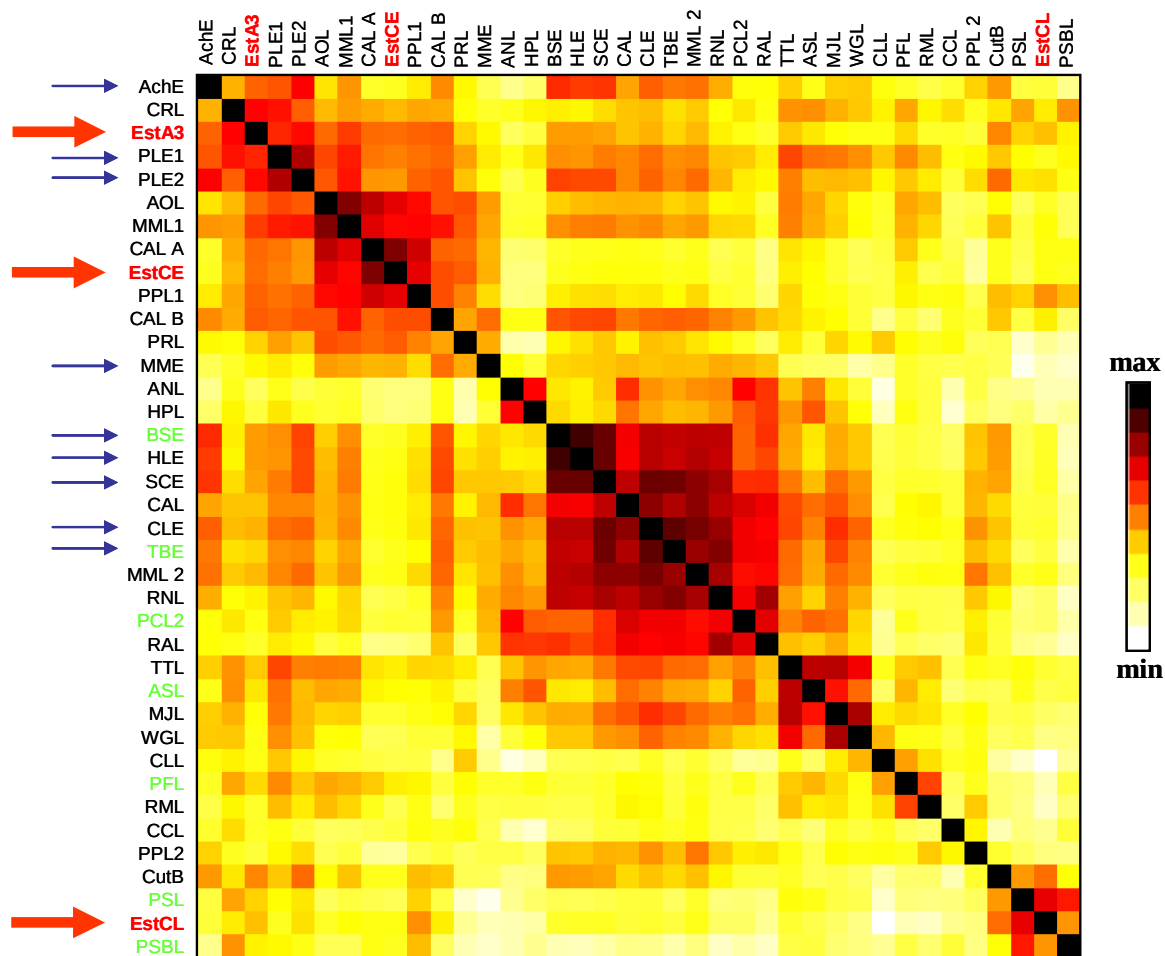


Abb. 27: Die Ergebnisse der enzymatischen Fingerprints der drei metagenomischen Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 im Vergleich mit den Spektren von 35 weiteren lipolytischen Enzymen. Die drei metagenomischen Esterasen sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Als Esterasen klassifizierte Enzyme sind mit blauen Pfeilen markiert, Enzyme prokaryontischen Ursprungs sind in grüner Schrift dargestellt. Nähere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Die Abkürzungen bezeichnen folgende Enzyme: **CAL B** *Candida antarctica* lipase fraction B (Chirazyme L-2), **PSL** *Pseudomonas* sp. lipase (Chirazyme L-6), **CRL** *Candida rugosa* lipase (Chirazyme L-3), **AOL** *Aspergillus oryzae* lipase (F-62285), **CAL A** *Candida antarctica* lipase fraction A (Chirazyme L-5), **PLE1** *Pig liver* esterase fraction 1 (Chirazyme E-1), **PPL1** *Porcine pancreas* lipase (Chirazyme L-7), **PLE2** *Pig liver* esterase fraction 2 (Chirazyme E-2), **TTL** *Thermomyces lanuginosa* lipase (Chirazyme L-8), **ASL** *Alcaligenes* sp. lipase (Chirazyme L-10), **CAL** *Candida antarctica* lipase (F-62299), **ANL** *Aspergillus niger* lipase (F-62294), **RML** *Rhizomucor miehei* lipase (F-62291), **WGL** *Wheat germ* lipase (F-62306), **MML1** *Mucor miehei* lipase (F-62298), **MML2** *Mucor miehei* lipase (Chirazyme L-9), **RAL** *Rhizopus arrhizus* lipase (F-62305), **SCE** *Saccharomyces cerevisiae* esterase (F-46071), **CLE** *Candida lipolytica* esterase (F-46056), **BSE** *Bacillus* sp. esterase (F-46062), **PCL2** *Pseudomonas cepacia* lipase fraction 2 (F-62309), **MME** *Mucor miehei* esterase (F-46059), **PFL** *Pseudomonas fluorescens* lipase (F-62321), **AchE** Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (C-2629), **HLE** Horse liver esterase (F-46 069), **CCL** *Candida cylindracea* lipase (F-62316), **Cut B** Cutinase B **RNL** *Rhizopus niveus* lipase (F-62310), **PSBL** *Pseudomonas* sp. B lipoprotein lipase (F-62336), **PRL** *Penicillium roqueforti* lipase (F-62308), **CLL** *Candida lipolytica* lipase (F-62303), **PPL2** *Porcine pancreas* lipase (F-62278), **TBE** *Thermoanaerobium brockii* esterase (F-46061), **HPL** Hog pancreatic lipase (F-62300), **MJL** *Mucor javanicus* lipase (F-62304); Chirazyme Enzyme wurden von Roche, F- markierte Enzyme von Fluka und AchE von Sigma bezogen.

Die drei metagenomischen Enzyme EstCL, EstCE und EstA3 konnten kloniert, überexprimiert und gereinigt werden. Die biochemische Charakterisierung der Enzyme zeigt, dass sie kurzkettige Triglyceride und Vinylester bevorzugen und nicht interphasenaktivierbar sind. Demnach handelt es sich bei allen drei Enzymen um Esterasen. Sie zeigen die höchste Aktivität im neutralen bis alkalischen pH Bereich und sind bei diesen pH-Werten auch am stabilsten. Alle drei Esterasen zeigen sich gegenüber verschiedenen Substraten enantioselektiv bei teilweise hohen Umsätzen. Ein enzymatisches Fingerprinting bestätigt, dass es sich um neue, unterschiedliche Enzyme handelt, die Ähnlichkeit zu biotechnologisch interessanten Enzymen aufweisen.

4 Diskussion

Neben der roten (medizinischen) und der grünen (pflanzlichen) Biotechnologie kann die weiße oder auch industrielle Biotechnologie chronologisch betrachtet als die dritte Welle der Biotechnologie angesehen werden (162). Ganz allgemein versteht man unter dem Terminus weiße Biotechnologie den Einsatz von Biokatalysatoren (z.B. Enzyme oder ganze Zellen) zur Herstellung industrieller Erzeugnisse (59). Die chemische Industrie greift zunehmend auf neue biotechnologische Verfahren zur Herstellung verschiedenster Produkte zurück, so dass Schätzungen zur Folge derzeit etwa 5 % der chemischen Produkte durch die Involvierung eines oder mehrerer biokatalytischer Schritte hergestellt werden (63, 194). Nach einer Studie der Beratungsagentur McKinsey könnten allerdings 60 % aller Feinchemikalien mit Hilfe biotechnologischer Verfahren produziert werden (141). Ein limitierender Faktor könnte hierbei die Verfügbarkeit an neuen Biokatalysatoren sein, welche für die jeweiligen Umsetzungen geeignet sind (177). Deswegen ist die Nachfrage nach neuen Biokatalysatoren in den letzten Jahren enorm gestiegen (180). Etwa gleichzeitig mit dieser Entwicklung machte ein neues, junges Forschungsfeld auf sich aufmerksam: „der Metagenomansatz“. Dieser Forschungszweig untersucht, bzw. nutzt die bisher nicht unter Laborbedingungen kultivierbaren Mikroorganismen, welche etwa 99 % der Gesamtheit ausmachen, unter Umgehung der Anzucht im Labor (4). Da beispielsweise in einem Gramm einer Bodenprobe die enorme Anzahl von 2000 bis 18.000 verschiedene mikrobielle Spezies zu finden sind (50, 199-201), ist somit auch das biotechnologische Potential nahezu unerschöpflich. Im Rahmen dieser Arbeit und in Kooperation innerhalb des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Netzwerkes „GenoMiks“ (Göttingen, Projekt 4.3: Umweltgenomik als Ressource für neue Biokatalysatoren, Stoffwechselwege und Wirkstoffe) sollten neue Wege zur Nutzung dieses biotechnologischen Potentials erschlossen werden. Hierzu sollten (a) Screeningsysteme für innerhalb des Projekts konstruierte Metagenom-Bibliotheken etabliert bzw. neu entwickelt werden, (b) ein auf der DNA-Array Technik basierendes Hybridisierungssystem erstellt werden, (c) die Screeningeffizienz von Metagenombibliotheken durch die Anwendung eines Expressions-Transposons erhöht werden und (d) neu identifizierte Biokatalysatoren biochemisch charakterisiert werden.

4.1 Identifizierung von Biokatalysatoren durch Aktivitäts-Screening

4.1.1 Konstruktion von Metagenombibliotheken

Die Isolierung und die anschließende Klonierung von Umwelt-DNA aus verschiedenen Habitaten zur Konstruktion von Metagenombibliotheken stand zunächst im Vordergrund der im Rahmen des Projekts durchgeführten Arbeiten. In der neueren Zeit wurde eine Vielzahl an neuen Methoden zur Isolierung von metagenomischer DNA publiziert, wobei es bei der Wahl der Methode auf die Beschaffenheit des Habitats, die weitere Vorgehensweise nach der Isolierung sowie die gewünschte Fragmentgröße der gereinigten DNA ankommt (Übersicht in (165)). Um eine hohe Diversität zu garantieren, wurden in dieser Arbeit Metagenombibliotheken aus verschiedensten Habitaten genutzt, um in diesen nach neuen Biokatalysatoren zu suchen. Dabei handelte es sich um fünf Banken aus verschiedenen Biofilmen sowie sieben Banken aus unterschiedlichen Bodenproben. Alle DNA-Isolierungen wurden nach der so genannten *in situ* Methode durchgeführt, bei der die Mikroorganismen direkt lysiert werden, ohne die Zellen vorher, wie bei der so genannten *ex situ* Methode, zuerst von der Matrix (z.B. Bodenpartikel, Sandkörner, etc.) zu trennen. Erst anschließend wurde die DNA von Kontaminationen und auch Zelltrümmern befreit, wie erstmals 1987 von Ogram *et al.* gezeigt wurde (146). Die Ausbeute an isolierter DNA ist nach dieser Methode 10 - 100 mal so hoch wie mit der *ex situ* Methode (71). Auch der Arbeits- und Zeitaufwand ist bei der direkten Lyse geringer als bei der vorherigen Separation der Zellen. Der Vorteil der *ex situ* Methode liegt in der höheren Reinheit und der größeren Fragmentlänge der isolierten DNA (37). Deswegen wird bei der Konstruktion von Metagenombibliotheken mit Insertgrößen über 40 kb eher die *ex situ* Methode verwendet (163). Für die Konstruktion von Cosmid- oder Plasmidbibliotheken ist die unkompliziertere Methode der direkten Lysis sinnvoller und wurde bei den hier produzierten bzw. zur Verfügung gestellten Metagenombibliotheken verwendet. Dabei lag im Projekt eine Arbeitsteilung vor, so dass im Rahmen dieser Arbeit zunächst nur bei der Konstruktion der Bank des Trinkwasserbiofilms I (TWB I) mitgearbeitet wurde und eine Cosmid-Bank hergestellt wurde (Bochum-Boden, 600 Klone, s. Abb. 7, Tab. 10). Die Biofilme TWB III und das agarolytische Konsortium wurden durch die AG Streit auch von der ökologischen Seite her untersucht, was aber durchaus auch Rückschlüsse auf die Screeningeffizienz zulässt. Durch 16S rRNA Analyse wurde die bakterielle Zusammensetzung der beiden Biofilme analysiert (176, 208) und es konnten 81 verschiedene Bakterienspezies detektiert werden, die aus sehr diversen Familien stammen (Abb. 28). Da es sich hierbei um Organismen handelte, die in unserem Trinkwasser leben oder zumindest damit in Berührung kommen, war es besonders bemerkenswert, dass keine pathogenen

Bakterien oder solche, die eine nähere Verwandtschaft zu diesen besitzen, detektiert wurden. Neben schon in früheren Arbeiten detektierten typischen bakteriellen Vertretern in Frischwasserbiofilmen (196), wurden interessanterweise viele der Klone als nahe Verwandte der Rhizobien, die zu den α -Proteobakterien gehören, identifiziert (175, 176). Diese sonst zur Stickstoff-Fixierung mit Leguminosen in Symbiose lebenden so genannten Knöllchen-Bakterien könnten also eine Rolle bei der Bereitstellung von Stickstoff in dem nährstoffarmen Milieu für den Biofilm spielen. Der Trinkwasserbiofilm wurde also aus zwei Gründen ausgewählt, zum einen, weil die Identifizierung der Bakterien im Trinkwasser von gesellschaftlichem Interesse ist und zum anderen weil es sich um ein nährstoffarmes Habitat handelt. Es wurde also erwartet, dass Mikroorganismen des Biofilms in der Lage sind, die wenigen Nährstoffe in diesem oligotrophen Lebensraum effizient zu nutzen. Dazu müssten sie über ein breites Repertoire an Biokatalysatoren verfügen und die Effizienz des Screenings sollte somit hoch sein. Tatsächlich wurden allein in der Bank III des Trinkwasserbiofilms (1700 Klone) 5 lipolytisch aktive Klone entdeckt, von denen zwei (EstA3 und EstCL) auch im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert wurden. In früheren Arbeiten wurden in einer aus Bodenproben hergestellten Metagenombibliothek von etwa 286.000 Klonen hingegen nur drei lipolytisch aktive Klone identifiziert (87). Es könnte also durchaus zutreffen, dass die Isolierung von metagenomischer DNA aus nährstoffarmen Habitaten die Ausbeute des Screenings nach neuen Biokatalysatoren erhöht.

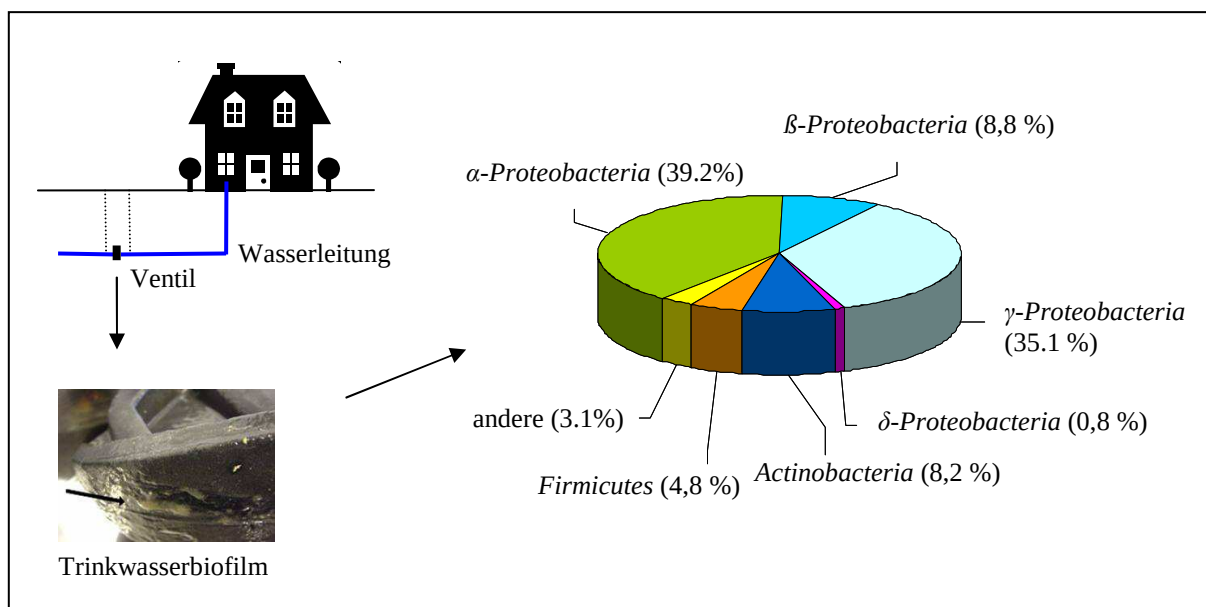


Abb. 28: Herkunft und mikrobielle Zusammensetzung des Trinkwasserbiofilms. Der Biofilm stammt von einem mit Kunststoff (PVDM) beschichteten Schieber (Ventil) aus einer Trinkwasserleitung in Duisburg. Die mikrobielle Zusammensetzung des Konsortiums wurde durch 16S rRNA Analyse aufgeklärt (modifiziert nach (176)).

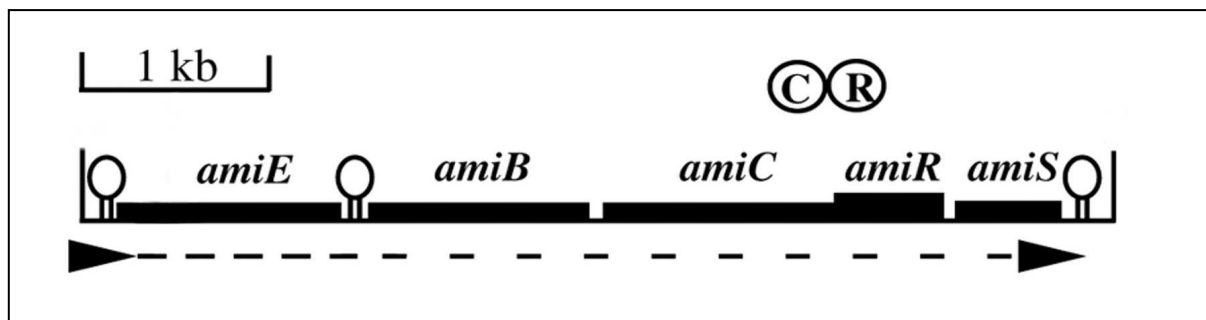
Die Analyse nach einer Anreicherung von Göttinger Bodenproben auf Agarplatten (agarolytisches Konsortium) ergab eine weniger vielfältige Bakterienpopulation. Nur fünf verschiedene Bakterienarten wurden nach 16S rRNA Analyse detektiert, welche eine nahe Verwandtschaft zu *Pseudomonas putida*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Janthinobacterium lividum* und *Microbulbifer degradans* aufwiesen (208). Da normalerweise in Bodenproben mit dem Metagenomansatz mindestens 2000 verschiedene Bakterienarten identifiziert werden (50, 199-201), verdeutlicht dieses Beispiel eindrucksvoll die Bedeutung der direkten DNA-Isolationsmethode: Wahrscheinlich wurden durch die Anreicherung weniger als 0,5 % der tatsächlich vorhandenen Mikroorganismen isoliert. Trotzdem wurden in der nur etwa 1500 Klone umfassenden Metagenombibliothek sechs Agarasen und andere biotechnologisch interessante, funktionale Gene identifiziert. Neben der unkomplizierten Isolierung der DNA spricht ebenfalls die hohe Screening-Effizienz für eine Anreicherung aus Bodenproben, wenn gezielt nach bestimmten Enzymklassen, wie hier die Agarasen, gesucht wird (208). Insgesamt standen zum Screening 14 Metagenombibliotheken aus unterschiedlichsten Habitaten mit einem geschätzten metagenomischen DNA -Gehalt von 760 Megabasen zur Verfügung, die eine große Bandbreite verschiedenster Eigenschaften versprachen.

4.1.2 Screening von Metagenombibliotheken und Entwicklung eines Selektionssystems

Um Klone mit den jeweils gesuchten Eigenschaften in Metagenombibliotheken zu identifizieren, musste eine große Zahl rekombinanter Bakterien untersucht werden. Deshalb eignen sich zum Aktivitätsscreening von Metagenombanken ausschließlich Methoden, die einen hohen Durchsatz erlauben (133). Dazu zählen beispielsweise einfache Agar- oder Mikrotiterplattenassays und Selektionssysteme. Besonders erfolgversprechend sind hierbei Selektionssysteme, da nur Klone wachsen können, die über die gewünschte Eigenschaft verfügen. Das ermöglicht auch ein Screening von „Pools“ der Metagenombibliotheken, also einer Mischung aus etwa 100 - 2000 Klonen, da aktive Klone leicht zu detektieren sind. Zum einen wurden deshalb bewährte Screeningsysteme wie Esterase- bzw. Lipaseassays (118, 119) und Dehydrogenaseassays (62) für das Metagenomscreening angepasst, zum anderen wurde ein neues Selektionssystem zur Identifizierung von Amidasen entwickelt. Zur Erprobung wurde die Amidase AmiE aus *P. aeruginosa* ausgewählt, welche erstmals 1962 erwähnt und charakterisiert wurde (109). Diese wurde kloniert und im heterologen Wirt *E. coli* überexprimiert, um anschließend verschiedene Selektionsmedien zu testen. Die Überexpression unter der Kontrolle des starken T7-Promotors wurde durch SDS-PAGE

Analyse überprüft und die Menge an produzierter, löslicher Amidase im Gel abgeschätzt. Die Aktivität gegenüber dem Substrat Propionamid wurde durch RP-HPLC bestimmt und liegt bei etwa 400 U pro Milligramm Amidase im durch Ultraschall aufgeschlossenen Zellextrakt. Dieser Wert entspricht der Aktivität des von SIGMA-ALDRICH vertriebenen Enzyms. Das rekombinante Enzym wird demnach in *E. coli* in aktiver Form exprimiert und benötigt weder spezielle Faltungshelfer, noch wirtsspezifische posttranslationale Modifikationen. Der rekombinante, AmiE exprimierende *E. coli* Stamm diente nun zur Entwicklung des Selektionsmediums. Das bei der Umsetzung des Amids entstehende Ammonium sollte als alleinige Stickstoff- und die produzierte Säure als Kohlenstoffquelle dienen. Es sollten zum einen also nur aktive Klone wachsen (Trübung des Mediums) und durch die Entstehung der Säure sollte eine zusätzliche optische Kontrolle durch Detektion des pH-Shifts unter Einsatz eines Indikators möglich sein. Wie in Abb. 10 (Kap. 3.1.2) zu sehen ist, konnten nur rekombinante *E. coli* Stämme mit exprimierter Amidase bei Zugabe von Glukose wachsen und zeigten auch den erwarteten Farbumschlag. Propionsäure kann *E. coli* demnach nicht als alleinige Kohlenstoffquelle dienen. Weiterhin spielte es keine Rolle, ob die AmiE-Überexpressionskulturen induziert wurden, was zeigt, dass AmiE schon bei der basalen Expression des Systems in einer ausreichenden Menge in *E. coli* produziert wird. Das Selektionsmedium war also zur Detektion von Amidasen in Metagenombibliotheken geeignet.

Allerdings wuchs der rekombinante *E. coli* Stamm im Vergleich zu *P. aeruginosa* langsamer im Amidase-Selektionsmedium und erreichte auch nicht so hohe Zelldichten. Ein Grund für diese Beobachtung könnte der fehlende Transport des Amids in die Zelle oder der entstehenden, möglicherweise toxischen Säure aus der Zelle sein. Das Amidasegen *amiE* ist in einem Operon mit zwei regulatorischen Genen *amiR* und *amiC*, sowie zwei weiteren Genen *amiB* und *amiS* kodiert (Abb. 29). Die Transkription des Operons wird durch verschiedene Amide, wie auch Propionamid, induziert. Hierbei fungiert AmiC als Sensorligand und AmiR als Transkriptions-Antiterminationsfaktor, so dass nur ein Transkript entsteht, wenn AmiC und AmiR nicht interagieren und AmiR an die mRNA „leader“ Sequenz bindet (143). Die beiden Gene *amiB* und *amiS* weisen dagegen Homologien zu Transportproteinen auf und spielen keine Rolle bei der Regulation des Operons (51, 215). Um das Screeningsystem weiter zu optimieren und um zu bestimmen, ob die Gene *amiB* und *amiS* tatsächlich Amid-Transport Proteine kodieren, wurde das Operon *amiBCRS* in verschiedene Überexpressionsvektoren kloniert, um es mit der Amidase AmiE und beim später angestrebten Screening zusätzlich zu exprimieren. Trotz der Co-Expression des *amiBCRS* Operons zusätzlich zum Amidasegen



Es ist also durchaus möglich, dass die Proteine AmiBCRS in keinem Fall exprimiert wurden. Es kann ebenso sein, dass es sich bei den beiden Proteinen AmiB und AmiS um Transporter zur Entsorgung der bei der Reaktion entstehenden Säure handelt. Dafür spricht, dass bei der Co-Expression des Transporters in *E. coli* das Medium schneller angesäuert wurde (Abb. 11, Kap. 3.1.2). Hierdurch wurde auch das Selektionssystem sensibler und positive Klone könnten schneller erkannt werden. Wegen des nicht mit Sicherheit bestimmbaren Effekts und erhöhten Aufwandes der Co-Expression wurde dann jedoch beim Screening darauf verzichtet. In Kooperation mit dem Arbeitskreis Reetz (Max-Planck Institut für Kohlenforschung, Mülheim a.d. Ruhr) wurden die aus biotechnologischer Sicht interessanten Verbindungen Malonamid und Benzamid zur Durchmusterung der Metagenombibliotheken ausgewählt. Erst 2003 wurde von einer enantioselektiven Umsetzung von Malonamid durch *Rhodococcus* spec. CGMCC 0497 berichtet (219). Produkte dieser Reaktion können bei der Herstellung enantiomerenreiner α - α -dialkylierter- α -Aminosäuren dienen. Diese nicht proteinogenen Aminosäuren spielen als Enzyminhibitoren oder bei der Herstellung von Feinchemikalien eine wichtige Rolle und sind biotechnologisch relevant (34). Jedoch konnte bei der Durchmusterung aller zur Verfügung stehenden Metagenombanken kein aktiver Klon identifiziert werden. Dabei liegt es durchaus im Bereich des Möglichen, dass bei einer Anzahl

von etwa 38.000 im Rahmen dieser Arbeit durchmusterten Klone, kein rekombinanter *E. coli* die gesuchte Aktivität zeigte. Denn es wurde schon von sehr viel geringeren Ausbeuten an aktiven Klonen berichtet, auch wenn es sich um andere gesuchte Eigenschaften handelte, die nur bedingt verglichen werden können. So wurden bei einem Screening von einer Metagenombibliothek mit fast 1,5 Millionen Klonen nur zwei Klone identifiziert, welche die gesuchten Na^+/H^+ Antiporter kodierten (138). Im Vergleich hierzu fanden sich bei einer weitaus kleineren Anzahl von 2100 untersuchten Klonen 38 rekombinante *E. coli*, welche Glukosedehydrogenase-Aktivität zeigten. Jedoch ist dieses Enzym bei Bakterien obligat, die den Entner-Doudoroff oder Variationen dieses Weges zur Energiegewinnung nutzen. Hierbei wird Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat umgesetzt, wobei NADPH gebildet wird (68). Die hohe Anzahl an positiven Klonen spricht für eine große Anzahl an Bakterien in dem Habitat der entsprechenden Metagenombibliothek (Bodenprobe aus Kamtschatka, Russland), die diesen Weg der Zuckerverwertung benutzen. Die Proteine dieser Enzymklasse sind von biotechnologischem Wert, da sie bei der Cofaktor-Regenerierung von NADP bei diversen Reaktionen eingesetzt werden können (113). Ebenso verhält es sich mit der biotechnologischen Relevanz der anderen Dehydrogenasen (LeuDH, ADH und FDH), die jedoch viel seltener vorkommen (92). Von diesen Enzymen wurden bei einer ähnlichen Anzahl von durchmusterten Metagenomklonen jeweils nur eines detektiert. Alle neuen Enzyme dieser Klassen sollen durch die Arbeitsgruppe von Prof. W. Hummel (Universität Düsseldorf) eingehender charakterisiert und auf die Eignung zur Regenerierung der Cofaktoren NAD und NADP untersucht werden. Bei der Durchmusterung der Metagenombibliotheken nach Klonen mit lipolytischer Aktivität wurden in Zusammenarbeit mit der AG Streit (Universität Duisburg-Essen) insgesamt 15 verschiedene Enzyme identifiziert. Diese stammten aus nur vier verschiedenen Metagenom-Banken (Trinkwasserbiofilm III, Diesel-Wasser Biofilm, Öl-kontaminierter Boden und agarolytisches Konsortium) mit insgesamt etwa 7000 Klonen. Die Ausbeute an lipolytisch aktiven Klonen ist im Vergleich zu einer anderen vergleichbaren Arbeit extrem hoch: In einer Bank von 286.000 Klonen wurden nur drei Klone mit Aktivität gegen das Substrat Tributyrin detektiert (87). Daher stellte sich die Frage, welche Ursache diese hohe Effizienz haben könnte. Bei den Ursprüngen aller vier Banken handelte es sich um spezielle Habitate (Trinkwasser, Diesel, Öl-kontaminierter Boden, Agar), in welchen die jeweiligen Mikroorganismen ein großes Enzymrepertoire zum Überleben aufweisen müssen, da die Nährstoffquellen sehr stark beschränkt sind oder sogar für viele Organismen toxisch sein könnten (Öl, Diesel). Das ist ein Hinweis darauf, dass oligotrophe Habitate ein besonders ergiebiges Untersuchungsobjekt zur

Isolierung von Biokatalysatoren aus dem Metagenom sein können. Trotzdem war die Ausbeute an identifizierten neuen Biokatalysatoren mit den einfachen Screeningsystemen nicht hoch (Ausnahme sind sehr häufig vorkommende Enzyme wie die Glukose-Dehydrogenase). Zu oft werden Gene vom heterologen Wirt *E. coli* nicht in aktive Proteine umgesetzt und wurden somit auch nicht detektiert (vgl. Tabelle 2, Kap. 1.3). Deswegen sind Verbesserungen der Screeningeffizienz nötig, um das biotechnologische Potential des Metagenomansatzes besser zu nutzen. Verschiedene Ansätze wurden schon erfolgreich angewendet. Beispielsweise wurden Isotopen-markierte Substrate zur Anreicherung einer Bodenprobe eingesetzt, um dann die metagenomische DNA zu isolieren. Anschließend konnte die schwere DNA von der leichten DNA durch Ultrazentrifugation getrennt werden. Die schwere DNA enthielt die genomische DNA der Organismen, welche für den Abbau des Substrats verantwortlich waren und es konnten verschiedene Enzyme der gesuchten Klassen identifiziert werden (152, 153, 212). Erst in diesem Jahr wurde die Methode der sogenannten „Substrat induzierten Gen-Expressionsklonierung“ (SIGEX) veröffentlicht (204). Hierbei kann die Substrat-Induktion eines Operons ausgenutzt werden, um dieses komplett aus dem Metagenom zu isolieren. Hierbei wird metagenomische DNA stromaufwärts eines promotorlosen *gfp*-Gens (grün fluoreszierendes Protein) kloniert. Die Expression nach der Induktion mit einem bestimmten Substrat, wie es von Uchiyama *et al.* mit aromatischen Kohlenwasserstoffen gezeigt wurde (204), deutet auf eine Transkription eines Operons mit den gesuchten Eigenschaften hin. Ein besonderer Vorteil liegt dabei in der Möglichkeit, die fluoreszierenden Zellen automatisch durch ein FACS-Gerät („fluorescens activated cell sorter“) von anderen Klonen der Metagenombank zu trennen. Auch im Rahmen dieser Arbeit sollten neue, innovative Systeme zur effizienteren Nutzung des Metagenoms entwickelt werden. Zum einen sollte ein sequenzbasierter Ansatz unter Nutzung der Array-Technologie etabliert werden (s. 3.2), andererseits die Expression von Genen in Metagenombibliotheken erhöht werden (s. 3.3).

4.2 Identifizierung von Biokatalysatoren durch Sequenz-basiertes Screening

Um ein Aktivitäts-Screening zu umgehen, sollte eine Methode etabliert werden, die eine Sequenz-abhängige Durchmusterung der isolierten metagenomischen DNA oder von Metagenombibliotheken ermöglicht. Verschiedene Ansätze und Methoden sind in neuerer Zeit zu diesem Thema publiziert worden. Beispielsweise wurden Sequenzierungen im großen Stil durchgeführt, die eine enorme Zahl an neuen Genen und potentiell nutzbaren

Biokatalysatoren erschlossen, wie das Beispiel der Sargasso-See zeigte (206). Doch ist diese Methode unselektiv und setzt außerdem das nötige Kapital und technische Gerät voraus. Eine elegantere Methode zur Sequenz-abhängigen Identifizierung von Biokatalysatorgenen ist der Einsatz von Signatursequenzen zur Amplifikation mittels PCR. Von mindestens zwei konservierten Bereichen der Sequenzen werden die Signatursequenzen einer bestimmten Enzymklasse abgeleitet und dienen der Konstruktion von degenerierten Primern, mit denen Teile von metagenomischen Genen amplifiziert werden können. Das Vollängen- Produkt wird dann durch ein „primer-walking“ in weiteren Sequenzierungen ermittelt. So konnten bereits neue Lipasen und Nitrilhydratasen durch verschiedene Arbeitsgruppen identifiziert werden (16, 129).

Innerhalb dieses Projekts sollte begonnen werden, die Grundlagen dafür zu schaffen, interessante neue Biokatalysatoren über DNA-Microarrays zu identifizieren. Ähnlich wie bei der oben beschriebenen PCR-Methode sollten auch hier Signatursequenzen der konservierten Bereiche von den zu suchenden Genen abgeleitet werden. Als konkrete Anwendung dieser allgemeinen Idee wurden in dieser Arbeit Lipasen als Modellenzyme verwendet. Der Vorteil bei der Nutzung von DNA-Microarrays im Vergleich zu der oben beschriebenen PCR-Methode liegt besonders darin, dass eine weit höhere Zahl an verschiedenen Sequenzmotiven über die DNA-Microarray Technologie getestet werden kann, da auf ein einziges DNA-Microarray je nach verwendeter Spotter-Technologie bis zu einige zehntausend Proben aufgebracht werden können. Derartig komplexe Primer-Gemische wären aus verschiedenen Gründen für eine direkte PCR nicht verwendbar. Darüber hinaus sind eine bessere Automatisierung, geringeres Hintergrundrauschen, schnellere („real time“) Detektion und geringere Kosten mit dieser Methodik verbunden (184). Weiterhin könnten, diesem neuen Gedankengang folgend, die DNA-Microarrays dazu verwendet werden, sinnvolle Primer für eine Amplifikation der gesuchten Gene aus metagenomischer DNA zu identifizieren. Dafür sind mehrere Vorgehensweisen denkbar: So könnten etwa zwei komplementäre Primer entsprechend der auf dem DNA-Microarray aufgetragenen Probe verwendet werden. Als Gegenprimer verwendet man zum Beispiel die Standardprimer des für die Erstellung der Bibliothek verwendeten Vektors. Es wäre auch denkbar, durch PCR von metagenomischer DNA mit entsprechenden degenerierten Primern Zielsequenzen für Gegenprimer einzuführen und so einen biologischen Klonierungsschritt mit den immer auftretenden selektiven Effekten ganz zu umgehen. Anhand der über das DNA-Microarray identifizierten Primer, kann so eine Amplifikation von interessanten Genen vorgenommen werden. Im Bereich der „Metagenomics“ sind zwar schon DNA-Arrays eingesetzt worden, aber in allen publizierten

Arbeiten wurde diese Methode genutzt, um die mikrobielle Ökologie, d.h. die Zusammensetzung der Organismen eines bestimmten Habitats, zu untersuchen (32, 43, 182, 218, 223). Darüber hinaus wurden nur in einem Fall Oligonukleotide mit einer Länge von 45 - 70 bp eingesetzt (43). Die Identifizierung und Isolierung von Biokatalysatorgenen aus dem Metagenom durch die Array-Technologie mit Hilfe von kurzen Signatursequenzen (18 - 21 bp Oligonukleotide) ist also ein völlig neuer Ansatz der biotechnologischen Nutzung von genomischer DNA aus bisher unkultivierten Bakterien.

Zunächst wurde ein Testsystem entwickelt, um (a) ein Protokoll für die Ankopplung von Oligonukleotiden an Microarray-Glasträger zu etablieren, (b) definierte Bedingungen durch Verwendung von genomischer DNA bereits sequenzierter Bakterien statt metagenomischer DNA zu schaffen, (c) Schwellenwerte der Detektion durch Reduktion der Identitäten bei den Signatursequenzen zu ermitteln, (d) Fehlhybridisierungen durch den Einsatz von Kontrollsequenzen, welche keine signifikante Identität zur genomischen DNA zeigten, auszuschließen. Die vier Bakterienstämme *E. coli* K-12 (GC-Gehalt: 51 %, Genomgröße: 4,6 Mb), *P. aeruginosa* PAO1 (66 % / 6,3 Mb), *C. glutamicum* ATCC 13032 (54 % / 3,3 Mb) und *A. tumefaciens* C58 (59 % / 5,7 Mb) wurden zur Validierung der Hybridisierung ausgewählt, da zum einen der Zugriff auf die Sequenzen zum Homologievergleich möglich war (18, 75, 103, 188), zum anderen, da sie sehr unterschiedliche GC-Gehalte (51 - 66 %) und Genomgrößen (3,3 - 6,3 Mb) besaßen. Der GC-Gehalt und die Genomgröße könnten einen signifikanten Einfluss auf die Intensität der Hybridisierung haben.

Eine reproduzierbare Immobilisierung von unmodifizierten Oligonukleotiden auf verschiedenen Glasträgern gelang nur unvollständig. Die Signatursequenzen waren nach einem Test-Hybridisierungslauf fast vollständig abgewaschen. Selbst die 50 bp langen Oligonukleotide wurden schlecht an die Glasoberfläche gekoppelt. Bessere Ergebnisse versprach die Nutzung von modifizierten Oligonukleotiden, wie es auch schon in der Literatur beschrieben wurde (43, 131). Die kovalente Bindung (Schiff-Base) von 5'-Amino-modifizierten Oligonukleotiden an immobilisierte Aldehydgruppen der Oberfläche lieferte dann gute, reproduzierbare Ergebnisse (Tab. 13, Abb. 14, Kap. 3.2.3). Ein weiterer entscheidender Faktor bei der Funktionalität eines Microarrays ist die Qualität der Fluoreszenz-Markierung der zur Hybridisierung genutzten DNA (159). Da hierbei fluoreszierende dCTPs eingesetzt wurden, ist der GC Gehalt von entscheidender Bedeutung für die Stärke der Markierung (43). Die Markierung der DNA wurde nach der „Zufalls-Primer“-Methode mit anschließender Auffüllreaktion durch die Klenow-Polymerase durchgeführt. Die durch spektroskopische Analyse bestimmte Anzahl der inkorporierten

fluoreszierenden Moleküle musste mindestens 3 % ausmachen, was ausreicht, um eine gute Intensität bei der Hybridisierung zu gewährleisten (19, 104). In neuerer Zeit beschriebene verbesserte Markierungsreaktionen durch Biotin-Streptavidin könnten die Abhängigkeit der Markierung vom GC-Gehalt der Ziel-DNA vermindern (43).

Trotz zahlreicher Änderungen verschiedener Parameter in etwa 20 verschiedenen Hybridisierungsläufen mit Fluoreszenz-markierter genomischer DNA wurden die Erwartungen in diesen ersten Versuchen nur ansatzweise erfüllt (Abb. 15, Kap. 3.2.4): genomische DNA eines Organismus hybridisierte nicht nur mit übereinstimmenden oder ähnlichen Sequenzen, sondern auch mit Signatursequenzen, die keine oder auch nur eine geringe Ähnlichkeit aufwiesen. Ebenso war die Intensität des Hybridisierungssignals oft schwach, obwohl die Signatursequenz und genomische DNA zu 100 % übereinstimmten. Es wurden Parameter verändert, von denen angenommen wurde, dass sie die Hybridisierungs-Ergebnisse entscheidend beeinflussen. So ist die eingesetzte Menge an markierter DNA entscheidend für die Sensitivität der Hybridisierung. Diese wurde in den durchgeführten Experimenten von 2,5 - 3,5 µg variiert. In anderen Studien wurde aber schon beobachtet, dass eine zu große Menge eingesetzter DNA (schon > 0,1 µg) die Signalstärke verminderte (43). Die Autoren vermuteten, dass dieser negative Effekt von einer sterischen oder elektrostatischen Hemmung, bzw. der gesteigerten Reassoziationsrate der Probe verursacht wird. Da das Minimum an eingesetzter Fluoreszenz-markierter genomischer DNA 2,5 µg entsprach, kann es durchaus sein, dass es sich hier um eine mögliche Fehlerquelle handelte. Des Weiteren wurde die Stringenz variiert, d.h. die Hybridisierungstemperatur wurde von 42°C bis auf minimal Raumtemperatur erniedrigt. Aber auch die Temperaturänderungen brachten keine Verbesserung der Resultate. Es wurde allerdings schon von einer Erniedrigung der Hybridisierungstemperatur auf 4°C bei einem Oligonukleotidarray (Nonamere) mit guten Ergebnissen berichtet (112). Eine niedrigere Hybridisierungstemperatur war jedoch bedingt durch die apparative Ausstattung nicht möglich. In der Auswahl der geeigneten Hybridisierungstemperatur liegt sicherlich ein sehr wichtiger Punkt für zukünftige Verbesserungen. So wird für Transkriptionsanalysen berichtet, dass die Schmelztemperatur der verwendeten Proben von entscheidender Bedeutung für eine spezifische Hybridisierung ist (19). Weitere Arbeiten müssen sowohl auf dieses Gebiet fokussieren, als auch auf geeignetere Pufferbedingungen und DNA-Konzentrationen. Der GC-Gehalt der Oligonukleotide konnte nicht in einem engen Bereich gewählt werden, da die Sequenzen durch die konservierten Bereiche der Lipasen vorgegeben waren. So variiert der GC-Gehalt innerhalb der Signatursequenzen von 83 % bis zu 46 % (Negativsequenzen von 89 - 33 %).

Damit besaßen die Oligonukleotide auch extrem unterschiedliche Schmelztemperaturen T_m von 85 - 53°C. Diese haben großen Einfluss auf die Wahl der Hybridisierungstemperaturen und der resultierenden Fluoreszenz. Weitere Faktoren spielen bei der Intensität der Signale ebenfalls eine wichtige Rolle, wie die Verteilung der markierten Moleküle auf der DNA. Mehrere Farbstoffe dicht nebeneinander „quenchen“ gegenseitig ihre Fluoreszenz und erniedrigen somit die Intensität der Signale (5). Die Größe der zu hybridisierenden DNA ist ebenfalls sehr wichtig. Sie sollte möglichst einheitlich und reproduzierbar sein, denn je länger die DNA, desto intensiver erscheint die später detektierbare Fluoreszenz (5). In diesen Experimenten wurde meist Ultraschall zur Herstellung von DNA-Fragmenten eingesetzt, die eine relativ breit gestreute Fragmentgröße lieferte. In zukünftigen Experimenten sollte die DNA stattdessen ausschließlich durch Verdau mit Restriktionsenzymen hergestellt werden.

Der Zusammenhang zwischen der Intensität der Signale in Abhängigkeit vom GC-Gehalt wurde näher untersucht (Abb. 30). Jedoch konnte keine Korrelation zwischen einem hohen GC-Gehalt und einer intensiven Signalstärke beobachtet werden. Aufgetragen wurde hier der GC-Gehalt der Oligonukleotide in Prozent sowie die entsprechende Signalstärke (s. Farbcode) eines Mittelwertes einer jeweiligen Hybridisierung mit genomischer DNA aus den drei Bakterien *A. tumefaciens*, *E. coli* und *P. aeruginosa* bei einheitlichen Parametern.

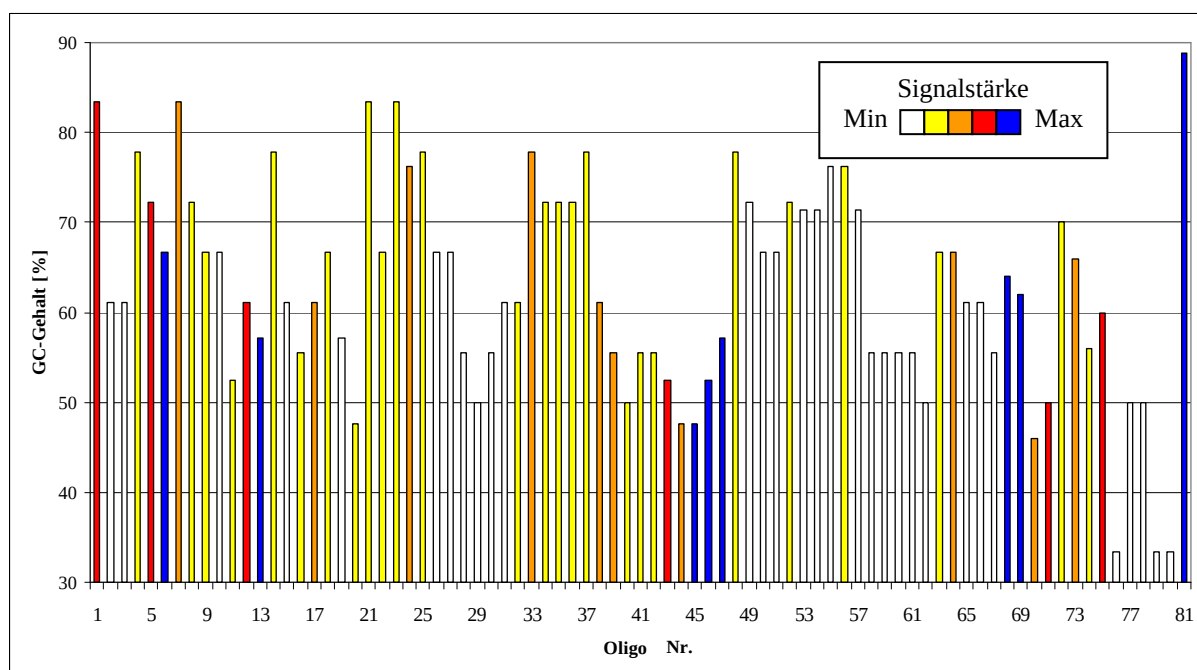


Abb. 30: Die Signalstärke der 81 verschiedenen Signatursequenzen in Abhängigkeit vom GC-Gehalt. Die Signalstärke drei voneinander unabhängiger Hybridisierungen mit drei unterschiedlichen Organismen (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *A. tumefaciens*) wurde visuell analysiert und der Mittelwert anhand des Farbcodes dargestellt. Die Parameter bei den Hybridisierungen waren bei allen Experimenten gleich.

Die Signatursequenzen zeigten unabhängig vom GC-Gehalt sowohl hohe, als auch niedrige Signalstärken. Auffällig war, dass bei einer Negativsequenz (LC81) mit dem höchsten GC-Gehalt aller Signatursequenzen von 88 % immer ein extrem starkes Signal zu detektieren war. Der unterschiedliche GC-Gehalt der Signatursequenzen ist also nicht für die oft unerwarteten Signalstärken verantwortlich. Es könnte allerdings sein, dass mehrere für die Array-Qualität wichtige Parameter wie Konzentration, GC-Gehalt und Fragmentgröße der Ziel-DNA sowie die Hybridisierungstemperatur zwar nicht einzeln für die oft nicht erwarteten Signalmuster verantwortlich sind, sondern alle zusammen einen Beitrag zu den nicht reproduzierbaren Ergebnissen lieferten.

Mit diesen ersten Experimenten zur Detektion von Biokatalysatoren aus dem Metagenom wurde Pionierarbeit auf diesem Gebiet geleistet und aufgezeigt, dass die Nutzung von sehr kurzen Signatursequenzen sehr viel mehr Forschungsarbeit als bisher erfordert. Die ansatzweise guten Ergebnisse und das enorme Potential der Array-Technologie im Hinblick auf die Konstruktion eines Microarrays mit 20.000 Signatursequenzen verschiedener Biokatalysator-Gene bestätigen, dass sich diese Mühe lohnen würde. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden im Rahmen des Projekts „GenoMiks“ in den Arbeitsgruppen von Prof. W. Streit (Universität Duisburg-Essen) und Dr. A. Ehrenreich (Universität Göttingen) die kurzen Signatursequenzen durch etwa 500 bp große PCR-Produkte von Lipasefragmenten aus etwa 80 verschiedenen bakteriellen Organismen ersetzt. Eine Hybridisierung mit genomischer DNA von einigen dieser Organismen und auch mit metagenomischer DNA zeigte bereits viel versprechende Ergebnisse (Elend & Ehrenreich, persönliche Mitteilung).

4.3 Identifizierung von Biokatalysatoren durch gesteigerte Expression

In Metagenombibliotheken kodierte Biokatalysatoren bleiben bei einem Aktivitäts-Screening oft unerkannt. Verantwortlich hierfür ist die Expression im heterologen Wirt, so dass die nötige genetische und physiologische Ausstattung zur Produktion eines funktionalen Proteins fehlt. Ein Screening im heterologen Wirt *E. coli* detektiert nach theoretischen Schätzungen etwa 40 % der in Metagenombibliotheken tatsächlich kodierten Biokatalysatoren (70). Die denkbaren Gründe für die geringe Effizienz sind vielfältig (Tab. 2, Kap. 1.3). Eine Ursache könnte eine im heterologen Wirt unerkannt gebliebene Promotor-Region und die dadurch bedingte fehlende Expression sein (133). Eine Lösung des Problems könnte die Verwendung von Shuttle-Vektoren zur Expression in unterschiedlichen Wirten zur Durchmusterung darstellen (36, 140). Wang und Mitarbeiter nutzten beispielsweise den als Antibiotika-Produzenten bekannten Bakterienstamm *Streptomyces lividans*, um neue

Sekundärmetaboliten aus dem Metagenom zu identifizieren, die evtl. in *E. coli* unerkant geblieben wären (210).

Weiterhin können Metagenombibliotheken mit Plasmiden und relativ kurzen DNA-Fragmenten (< 10 kb) konstruiert werden, so dass die Expression von Plasmid-kodierten, starken Promotoren in vielen Fällen ausreichen könnte, um die Transkription der kurzen Inserts zu gewährleisten. Allerdings erhöht sich durch die kurzen Fragmentgrößen auch die Gefahr, dass ORFs nicht vollständig kodiert sind oder, dass Gene von akzessorischen Proteinen fehlen. Besonders bei der Suche nach ganzen Wirkstoffwegen, welche oftmals in Operons kodiert sind, erweisen sich Metagenombibliotheken mit Insertgrößen unter 10 kb als ungeeignet (39, 57, 133, 210). Außerdem werden die Metagenombibliotheken häufig für mehrere Anwendungszwecke eingesetzt. Dazu gehört z.B. zusätzlich zum Screening nach interessanten Enzymeigenschaften auch die Aufklärung der mikrobiellen Zusammensetzung der Umweltprobe (166, 176). Allerdings steigt die Zahl der Klone zur Ermittlung der Diversität durch 16S rRNA Analyse enorm, je kleiner die jeweiligen durchschnittlichen Insertgrößen der Metagenombibliothek sind. Um also auch Metagenombibliotheken mit großen Fragmentgrößen, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden, einem effizienteren Aktivitäts-Screening durch eine Erhöhung der Expression zu unterziehen, wurde ein Expressions-Transposon konstruiert, welches MuExpress genannt wurde (128). Dieses sollte nach einer zufälligen *in vitro* Integration in Metagenombibliotheken die bidirektionale Expression zu beiden Seiten des Insertionsortes von einem starken Promoter aus ermöglichen oder erhöhen. Es sind auch andere Expressionstransposons mit Arabinose-induzierbarem Promotor (77), bzw. T7-Promotor bekannt (EZ-Tn5TM<T7/KAN-2>, EPICENTRE, Madison, USA). Diese werden routinemäßig für *in vivo* und *in vitro* Transpositionen genutzt (78, 89), jedoch verfügen diese Transposons nur über eine unidirektionale Expression, so dass die Expressionseffizienz unbekannter Genregionen theoretisch nur 50 % gegenüber MuExpress beträgt. Außerdem ist keine Veröffentlichung bekannt, bei der sie zur Expression von metagenomischen Genen eingesetzt wurden. Bei der Konstruktion von MuExpress wurde der T7-Promotor ausgewählt, da es sich um einen der stärksten für *E. coli* verfügbaren Promotoren handelt und weil zahlreiche geeignete Stämme mit integrierter T7-Polymerase zur Überexpression verfügbar sind, bzw. im Stamm *E.coli* Tuner[®] (NOVAGEN) auch eine Regulation möglich ist (33). Es ist aber auch theoretisch möglich, MuExpress in anderen Expressionswirten einzusetzen, sofern sie über eine Genom- oder Plasmid-kodierte T7-Polymerase verfügen. Zusätzlich wurde ein *lac*-Operator zur IPTG induzierbaren Expression stromabwärts der beiden Promotoren kloniert, so dass eine stringendere Expression mit

geringer Basalexpression möglich ist. Das hat unter Umständen den Vorteil, dass die Expression von toxischen Proteinen gelingen kann, da eine kurze, starke Expression gerade noch möglich ist, ohne *E. coli* zu schädigen (108). Es besteht auch die Möglichkeit, MuExpress als Mutagenese- und Sequenziertransposon zu nutzen. Von den Primer-Bindestellen SeqA und SeqB lassen sich inaktive Insertionsmutanten direkt sequenzieren. Bei MuExpress handelt es sich also um ein multifunktionelles genetisches Werkzeug.

4.3.1 MuExpress optimiert das Screening durch Expressionssteigerung

Um die Funktionalität von MuExpress zu testen, wurde zunächst ein promotorloser Vektor (pSWGFP, Wilhelm, unveröffentlicht), der das grün-fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, mit MuExpress transponiert (Abb. 17, Kap. 3.3.2). Dadurch wurde die Situation des Metagenom-Screenings simuliert, bei der der Promotor des gesuchten Gens von *E. coli* nicht erkannt wird. Etwa 40 % der Klone mit zufällig inseriertem MuExpress zeigten eine schon mit bloßem Auge sichtbare Fluoreszenz. MuExpress ist demnach in der Lage, die Expression eines Gens in *E. coli* überhaupt erst zu ermöglichen. Die Zahl der Klone mit aktivem GFP ist relativ hoch, da der rekombinante Vektor eine geringe Größe aufwies (etwa 7,6 kb). Zur weiteren Probe von MuExpress wurde ein schwach lipolytisch aktiver Klon aus einer Cosmid-Metagenombank (TWB III) benutzt, welcher auch nach einigen Tagen nur einen kaum sichtbaren Klärungshof auf Tributyrin-Indikatorplatten verursachte. Die isolierte Cosmid-DNA besaß eine Gesamtgröße von 42 kb bei einer Insertgröße von ca. 35 kb. Nach der Transposition mit MuExpress waren ca. 20 % der Klone als deutlich aktiv zu identifizieren, während Klone einer Kontrolle noch keine Aktivität zeigten (Abb.18, Kap. 3.3.2). MuExpress kann die Expression von Biokatalysatoren in Metagenombibliotheken also stark erhöhen, so dass sie in einem Aktivitäts-Screening besser detektierbar sind. Das könnte speziell dann Vorteile bieten, wenn der benutzte Assay nur hohe Aktivitäten detektieren kann. Die Zahl der aktiven Klone war im Vergleich zu dem Test mit promotorlosen GFP um die Hälfte geringer. Das ist durch die Größe von etwa 42 kb des Metagenom-Cosmids gegenüber 7,6 kb des GFP-Vektors erklärbar, da die Wahrscheinlichkeit der Insertion stromaufwärts, nahe dem entsprechenden Gen, mit steigender Größe sinkt. Mit zunehmendem Abstand von MuExpress zum entsprechenden Gen kann die Bildung eines Transkripts vom T7-Promotor durch mögliche Transkriptionsterminatoren verhindert werden, obwohl bekannt ist, dass die T7-Polymerase im Gegensatz zur Polymerase aus *E. coli* nicht immer effizient durch Terminatoren gestoppt wird (101). Gleichzeitig erhöht sich bei kleineren Vektoren aber auch die Gefahr, dass MuExpress genau in das entsprechende Gen inseriert und somit inaktiviert.

Diese Faktoren zusammen betrachtet erklären, dass mit dem fünfmal kleineren Vektor nur doppelt so viele aktive Klone gefunden wurden.

Weiterhin wurde die Eignung von MuExpress für die Sequenzierung von unbekannten Genen durch Insertionsmutagenese erprobt. Die Metagenomesterase EstCL wurde mit Hilfe der Sequenzierung von inaktiven Klonen unter Nutzung der beiden Primer-Bindestellen SeqA und SeqB erfolgreich identifiziert. Mit diesen Versuchen konnte also gezeigt werden, dass MuExpress voll funktionsfähig ist und ein hilfreiches, genetisches Werkzeug zur Erhöhung der Expression sowie zur Insertionssequenzierung von Genen darstellt.

4.3.2 Identifizierung einer neuen Esterase durch MuExpress

Im Folgenden sollte MuExpress bei der Anwendung in Metagenombibliotheken erprobt werden. Hierzu wurde zunächst die Metagenombank des Trinkwasserbiofilms III ausgewählt, da die durchschnittliche Insertgröße mit 30 kb vergleichsweise hoch war und auch schon einige Lipasen identifiziert wurden (175, 176). Das könnte auf das Vorhandensein von weiteren Biokatalysatoren aus diesem oligotrophen Habitat hindeuten, die allerdings in *E. coli* nicht exprimiert wurden (s. 4.1). Zunächst wurde die Cosmid-Bank erneut einem Aktivitäts-Screening unterzogen. Es konnten fünf lipolytisch aktive Klone identifiziert werden, welche bei den weiteren Experimenten mit MuExpress ausgelassen wurden. So konnte sichergestellt werden, dass nur zuvor nicht detektierbare lipolytische Enzyme in der neuen Expressionsbank identifiziert werden. In der neu entstandenen Expressionsbank konnte ein aktiver Klon auf Tributyrinplatten identifiziert werden, welcher LCL2 genannt wurde. Durch Subklonierung und anschließender Sequenzierung von zwei aktiven Subklonen konnte ein ORF von 903 bp Länge identifiziert werden. Dieser ORF wies eine geringe Identität von 32 % zu einer Lipase aus *Streptomyces coelicolor* A3 auf (3). Weitere Sequenzanalysen ergaben keine signifikante Ähnlichkeit zu Enzymfamilien der lipolytischen Enzyme, noch zu anderen Enzymgruppen (13). Eine ausführlichere Charakterisierung von LCL2 wird unter 4.3.4 diskutiert, allerdings wurde schon deutlich, dass es sich bei dem identifizierten Enzym LCL2 um einen völlig neuen Biokatalysator handelte.

4.3.3 Effizienz von MuExpress

Es stellte sich zunächst die Frage, ob ein identifizierter Biokatalysator in der neuen Expressionbank den Erwartungen entsprach, oder ob eigentlich mit mehr neuen Biokatalysatoren zu rechnen war. Die verwendete Metagenombibliothek hatte einen Umfang von 1700 Klonen bei einer durchschnittlichen Insertgröße von 30 kb. Das entsprach etwa

51 Mb an metagenomischer DNA. Die durchschnittliche Frequenz, mit der lipolytische Enzyme in 7 Metagenombanken unterschiedlicher Herkunft gefunden wurden, liegt allerdings bei einem neuen Enzym pro 725 Mb, obwohl die Schwankungen sehr groß und vom jeweiligen Habitat abhängig sind (87, 133, 166). Da bei dem ersten Screening bereits fünf neue lipolytische Enzyme detektiert wurden, liegt die Quote mit einem Enzym pro 10 Mb bereits sehr hoch. Es könnte also sein, dass schon fast alle Enzyme zuvor identifiziert wurden. Dafür spricht, dass der Trinkwasserbiofilm zu fast 84 % aus den Proteobakterien verwandten Mikroorganismen bestand, zu denen auch der beim Screening benutzte heterologe Expressionswirt *E. coli* gerechnet wird (Abb. 28, Kap. 4.1.1). Die Wahrscheinlichkeit, dass *E. coli* schon im zuvor durchgeführten Screening nahezu alle Promotoren der relativ nah verwandten Spezies erkannt hat und aktive Enzyme produziert hat, war also hoch. Um die Frequenz der mit Hilfe von MuExpress identifizierbaren Biokatalysatoren zu erhöhen, müsste eine Metagenombank durchmustert werden, die aus Mikroorganismen mit geringer Verwandtschaft zu *E. coli* besteht. Deswegen wurde zur weiteren Probe von MuExpress eine zweite Bank getestet, eine Cosmidbank mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 10 kb, die aus Bodenproben der Kamtschatka-Region (Russland) angelegt wurde (Daniel, unveröffentlicht, Tab. 10, Kap. 3.1.1). Es wurde vermutet, dass in dieser Bank wegen der kalten klimatischen Verhältnisse weniger Proteobakterien und damit auch weniger homologe Mikroorganismen zum heterologen Expressionswirt *E. coli* vorhanden waren. Theoretisch sollte dadurch die Anzahl der detektierbaren Biokatalysatoren nach der Transposition mit MuExpress und die dadurch vermittelte, künstlich induzierte Expression, steigen. Die Vorgehensweise fand analog zum Screening der neuen Expressionsbank des Trinkwasserbiofilms statt. Die konstruierte Expressionsbank enthielt insgesamt 15.000 Klone, was einer nahezu siebenfachen Anzahl an Klonen gegenüber der Ursprungsbank entspricht. Es konnten jedoch weder in der Ursprungsbank, noch in den neu angelegten Expressionsbanken weitere Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. Das könnte an der geringen durchschnittlichen Insertgröße von etwa 10 kb liegen, die Gesamtmenge an metagenomischer DNA in dieser Bank beträgt also etwa 20 Mb. Zum einen könnte es durchaus sein, dass kein lipolytisches Enzym in dieser Bank vorhanden war. Zum anderen ist es denkbar, dass zwar die Transkription durch MuExpress ermöglicht wurde, dass aber trotzdem kein aktives Enzym produziert wurde, weil beispielsweise posttranslationale Modifikationen des Enzyms im heterologen Wirt *E. coli* ausblieben (vgl. auch Tab. 2, Kap. 1.3). Außerdem ist unklar, um welche Arten von Bakterien es sich in der Bodenprobe aus Kamtschatka handelte. Es wurden zwar auch diverse Archaeobakterien in der Probe detektiert

(Daniel, persönliche Mitteilung), aber eine genaue Quantifizierung wurde nicht durchgeführt. Um die Effizienz von MuExpress zu bestimmen, müssten weitere Expressionsbanken mit MuExpress konstruiert werden und zwar besonders solche, die einen hohen Anteil an nicht zu *E. coli* verwandten Mikroorganismen beinhalten.

4.3.4 Verschiedene Faktoren könnten die Identifizierung von Biokatalysatoren verhindern

Der durch MuExpress identifizierte ORF *ICL2* wurde amplifiziert und in Überexpressionsvektoren kloniert. Jedoch konnte keine Überexpression nach SDS-PAGE Analyse beobachtet werden, so dass *LCL2* auch nicht gereinigt und anschließend biochemisch charakterisiert werden konnte. Die Überexpressionskulturen zeigten zwar eine deutliche, aber geringe Aktivität (< 1 U/ml) ausschließlich gegen kurzkettige Ester (s. 3.3.3), was zeigt, dass zumindest eine kleine Menge des lipolytischen Enzyms gebildet wurde und es sich bei diesem Enzym vermutlich um eine Esterase handelt. Spekulativ bleibt allerdings, warum *LCL2* beim zuvor durchgeführten Screening nicht entdeckt wurde und warum keine Überexpression in *E. coli* möglich war. Der naheliegendste Grund, warum *LCL2* zuvor nicht detektiert wurde, wäre ein von *E. coli* nicht erkannter Promotor und die Bildung eines Transkripts in der Expressionsbank durch die T7-Polymerase ausgehend vom T7-Promotor von MuExpress. Vorhersagen zu funktionalen Promotorsequenzen sind bei *E. coli* schwierig, da die -10 und -35 Boxen nicht sehr konserviert sind (105). Zwei öffentlich verfügbare Programme zur Prognose von prokaryontischen Promotoren wurden genutzt, um eine 300 bp lange Region vor dem Startcodon zu untersuchen ((156): http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html, BPPROM: <http://www.softberry.com/>). Beide Programme identifizierten eine schwach konservierte Promotorregion (d.h. geringe Wahrscheinlichkeit) mit einem Transkriptionsstart 206 bp stromaufwärts des ATG-Startcodon von *ICL2*. Eine typische *E. coli* Promotorregion anhand der -10 und der -35 Region wurde hingegen nicht gefunden, obwohl es natürlich auch möglich ist, dass ein Promotor noch weiter stromaufwärts existiert. Aber es könnte durchaus sein, dass keine oder nur wenige Transkripte von *ICL2* gebildet wurden, so dass dieses Enzym in der unmodifizierten Metagenombibliothek nicht detektiert wurde. Eine zur konservierten Region der ribosomalen Erkennungssequenz (RBS, Shine-Dalgarno Sequenz) von *E. coli* homologe Sequenz „AAGGAC“ wurde in einem Abstand von 7 bp vor dem Startcodon identifiziert (82), welche die Translation von *ICL2* ermöglichte. Die eigene RBS stellte somit vermutlich keine Schwachstelle bei der Bildung von aktivem Protein dar, die durch eine erhöhte Produktion von mRNA durch MuExpress ausgeglichen werden musste. *LCL2* konnte

aber auch im Überexpressionsvektor unter der Kontrolle des T7-Promotors nicht in detektierbaren Mengen produziert werden, was auf weitere Gründe schließen lässt. So könnte der Codon-Gebrauch nicht mit dem von *E. coli* übereinstimmen, was zu einem Abbruch der Translation führen kann (139). Eine Analyse der Codonfolge von *LCL2* mit Hilfe eines frei verfügbaren Computerprogramms ((69): <http://gcua.schoedl.de/sequential.html>) zeigte allerdings keine Häufung von ungebräuchlichen Codons für die Translation in *E. coli*, so dass hier vermutlich keine Einschränkung vorliegt. Weitere mögliche Gründe für die geringe Menge von *LCL2* nach der Überexpression sind eine instabile mRNA (183) oder die Degradation des Proteins nach der Translation durch Proteasen aus *E. coli* (76). Die letztgenannten Gründe sind möglicherweise auch dafür verantwortlich, dass *LCL2* beim Screening in der unmodifizierten Metagenombibliothek nicht identifiziert werden konnte. Die Produktion einer erhöhten Menge an mRNA durch die T7-Polymerase in der mit MuExpress konstruierten Expressionsbank könnte ausgereicht haben, um dennoch genug aktives *LCL2* zu bilden. Es kann also nur spekuliert werden, warum *LCL2* nur nach einer Erhöhung der Expression durch MuExpress in Metagenombibliotheken identifiziert werden konnte. Es wurde aber gezeigt, dass sich durch die Verwendung von MuExpress neue Biokatalysatoren identifizieren lassen und das Aktivitäts-Screening effizienter war. Um allerdings weitere und auch statistisch gesicherte Aussagen treffen zu können, müssen mehr Metagenombibliotheken mit MuExpress modifiziert werden. Diese sollten auch aus Habitaten stammen, bei denen Bakterien vorherrschen, welche nur eine geringe Verwandtschaft zu *E. coli* zeigen.

4.4 Biochemische Charakterisierung von Biokatalysatoren aus dem Metagenom

Die erfolgreiche Entwicklung eines kommerziell genutzten, biokatalytischen Prozesses ist eine große Herausforderung und hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. Erst in den letzten Jahren können Biokatalysatoren für einen bestimmten Prozess durch gerichtete Evolution maßgeschneidert werden (95), bzw. ist die Zahl der verfügbaren Biokatalysatoren durch den Metagenomansatz und verbesserte Screeningsysteme enorm gestiegen (54). Für einen bestimmten, idealisierten Prozess kann also ein passender, idealer Biokatalysator gesucht werden (27). Doch welche Anforderungen an den entsprechenden Biokatalysator gestellt werden, ist immer von dem einzelnen Prozess abhängig, für den aber eine große Anzahl von Parametern entscheidend sind (Abb. 31). Die Parameter lassen sich in vier große Gruppen einteilen: Aktivität, Spezifität, Stabilität und Effizienz (133). Um zu entscheiden, ob ein bestimmter Biokatalysator für einen Prozess geeignet ist, müssen möglichst viele der

einzelnen Parameter untersucht werden. Um im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Enzyme für die Eignung als Biokatalysatoren in der Industrie zu untersuchen, wurden in Kooperation mit der AG Streit (Universität Duisburg-Essen) eine Vielzahl der in Abb. 31 vorgestellten Parameter von aussichtsreichen Enzymkandidaten untersucht.

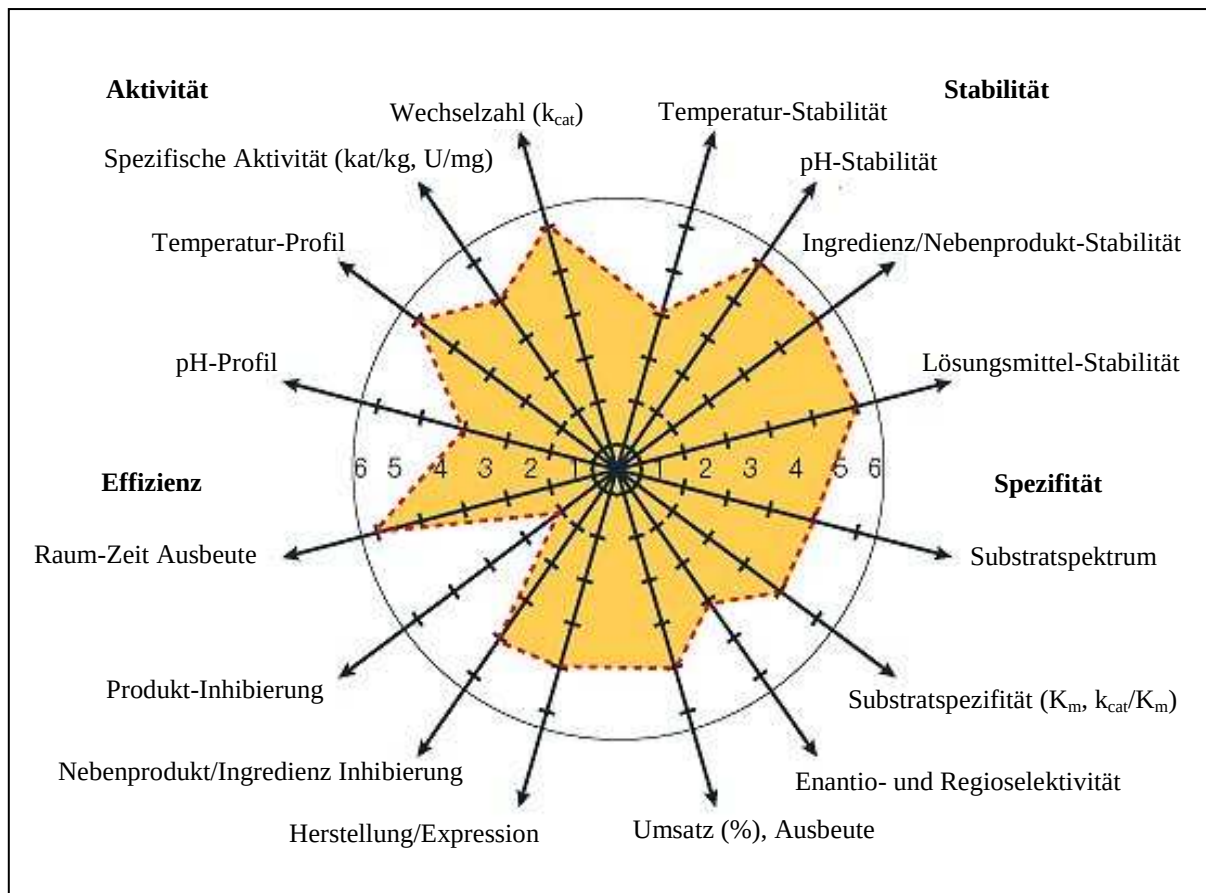


Abb. 31: Abhängigkeit der Eignung eines Biokatalysators von multiplen Parametern (133). Dargestellt ist das Konzept des idealen Biokatalysators. Jeder Enzymkandidat wird bei den verschiedenen Parametern in einer Skala von 1 - 6 von sehr geringer bis hin zu sehr guter Eignung klassifiziert, was zu dem dargestellten Beispiel-Fingerprint eines fiktiven Modellenzyms führt (dargestellt in Gelb). Die einzelnen Parameter lassen sich in vier Gruppen unterteilen: Aktivität, Effizienz, Spezifität und Stabilität. Bei einem Vergleich verschiedener Enzyme lassen sich mit diesem Fingerprint Kandidaten für eine Prozessentwicklung oder für eine weitere Verbesserung durch Proteinengineering oder gerichtete Evolution auswählen. kat: Reaktionsrate; k_{cat} : Katalytische Konstante; K_m : Michaelis-Menten Konstante; U: Unit.

4.4.1 Die Auswahl der Biokatalysatoren

Ein erstes Auswahlkriterien für aussichtsreiche Enzymkandidaten waren ausreichend hohe Aktivitäten der entsprechenden Metagenomklone auf Lipase/Esterase Indikatorplatten. Bei niedrigen Aktivitäten könnte es sich um andere Enzymklassen handeln, die eine geringe lipolytische Nebenaktivität besitzen. Die Klone wurden sequenziert und anschließend eine DNA-Analyse vorgenommen, um zu entschlüsseln, ob es sich um neue Gene handelte, oder

um Gene, die eine Ähnlichkeit zu biotechnologisch genutzten Enzymen besaßen. Enzyme, die den oben genannten Anforderungen entsprachen wurden weiter bearbeitet. Teilweise wurden komplette Cosmide sequenziert, in den meisten Fällen aber nur die Gene selbst, mit nur kurzen flankierenden DNA-Bereichen. So konnte nur in wenigen Fällen anhand von größeren sequenzierten DNA-Fragmenten ermittelt werden, welchen Organismen die Gene eventuell zugeordnet werden können oder ob sie beispielsweise in Operons organisiert vorliegen. So wurde im Fall eines lipolytisch aktiven Klons aus einer Anreicherung (agarolytisches Konsortium) das komplette Cosmid pXE1 sequenziert (208). Es wurden zwei hintereinander liegende Gene mit Homologien zu Lipasen aus der Gattung *Pseudomonas* identifiziert, welche als *lipA* und *lipB* bezeichnet wurden. Stromaufwärts der beiden Lipasen sind zwei Gene kodiert, die Ähnlichkeit zu einem Typ I Sekretionssystem aufweisen (Abb. 20, Kap. 3.4.1). Eine ähnliche Operonstruktur ist schon von *P. brassicacearum* und *P. fluorescens* bekannt, mit dem Unterschied, dass bei diesen Organismen die Lipasegene in einem Cluster mit alkalischen Proteasegenen zu finden sind (2, 29, 52, 106). Beide Lipasegene sollten näher untersucht werden. Jedoch scheiterte bereits die Amplifikation von *lipA*, trotz der Änderung verschiedenster beeinflussender Parameter und der Zugabe von Additiven wie DMSO oder Betain. Ursache könnte die Bildung von Sekundärstrukturen der DNA-Matrize oder der relativ hohe GC-Gehalt von etwa 60 % von *lipA* sein (169). Dagegen konnte *lipB* in den Überexpressionsvektor pET22b kloniert werden. Jedoch entstanden hier bei allen Überexpressionen unlösliche, inaktive Proteinaggregate („inclusion bodies“), welche mit bereits beschriebenen Methoden reduziert werden sollten (139, 142, 174). Aber auch bei einer Temperaturerniedrigung, der Zugabe von 10 % Glycerol oder der Nutzung verschiedener Überexpressionsstämme wurde kein lösliches, aktives Enzym produziert. Dieses Phänomen wurde auch schon bei der heterologen Expression einer Lipase aus *P. fluorescens* SIKW1 beobachtet, die ebenfalls in einem Operon mit einem ABC-Transporter kodiert ist (2). Hier konnte die Bildung von Proteinaggregaten durch die Co-Expression aller drei Transportproteine in *E. coli* verhindert werden und die Lipase wurde in den Kulturüberstand sekretiert. Eine weitere Lipase aus *P. fluorescens* B52 wird ebenfalls durch einen ABC-Transporter sekretiert (52). Bei einem Sequenzvergleich von LipB mit den Lipasen aus *P. fluorescens* SIKW1 und *P. fluorescens* B52 zeigte sich, dass auch LipB typische Motive von Signalsequenzen aufweist, die Proteine zur ABC-Transporter vermittelten Sekretion markieren (Abb. 32). Es sind fünf glycinreiche Abschnitte zu finden sowie eine mögliche amphipatische α -Helix und eine hydrophobe Region am C-Terminus, wie sie auch für Metalloproteasen beschrieben wurden (72).

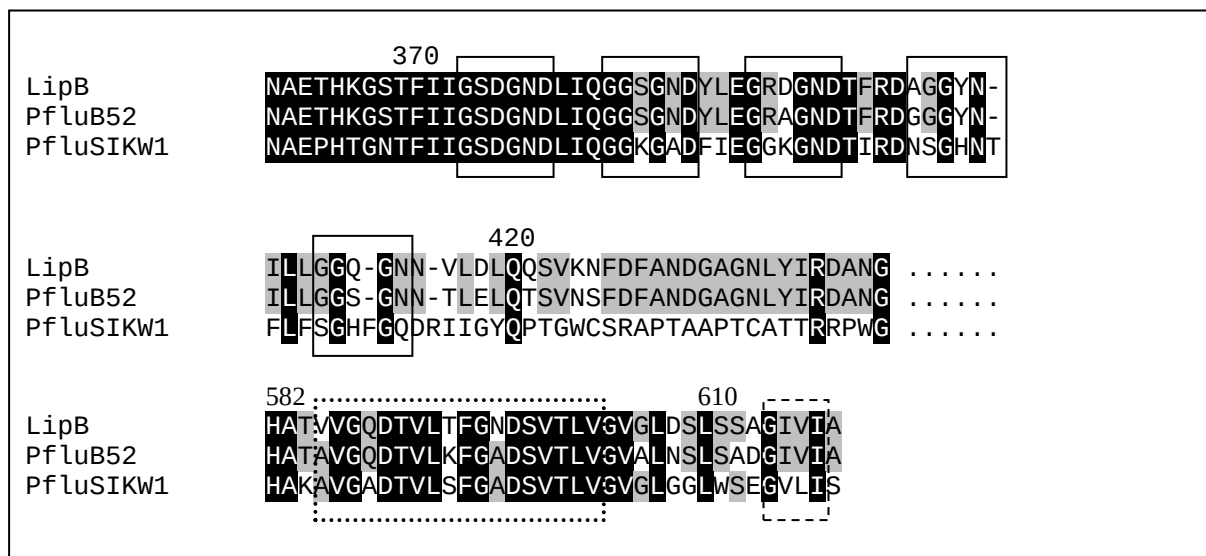


Abb. 32: Vergleich der Aminosäuresequenzen von LipB und zwei Lipasen aus *P. fluorescens* B52 und *P. fluorescens* SIKW1. Identische Aminosäuren in allen drei Lipasen sind schwarz unterlegt, identische Sequenzen in zwei Lipasen sind grau unterlegt. Das Alignment wurde mit Hilfe von ClustalW angefertigt (31, 53) und die Nummern beziehen sich auf die Aminosäuresequenz von LipB. Die Boxen mit durchgezogenen Linien markieren Glycin-reiche Regionen. Die unteren Zeilen stellen das C-terminale Ende der Lipasen dar, wobei die gepunktete Box eine mögliche amphipatische α -Helix und die gestrichelte Box das hydrophobe C-terminale Motiv markiert.

Das komplett sequenzierte Cosmid pXE1 kodierte allerdings nicht das komplette Operon, da der stromaufwärts liegende Teil im Insert fehlte und nicht mit kloniert wurde (Abb. 20, Kap. 3.4.1). So sind nur zwei von drei notwendigen Transportproteinen auf dem Cosmid kodiert und möglicherweise die ebenfalls in anderen Organismen beschriebene Protease, die auch in *P. fluorescens* B52 stromaufwärts des ABC-Transporters zu finden ist (52, 197). Es war also nicht möglich, die zur Aktivität von LipB vermutlich notwendigen Transportproteine zusätzlich zu exprimieren, da diese nicht zur Verfügung standen. Es wurde allerdings beschrieben, dass der ABC-Transporter der alkalischen Protease von *P. aeruginosa* auch in der Lage ist, die Lipase aus *P. fluorescens* SIKW1 zu sekretieren. Deshalb wurde die Überexpression von LipB auch im heterologen, aber näher verwandten *P. aeruginosa* durchgeführt. Allerdings blieb die Lipase auch hier inaktiv, so dass der Transporter von LipB entweder sehr spezifisch ist oder die Menge an gebildetem ABC-Transporter unter den angewendeten Kulturbedingungen nicht ausreichte, um LipB in ausreichenden Mengen zu transportieren.

Die Produktion von aktivem LipB gestaltete sich also als sehr schwierig, und somit sinkt nach dem Schema in Abb. 31 auch die Effizienz und somit die biotechnologische Eignung eines Biokatalysators, so dass auf weitere Versuche zur Überexpression verzichtet wurde. Die

Enzyme LipA und LipB sowie die durch MuExpress identifizierte LCL2 fielen also aus unterschiedlichen, oben dargestellten Gründen durch das Raster der biotechnologisch nutzbaren Enzymkandidaten. Dagegen ließen sich die drei lipolytischen Enzyme EstCL, EstA3 und EstCE mit Hilfe der Metall-Affinitäts-Chromatographie nach der Überexpression leicht reinigen (Abb. 21, Tab. 15, Kap. 3.4.2) und wurden eingehend biochemisch charakterisiert.

4.4.2 Die lipolytischen Enzyme EstCL, EstA3 und EstCE

Bei den drei lipolytischen Enzymen EstCL, EstA3 und EstCE handelt es sich um neue Biokatalysatoren. Die Identitäten zu bereits bekannten Enzymen lagen lediglich zwischen 47 und 54 %. Alle bisher in der Literatur beschriebenen Biokatalysatoren aus dem Metagenom besaßen nur eine entfernte oder gar keine Verwandtschaft zu bereits bekannten Enzymen, was auch zeigt, dass die bisher mit dem Metagenomansatz analysierte Vielfalt nur die „Spitze des Eisbergs“ darstellt (39). Die drei Enzyme untereinander besaßen einige Gemeinsamkeiten, aber auch viele unterschiedliche theoretische Eigenschaften.

So konnte für alle drei Enzyme ein isoelektrischer Punkt im sauren Bereich ermittelt werden und die theoretische Größe der Proteine lag in einem für die meisten Enzyme typischen Bereich zwischen 33 und 43 kDa. Allerdings fiel auf, dass die Elution von EstA3 bei der Gelfiltration nicht wie bei einem Monomer von 43 kDa, sondern bei einem viel höheren Molekulargewicht von etwa 260 kDa erfolgte (175). EstA3 bestand also aus sechs Untereinheiten und durch Enzymogramme konnte bestätigt werden, dass dieses Enzym auch ausschließlich als Hexamer aktiv war (56). Es sind auch einige andere lipolytische Enzyme bekannt, die in einer multimeren Form aktiv sind. Dazu zählt eine tetramere Hydrolase aus *Xanthomonas citri* (11), eine tetramere Heroin-Esterase aus *Rhodococcus* sp H1 (28, 155), eine tetramere Kokain-Esterase aus *P. maltophila* (26) und eine mögliche tetramere oder pentamere Acetyl-Xylan-Esterase aus *Bacillus pumilus* (42). Weiterhin wurde auch schon von einer hexameren Xylan-Esterase aus *Thermoanaerobacterium* sp. berichtet (136, 185). Diese zeigt allerdings keine Homologie zu EstA3 (56). EstA3 ist demnach die erste Esterase der Lipase-Familie VIII nach Arpigny und Jäger (7), welche als Hexamer aktiv ist. Zur Familie VIII der Lipasen werden solche Enzyme gerechnet, die anstelle des typischen Pentapeptids G-X-S-X-G des aktiven Zentrums mit einem nukleophilen Serin, eine konservierte Region mit der Aminosäurefolge S-X-X-K besitzen, welche zuvor ausschließlich von β -Lactamasen bekannt war. Erst vor kurzer Zeit wurde für eine Esterase aus *Burkholderia gladioli* beispielhaft gezeigt, dass dieses Motiv wichtig für die Aktivität von Esterasen ist, welche Ähnlich-

keiten zu β -Lactamasen besitzen (148, 209). So wies auch EstA3 die größte Identität (53 %) zu einer β -Lactamase aus *Rhodopseudomonas palustris* auf. EstCE kann ebenfalls zu dieser Familie gerechnet werden und zeigt ebenfalls eine signifikante Homologie zu einer β -Lactamase aus *Burkholderia cepacia* (44 % Identität). Beide Esterasen EstA3 und EstCE waren nach dem Austausch des Serins im β -Lactamase-Motiv S-X-X-K durch Alanin inaktiv, was zeigt, dass diese Aminosäure eine wichtige Rolle im Reaktionsmechanismus spielt und wahrscheinlich das nukleophile, katalytisch aktive Serin darstellt (56). Allerdings konnte weder durch EstA3 noch durch EstCE eine Resistenz von *E. coli* gegenüber verschiedenen Cephalosporinen und β -Lactam-Antibiotika bei einer Überexpression vermittelt werden (56). Die Esterasen sind also vermutlich trotz der Ähnlichkeit zu β -Lactamasen nicht in der Lage, den β -Lactam-Ring zu spalten. Da aber *estA3* und *estCE* von putativen Genen umgeben sind, die der Homologie nach eine Rolle bei der Resistenz gegenüber Antibiotika spielen könnten, sind beide Enzyme eventuell Teil eines ursprünglichen Antibiotika-Resistenz Clusters (56). Dagegen besitzt EstCL das typische Esterasemotiv G-X-S-X-G und auch die höchste Homologie zu einer Esterase aus *Novosphingobium aromaticivorans*. Auch andere in der Nähe von *estCL* kodierten Enzyme stammen aus einem nahen Verwandten dieses Bakteriums. Dazu zählen eine Dehydrogenase (59 % Identität), eine Deoxyribodipyrimidine Photolyase (74 %) und eine Pyruvate:Ferredoxin Oxidoreductase (81 %). *N. aromaticivorans*, welcher ubiquitär im Boden sowie im Süß- und Salzwasser vorkommt, ist dafür bekannt, aromatische Kohlenwasserstoffe umzusetzen und ist somit von biotechnologischer Bedeutung (102). Auch die anderen auf diesem Cosmid kodierten Gene könnten also biotechnologisch relevante Enzyme kodieren. Die drei metagenomischen Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 zeigten untereinander keine signifikante Homologie und sollten nun eingehender untersucht und biochemisch charakterisiert werden.

4.4.3 Bei den Enzymen EstCL, EstCE und EstA3 handelt es sich um Esterasen

Bei der Bestimmung des Substratspektrums durch titrimetrische Tests gegenüber Vinylestern und Triglyceriden unterschiedlicher Kettenlängen zeigte sich, dass die drei lipolytischen Enzyme EstCL, EstCE und EstA3 kurzkettige Substrate wie Vinylbutyrat oder Tributyrin bevorzugen und nur eine geringe bzw. keine Aktivität gegenüber längerkettigen Substraten besitzen (Tab. 16, Kap. 3.4.3). Lipasen werden als Carboxylester-Hydrolasen definiert, die im Gegensatz zu Esterasen die Fähigkeit besitzen, wasserunlösliche, d.h. langkettige Ester (Kettenlänge $C \geq 10$) zu spalten. Dabei können Lipasen auch kurzkettigere „Esterase-Substrate“ spalten, sie besitzen aber maximale Aktivität gegenüber Substraten, die

Emulsionen bilden (30, 207). Deswegen können alle drei Enzyme eindeutig anhand der Substratspezifität als Esterasen [EC 3.1.1.1] klassifiziert werden. Für diese Definition spricht weiterhin, dass alle drei Enzyme gegenüber sämtlichen getesteten Substraten keine Interphasenaktivierung zeigen (Abb. 22, Kap. 3.4.4). Damit wird ein sprunghafter Anstieg der Aktivität des Enzyms bei steigender Substratkonzentration bezeichnet, genau dann, wenn die kritische Micellarkonzentration überschritten wird (173). Früher wurden Lipasen durch die Interphasenaktivierbarkeit von den Esterasen abgegrenzt (45), aber es sind auch viele Lipasen beschrieben worden, die keine Interphasenaktivierung zeigen, wie beispielsweise eine Lipase aus *P. aeruginosa* PAO1 (98). Allerdings ist keine Esterase bekannt, die eine Interphasenaktivierung aufweist (94, 97). Die fehlende Interphasenaktivierbarkeit von EstCL, EstCE und EstA3 unterstützt also deren Zuordnung zu den Esterasen. Weiterhin ist es auch von biotechnologischem Interesse, welche Substratkonzentration zur optimalen Umsetzung durch das jeweilige Enzym eingesetzt werden muss. Deswegen ist die Interphasenaktivierbarkeit ein wichtiges biochemisches Charakteristikum von lipolytischen Enzymen.

Im Vergleich der spezifischen Aktivitäten gegenüber Vinylestern und Triglyceriden mit anderen aus der Literatur bekannten lipolytischen Enzymen sind bei keinem Substrat Spitzenwerte bei den drei untersuchten Esterasen zu finden (Tab. 18). Die einzelnen Aktivitäten der schon beschriebenen Enzyme sind oft um ein Vielfaches höher, wie z.B. bei der Lipase aus *Rhizomucor miehei*, welche von NOVO-NORDISK (Dänemark) als Lipozyme® vertrieben wird. Allerdings sind die spezifischen Aktivitäten nur bedingt vergleichbar, da sie unter verschiedenen, und nur teilweise optimierten Reaktionsbedingungen ermittelt wurden. Das zu den drei metagenomischen Esterasen ähnlichste Substratspektrum besitzen die Schweineleber-Esterase, die Acetylcholin-Esterase aus *Electrophorus electricus* sowie LipB aus *Bacillus subtilis*, bei denen es sich um die einzigen, als Esterasen klassifizierten lipolytischen Vergleichsenzyme handelt. Auch die spezifischen Aktivitäten gegenüber den einzelnen Substraten sind etwa in derselben Größenordnung angesiedelt, obwohl EstCE gegenüber den Vinylestern und Triglyceriden nur schwache Aktivität besaß. Es handelte sich bei den Substraten allerdings nicht um biotechnologisch relevante Substanzen, sondern die ermittelten Aktivitäten gaben in erster Linie Aufschluss über die Klassifizierung der Enzyme.

Tab. 18: Spezifische Aktivitäten von EstCL, EstCE und EstA3 gegenüber einer Auswahl an Vinylestern und Triglyceriden im Vergleich mit anderen bekannten lipolytischen Enzymen (53, 132). Die Aktivitäten sind jeweils in U/mg angegeben.

Enzym	Vinyl-Acetat	Vinyl-Propionat	Vinyl-butyrat	Vinyl-laurat	Triacetin	Tributyryn
<i>Fusarium solani pisi</i> Cutinase	650	700	1375	775	320	360
Schweine-Pankreas Lipase	90	360	270	160	740	2000
<i>Rhizopus oryzae</i> Lipase	640	1600	3300	2700	60	900
<i>Rhizomucor miehei</i> Lipase	1940	7500	11000	11000	20	2200
<i>Thermomyces lanuginosus</i> Lipase	700	3000	3700	12000	0	2250
Humane-Pankreas Lipase	200	960	750	450	10	9500
Schweineleber Esterase	320	300	470	0	60	70
<i>Electrophorus electricus</i> Acetylcholin-Esterase	970	210	0	0	450	0
<i>Bacillus subtilis</i> LipA	0	50	150	2400	30	280
<i>Bacillus subtilis</i> LipB	0	0	50	20	20	310
EstCL	0	173	553	0	120	333
EstCE	13	13	16	0	27	55
EstA3	108	380	388	7,5	148	168

4.4.4 Die Esterasen sind alkalistabil und weisen ebenfalls ein Aktivitätsoptimum im alkalischen Bereich auf

Die Stabilität und die Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten ist bei der biotechnologischen Nutzung eines Enzyms oft von entscheidender Bedeutung. So werden Lipasen, die als Waschmittelzusatz dienen sollen, bei alkalischen Bedingungen (pH 10 bis pH 11) eingesetzt und müssen demnach in diesem Milieu stabil und aktiv sein (99). In den meisten Fällen besitzen lipolytische Enzyme ein neutrales (46, 47, 79, 126) oder ein alkalisches pH-Optimum (79, 179, 195). Eine Ausnahme bildet eine Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* SIKW1, welche ein pH-Optimum im sauren Bereich (pH 4,8) aufweist (6). Die drei Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 besitzen ebenfalls ein pH-Optimum zwischen pH 8 (EstCL) und pH 11 (EstA3, Abb. 24, Kap. 3.4.6). Allerdings sind nur wenige lipolytische

Enzyme bekannt, die über einen weiten pH-Bereich aktiv sind. Dazu zählen die Lipasen aus *Bacillus stearothermophilus* SB-1, *B. atrophaeus* SB-2 und *B. licheniformis* SB-3, welche in einem Bereich von pH 3 - pH 12 aktiv sind (22). Für EstA3 konnte gezeigt werden, dass es in einem Bereich von pH 5 - pH 11 aktiv ist und auch EstCE behielt noch 40 % der Aktivität bei pH 6. EstCL war dagegen schon bei pH 6 inaktiv und nur in einem schmalen Bereich von neutral bis leicht alkalisch aktiv. Während also EstCE und EstA3 durchaus über ein breites pH-Spektrum verfügen, ist die Aktivität von EstCL auf einen engen pH-Bereich begrenzt.

Eine Untersuchung zur Lagerstabilität zeigte, dass EstCL und EstCE nur im alkalischen Bereich stabil waren. Dagegen erwies sich EstA3 als ausgesprochen stabil über einen breiten pH-Bereich von 4 - 12 (Abb. 23, Kap. 3.4.5). Bakterielle Lipasen sind oft über einen weiten pH-Bereich (pH 4 - 11) stabil (49, 117, 211). Allerdings sind nur zwei lipolytische Enzyme bekannt, die im extrem alkalischen Bereich ihre native Form behalten. Dabei handelt es sich um die Esterase LipB aus *Bacillus subtilis* (53, 55) und um eine Lipase aus *B. licheniformis* (145), welche auch nach einer Inkubation bei pH 12 noch eine hohe Restaktivität besaßen. Dieses seltene Charakteristikum zeichnete auch EstCE und in geringerem Maße auch EstA3 aus. Zudem konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese beiden Enzyme bis zu einer Temperatur von 50°C stabil und auch gegen die meisten Lösungsmittel resistent sind (56). Diese Enzyme sind also besonders gut für biotechnologische Anwendungen geeignet, bei denen ein extrem alkalischer pH-Wert und relativ hohe Temperaturen erforderlich sind.

4.4.5 Die drei Esterasen hydrolisieren verschiedene Substrate enantioselektiv

Die Produktion von reinen Enantiomeren wurde in den letzten Jahren immer bedeutender für die chemische Industrie bei der Herstellung von Agrar- und Pharmaprodukten sowie von Feinchemikalien (96, 157). So enthalten auch neun der zehn Top-Pharmazeutika optisch aktive, chirale Substanzen (168). Obwohl lipolytische Enzyme verschiedene Verbindungen enantioselektiv umsetzen, sind nur wenige industrielle Prozesse bekannt, die zur Herstellung optisch reiner Chemikalien Biokatalysatoren nutzen (20, 79, 99). Problematisch bei dem Einsatz von Biokatalysatoren sind u.a. (a) eine zu geringe Enantioselektivität, (b) niedrige Enzymaktivität unter Prozeßbedingungen, (c) Schwierigkeiten beim Recycling des Biokatalysators und (d) die Verfügbarkeit von kommerziellen Enzymen (20, 99). Nicht zuletzt deswegen wurden die drei Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 auf die Fähigkeit zur stereoselektiven Hydrolyse von verschiedenen chiralen Substraten geprüft. Die eingesetzten Modellsubstrate wurden von den Arbeitskreisen von Prof. M.T. Reetz (Max-Planck Institut für Kohlenforschung, Mülheim a.d. Ruhr), bzw. Prof. M. Müller (Institut für Pharmazie und

medizinische Chemie, Universität Freiburg) vorgeschlagen und synthetisiert (Tab. 8, Kap. 2.16.3). Bei diesen Substraten handelt es sich um industriell relevante Substrate oder entsprechende Vorstufen. EstCL setzt *cis*-3,5-Diacetoxy-1-Cyclopenten sowie Isopropylenglycerinacetat mit einem Enantiomeren-Überschuss von > 99,5 % um, wobei die spezifische Aktivität gegenüber *cis*-3,5-Diacetoxy-1-Cyclopenten gleichzeitig hoch war (100 % Umsatz in 24 h bei RT). Auch EstA3 ist in der Lage, *cis*-3,5-Diacetoxy-1-Cyclopenten enantioselektiv zu hydrolisieren, allerdings war der Umsatz mit 24 % nach 24 Stunden niedrig. Gegenüber den anderen Modells substraten besaßen die beiden Esterasen EstCL und EstA3 dagegen keine oder nur sehr geringe Enantioselektivitäten und Aktivitäten. Im Gegensatz dazu war EstCE gegenüber einer Reihe von Substraten aktiv und teilweise hoch enantioselektiv. Besonders hervorzuheben ist die enantiomerenreine Umsetzung von (+) Menthylacetat. Diese Verbindung kann zur Herstellung von enantiomerenreinem Menthol genutzt werden, der von der Geschmacks- und Duftstoff-Industrie in einem Maßstab von einigen tausend Tonnen pro Jahr benötigt wird und zurzeit durch fraktionierte Kristallisation von racemischen Menthylbenzoat gewonnen wird (20, 130). Es sind lipolytische Enzyme aus *Bacillus subtilis* und *B. stearothermophilus* bekannt, die Menthylacetat enantioselektiv umsetzten, allerdings sind die Umsatzraten der Enzyme sehr gering (53, 85). Da EstCE gleichzeitig eine hohe Umsatzrate des (+) Isomers von 100 % nach 24 Stunden aufwies, könnte diese Esterase für eine biotechnologische Anwendung in diesem Bereich geeignet sein. Bemerkenswert ist auch die Umsetzung des Essigsäureesters von *cis*- und *trans*-1,2-Cyclohexandiol. Hierbei wurde in beiden Fällen nur monoacetyliertes 1,2-Cyclohexandiol produziert. Möglicherweise verhindert die Anordnung beider Essigsäurereste in unmittelbarer Nähe aufgrund sterischer Effekte die Bindung im aktiven Zentrum und somit die Hydrolyse zum Diol. Es wurde sowohl das (*R,R*), als auch das (*S,S*) Enantiomer des *cis*-Isomers auch schon bei Verkürzung der Inkubationszeit zu 100 % umgesetzt. Eine Enantioselektivität von 38 % *ee* zeigte EstCE dagegen bei der Hydrolyse des *trans*-Isomers, wobei das (*S,S*) Enantiomer bevorzugt gespalten wird. Zusammengefasst zeigen alle drei Esterasen Enantioselektivitäten gegenüber einzelnen Substraten, wobei EstCE besonders hervorzuheben ist. EstCE weist nicht nur das breiteste Spektrum, sondern auch die höchsten Umsätze auf. Damit ist eine Basis für die Einschätzung der biotechnologischen Nutzbarkeit der Esterasen gelegt und die einzelnen Enzyme können gezielt auf die Umsetzung von weiteren biotechnologisch relevanten, ähnlichen Substraten untersucht werden.

4.4.6 Enzymatisches Fingerprinting der Esterasen

Eine Klassifizierung von Enzymen kann entweder aufgrund von Sequenzvergleichen oder durch deren Substratspezifität bestimmt werden. Der Vergleich verschiedener Enzyme durch die Ermittlung des Substratspektrums erfordert die Analyse unter gleichen oder zumindest ähnlichen Bedingungen, d.h. die Verwendung gleicher Substrate und vor allem gleicher Reaktionsbedingungen. Das ist keine übliche Strategie, obwohl diese Vorgehensweise direkten Aufschluss über die Verwendbarkeit von Biokatalysatoren zur Lösung eines bestimmten Syntheseproblems liefern kann. Die Sequenzanalyse der neuen Biokatalysatoren bietet aufgrund der immer größeren Vielfalt in öffentlich zugänglichen Datenbanken ein Bild der evolutionären Verwandtschaft unterschiedlicher Enzyme. Aber es hat sich schon oft herausgestellt, dass eine hohe Sequenzhomologie nicht zwingend mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften der entsprechenden Enzyme einhergeht, und in einigen Fällen katalysierten ähnliche Enzyme komplett unterschiedliche Reaktionen. Beispielsweise ist die Aminosäuresequenz einer Bromperoxidase von *Streptomyces aureofaciens* zu 55 % identisch zu einer Esterase von *Pseudomonas fluorescens*, aber die Substratspektren der beiden Enzyme sind höchst unterschiedlich (84, 147). Die drei Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 wurden schon detailliert bezüglich unterschiedlicher Parameter charakterisiert. Um sie aber in einem Vergleich zueinander und zu anderen biotechnologisch relevanten, kommerziell verfügbaren lipolytischen Enzymen zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. J.-L. Reymond (Universität Bern, Schweiz) ein enzymatisches Fingerprinting der Enzyme durchgeführt. Diese schnelle, auf einer Ein-Schritt HPLC Analyse eines „Substrat-Cocktails“ beruhende Methode wurde schon mit 35 käuflichen lipolytischen Enzymen durchgeführt (74). Hierzu wurde die Hydrolyse von 40 enantiomerenreinen Substraten für jedes einzelne Enzym geprüft und anhand eines Farbcodes ausgewertet. Die drei metagenomischen Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 wurden ebenfalls auf die Fähigkeit zur Umsetzung dieser Substrate untersucht. Es zeigte sich auch hier, dass einige Substrate enantioselektiv umgesetzt werden (Abb. 26, Kap. 3.4.8). Allerdings werden die vier sekundären Glycerolester von keinem der drei Enzyme umgesetzt (Substrate C,E 3 und 4). Die Hydrolyse sekundärer Ester mit Hilfe von Biokatalysatoren ist im allgemeinen selten (1, 202) und stattdessen wurden erfolgreich Versuche mit einer kombinierten Lipase-Metall Katalyse unternommen, die zu enantiomerenreinen, sekundären Alkoholen führte (110). Für jedes Enzym konnte ein typisches Farbschema erstellt werden, dass die Identifizierung des Enzyms ermöglichte. Hierbei bestätigte sich aber auch die Verwandtschaft von EstCE und EstA3. Beide Enzyme wurden der Lipasefamilie VIII zugeordnet (7) und die

Aminosäuresequenz ist zu 25 % identisch. So ist auch eine Ähnlichkeit im Spektrum von EstCE und EstA3 zu beobachten. Beispielsweise wurden die Substrate B4 und D3 von beiden Enzymen am besten umgesetzt. Dabei zeigten sie aber gegenüber dem Substrat B4 eine umgekehrte Enantioselektivität, denn während EstA3 fast ausschließlich das (*R*)-Enantiomer umsetzte, hydrolisierte EstCE selektiv das (*S*)-Enantiomer. Dagegen wies EstCL ein komplett anderes Spektrum auf. Da EstCL keine signifikante Ähnlichkeit zu den beiden Enzymen EstCE und EstA3 besitzt, korreliert dieses Ergebnis mit der Homologie der Enzyme. Das enzymatische Fingerprinting ist also zur Unterscheidung von Enzymvarianten geeignet und in diesem Fall kann es auch Aufschluss über die Verwandtschaft von Enzymen auf Aminosäureebene geben.

Die enzymatischen Fingerprints der drei Esterasen wurden mit den Fingerprints von 35 bekannten und oft auch industriell genutzten, lipolytischen Enzymen verglichen (Abb. 27, Kap. 3.4.8). Jedes der drei Enzyme konnte nach Ähnlichkeit des Substratspektrums geordnet in einem Farbschema einsortiert werden. Die Enzyme sind deswegen in diesem Schema in Clustern angeordnet. EstCE und EstA3 sind, wie nach der Ähnlichkeit des Substratspektrums zu erwarten, im gleichen Cluster angeordnet. In diesem Cluster befinden sich sonst ausschließlich eukaryontische Enzyme. Es ist allerdings sehr unwahrscheinlich, dass es sich bei EstCE und EstA3 auch um eukaryontische Proteine handelt. Denn das Screening nach allen hier erwähnten Enzymen wurde im bakteriellen Wirt *E. coli* durchgeführt, so dass eukaryontische Gene mit einem obligatorischen „Splicing“ der mRNA nicht in ein funktionales Protein translatiert werden. Außerdem besaßen beide Esterasen keine signifikante Homologie zu eukaryontischen Proteinen. Die Ähnlichkeit der Fingerprints lässt also nicht unbedingt auf die Herkunft der Enzyme schließen, was wiederum verdeutlicht, wie wichtig diese Substratspektren zur Analyse des Potentials eines bestimmten Biokatalysators sein können. Denn das Substratspektrum von EstA3 ist dem Spektrum der Esterase aus Schweineleber (PLE) am ähnlichsten. Diese Esterase ist für ihre vielfältigen Anwendungen in der organischen Synthese bekannt (60, 198, 224). Allerdings lässt sich PLE schwierig heterolog exprimieren und es gelang erst 2001, dieses Enzym in *Pichia pastoris* zu produzieren (125). EstA3 könnte also durchaus eine Alternative zu dieser biotechnologisch interessanten Esterase darstellen. Überhaupt finden sich im Cluster der beiden Esterasen EstCE und EstA3 einige biotechnologisch relevante Enzyme, wie die Lipasen aus den Pilzen *Candida rugosa* und *C. antarctica* (60), so dass beide Esterasen von großem industriellen Interesse sind.

EstCL ist dagegen in keinem Cluster zu finden und zeigt die größte Ähnlichkeit zum Substratspektrum einer Lipase aus *Pseudomonas spec.*, die als Chirazyme L-6 (ROCHE DIAGNOSTICS) vertrieben wird. Nach Angaben des Herstellers handelt es sich dabei um ein Enzym mit einem weiten Substratspektrum gegenüber primären und sekundären Estern.

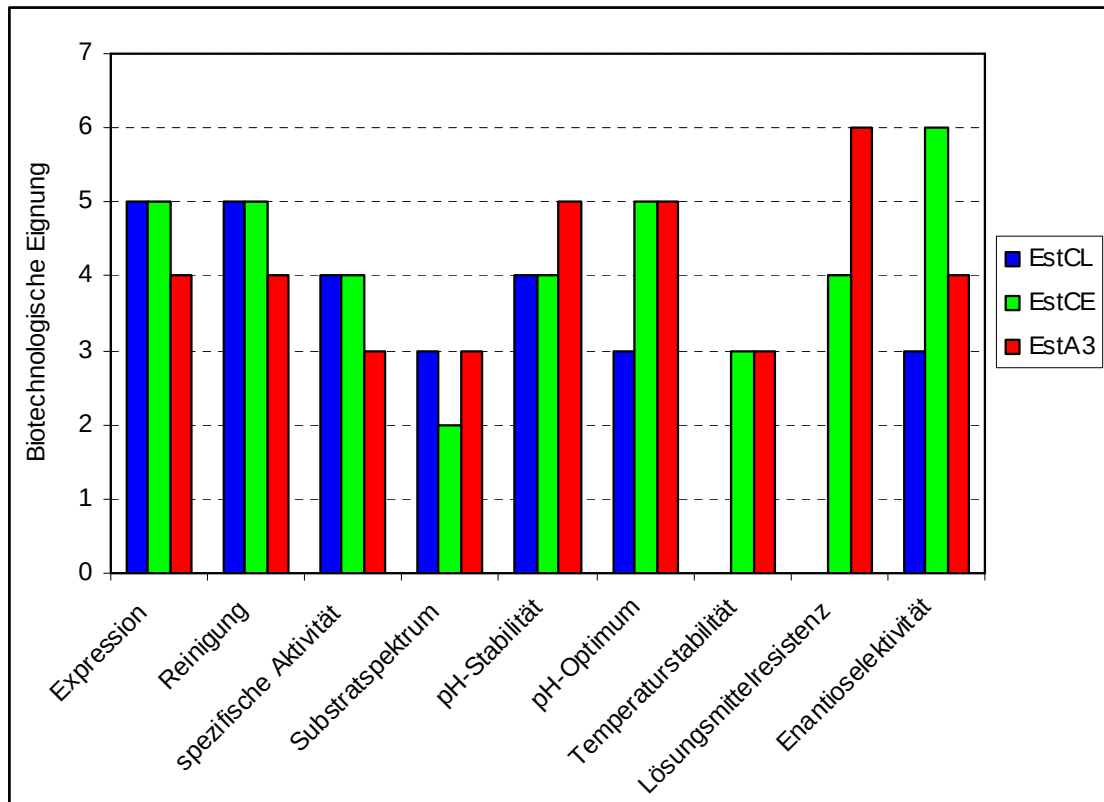


Abb. 33: Die biotechnologische Eignung von EstCL, EstCE und EstA3. Die biochemischen Eigenschaften der Esterasen wurden je nach biotechnologischer Eignung in relativen Einheiten von sehr gut [6] bis schlecht [1] angegeben.

Der enzymatische Fingerprint zeigt also, dass es sich bei den drei Esterasen EstCL, EstCE und EstA3 zwar um neue Enzyme handelt, die in allen Fällen aber eine Ähnlichkeit zu den Substratspektren biotechnologisch relevanter Enzyme besitzen. Aufgrund der detaillierten biochemischen Charakterisierung und den hieraus ermittelten, interessanten Eigenschaften der drei Esterasen, welche zusammenfassend in Abb. 33 dargestellt sind, werden diese Enzyme nun von der auf dem Biotechnologiesektor tätigen Firma BRAIN AG (Zwingenberg) weiter verwertet und im industriellen Maßstab produziert.

4. 5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Biokatalysatoren aus dem Metagenom isoliert und biochemisch charakterisiert sowie Methoden zur effizienteren biotechnologischen Nutzung des Metagenoms entwickelt. Das enorme Potential, welches mit der Erforschung des Metagenoms verbunden ist, erfordert Strategien, die ein Screening und eine Expression im hohen Durchsatz ermöglichen. Die Identifizierung von neuen Biokatalysatoren ist zunächst vom Screening der Metagenombibliotheken abhängig. Hier erweisen sich Selektionssysteme als besonders effektiv, da große Banken mit einem hohen Durchsatz untersucht werden können. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Selektionssystem zur Identifizierung von Amidasen hat sich als funktional erwiesen. Allerdings müssen weitere Metagenombibliotheken durchmustert werden, um entsprechende Biokatalysatoren zu identifizieren. Weitere Selektionssysteme sind unterdessen innerhalb des BMBF-Projekts „GenoMiks“ in der Entwicklung. Ein System zur Detektion von den biotechnologisch äußerst interessanten Thiamin Diphosphat-abhängigen Enzymen, wie Benzoylformiat-Decarboxylasen und Benzaldehyd-Lyase ist bereits erfolgreich angewendet worden (88). Weiterhin ist die Produktion der gesuchten Biokatalysatoren in Metagenombibliotheken durch den heterologen Wirt ein limitierender Faktor und von entscheidender Bedeutung für das Screening. Die Entwicklung des multifunktionalen genetischen Werkzeugs MuExpress erhöht oder ermöglicht die Transkription und somit die Identifizierung von interessanten Genen in Metagenombibliotheken. Hier sollen zukünftig weitere Banken aus extremen Habitaten mit geringem Anteil an Proteobakterien erstellt und durchmustert werden. Hierbei könnte MuExpress effizient die Detektion von Biokatalysatoren ermöglichen.

Die Umgehung des Aktivitäts-Screenings mit Sequenz-abhängigen Verfahren bietet eine andere Möglichkeit zur Identifizierung von Biokatalysatoren im Metagenom. Die Aussicht, biotechnologisch interessante Enzyme mit der beschriebenen Microarray-Technik zu detektieren und möglicherweise auch zu isolieren, bietet enorme Chancen. Hier muss noch mehr Forschungsarbeit investiert werden, um reproduzierbare Ergebnisse mit kurzen Signatursequenzen zu erzielen.

Die Klonierung und Expression, sowie die Reinigung und anschließende biochemische Charakterisierung von neu identifizierten Enzymen sind die arbeits- und zeitaufwändigsten Schritte hin zu einem biotechnologisch nutzbaren Biokatalysator. Diese Vorgehensweise ist aber unentbehrlich, wenn eine industrielle Verwertung angestrebt wird, denn der „ideale Biokatalysator“ für eine bestimmte Anwendung ergibt sich erst bei der Betrachtung aller dafür wichtigen Parameter (vgl. Abb. 31, Kap. 4.4). Deswegen wird auch zukünftig ein

Schwerpunkt bei der detaillierten biochemischen Charakterisierung von neuen Biokatalysatoren liegen, um nicht nur eine biotechnologische Anwendung zu ermöglichen, sondern auch neue Enzymklassen mit entsprechenden unbekannten Reaktionsmechanismen zu entdecken. Daher ist es von großer Bedeutung die Strukturen der neuen Enzyme zu ermitteln. Innerhalb des BMBF-Projekts „GenoMiks“ soll die Struktur der beiden Esterasen EstCE und EstA3 gelöst werden. Es liegen bereits Kristalle vor und die Entschlüsselung der Strukturen wird möglicherweise neue Reaktionsmechanismen aufdecken.

5 Zusammenfassung

Die große Mehrheit der Mikroorganismen einer Umweltprobe lässt sich unter Laborbedingungen nicht kultivieren. Deswegen blieben diese bisher nicht kultivierbaren Mikroorganismen bis vor wenigen Jahren unerschlossen. Das hiermit verbundene, fast unerschöpfliche Potential entging sowohl der ökologischen Forschung, als auch der biotechnologischen Nutzung. Durch die direkte Isolierung der Gesamt-DNA einer Umweltprobe - das so genannte Metagenom - und die anschließende Klonierung der unbekannten DNA in geeignete Vektorsysteme, wird dieses Potential seit jüngerer Zeit genutzt. Solche so genannten Metagenombibliotheken können u.a. dazu benutzt werden, neue Biokatalysatoren aus unbekannten und unkultivierten Bakterien zu isolieren. Die Etablierung, bzw. Entwicklung von Methoden zur biotechnologischen Nutzung des Metagenoms sowie die biochemische Charakterisierung von neuen Biokatalysatoren standen im Vordergrund dieses Projekts.

(a) Im Rahmen dieser Arbeit konnten zunächst Metagenombibliotheken sowohl konstruiert, wie auch schon bestehende Banken genutzt werden, so dass insgesamt ca. 38.000 Klone mit einer Gesamtgröße von etwa 760 Mb an metagenomischer DNA zum Screening zur Verfügung standen. Nach der Etablierung verschiedener Aktivitätsassays und der Entwicklung eines Selektionssystems konnten verschiedene Lipasen und Dehydrogenasen aus dem Metagenom identifiziert werden.

(b) Weiterhin wurden neue Wege beschritten, um das Potential von metagenomischen Anwendungen zu erhöhen. So wurde innerhalb dieses Projekts begonnen, die Grundlagen dafür zu erarbeiten, interessante neue Biokatalysatoren über DNA-Microarrays zu identifizieren. Als konkrete Anwendung dieser allgemeinen Idee wurden in dieser Arbeit Lipasen als Modellenzyme verwendet. Hierzu wurden Lipase-Signatursequenzen durch Datenbank-Recherche ermittelt und synthetisiert. Diese konnten reproduzierbar auf den Chip-Oberflächen immobilisiert werden. Testhybridisierungen mit genomischer DNA aus vier verschiedenen Bakterien zeigten ansatzweise die erwarteten Ergebnisse, d.h. Signatursequenzen konnten aufgrund der Intensität der Signale ihren komplementären genomischen Sequenzen zugeordnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Schritte zur Identifizierung von Biokatalysatorgenen mit Hilfe der Microarray-Technik gemacht, die innerhalb des BMBF-Projekts „GenoMiks“ erfolgreich weitergeführt wurden.

(c) Um die Detektions-Effizienz von Biokatalysatorgenen in Metagenombibliotheken zu erhöhen, wurde ein Expressions-Transposon (MuExpress) konstruiert. Dieses ermöglicht die induzierbare Expression von flankierenden Bereichen zu beiden Seiten des Insertionsortes durch eigene, starke Promotoren. Es konnte gezeigt werden, dass MuExpress zufällig in verschiedene Vektoren *in vitro* inseriert und dann in der Lage ist, die Expression von Modellenzymen zu ermöglichen oder zu erhöhen. Mit Hilfe von MuExpress konnte ein in umodifizierten Metagenombanken zuvor nicht detektierbarer Klon mit lipolytischer Aktivität identifiziert werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich MuExpress zur Insertions-Mutagenese mit anschließender Sequenzierung der flankierenden Bereiche eignet. Bei MuExpress handelt es sich also um ein neues, multifunktionales genetisches Werkzeug zur effizienteren Nutzung des Metagenoms.

(d) Eine Hauptaufgabe im Rahmen dieses Projekts war die biochemische Charakterisierung von neuen Biokatalysatoren aus dem Metagenom. Die drei metagenomischen Enzyme EstCL, EstCE und EstA3 konnten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. W. Streit (Universität Duisburg-Essen) erfolgreich kloniert, überexprimiert und gereinigt werden. Die biochemische Charakterisierung der Enzyme zeigte, dass alle drei Biokatalysatoren als Esterasen klassifiziert werden können. Die Enzyme besitzen biotechnologisch relevante Eigenschaften wie hohe Enantioselektivität und Alkalistabilität. Ein enzymatisches Fingerprinting bestätigt, dass es sich um neue Biokatalysatoren handelt, die Ähnlichkeit zu biotechnologisch interessanten Enzymen aufweisen. Aufgrund der detaillierten biochemischen Charakterisierung und deren interessanten biotechnologischen Eigenschaften werden alle drei Biokatalysatoren EstCL, EstCE und EstA3 zukünftig von der Firma BRAIN AG (Zwingenberg) industriell verwertet.

6 Literatur

1. **Abad, J. L., G. Fabrias, and F. Camps.** 2000. Synthesis of dideuterated and enantiomers of monodeuterated tridecanoic acids at C-9 and C-10 positions. *J Org Chem* **65**:8582-8588.
2. **Ahn, J. H., J. G. Pan, and J. S. Rhee.** 1999. Identification of the tliDEF ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *J Bacteriol* **181**:1847-1852.
3. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.
4. **Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiol Rev* **59**:143-169.
5. **Amersham-Biosciences.** 2000. Fluorescence Imaging: principles and methods. Amersham Biosciences: code number 63-0035-0028.
6. **Andersson, R. E., C. B. Hedlund, and U. Jonsson.** 1979. Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J Dairy Sci* **62**:361-367.
7. **Arpigny, J. L., and K. E. Jaeger.** 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343**:177-183.
8. **Bachmann, R., F. Budde, and J. Riese.** 2004. Die dritte Welle - Die Biotechnologie erobert die Chemieindustrie. *Chem. Ing. - Tech.* **76**:1155-1158.
9. **Bairoch, A.** 1999. The ENZYME data bank in 1999. *Nucleic Acids Res* **27**:310-311.
10. **Baker, G. C., S. Gaffar, D. A. Cowan, and A. R. Suharto.** 2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiol Lett* **200**:103-109.
11. **Barends, T. R., J. J. Polderman-Tijmes, P. A. Jekel, C. M. Hensgens, E. J. de Vries, D. B. Janssen, and B. W. Dijkstra.** 2003. The sequence and crystal structure of the alpha-amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri* define a new family of beta-lactam antibiotic acylases. *J Biol Chem* **278**:23076-23084.
12. **Barns, S. M., R. E. Fundyga, M. W. Jeffries, and N. R. Pace.** 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:1609-1613.
13. **Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R. D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon, E. L. Sonnhammer, D. J. Studholme, C. Yeats, and S. R. Eddy.** 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**:D138-141.
14. **Beja, O., L. Aravind, E. V. Koonin, M. T. Suzuki, A. Hadd, L. P. Nguyen, S. B. Jovanovich, C. M. Gates, R. A. Feldman, J. L. Spudich, E. N. Spudich, and E. F. DeLong.** 2000. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**:1902-1906.
15. **Beja, O., E. N. Spudich, J. L. Spudich, M. Leclerc, and E. F. DeLong.** 2001. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* **411**:786-789.
16. **Bell, P. J., A. Sunna, M. D. Gibbs, N. C. Curach, H. Nevalainen, and P. L. Bergquist.** 2002. Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology* **148**:2283-2291.
17. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-1523.
18. **Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
19. **Bodrossy, L.** 2002. Diagnostic Oligonucleotide Microarrays for Microbiology, p. 44-91. In E. Blalock (ed.), *A Beginner's guide to Microarrays*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA.
20. **Bornscheuer, U. T.** 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties

- and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev* **26**:73-81.
21. **Bradford, B. B.** 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
 22. **Bradoo, S., R. K. Saxena, and R. Gupta.** 1999. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus spp.* *World J Microbiol Biotechnol* **15**:97-102.
 23. **Brady, S. F., C. J. Chao, and J. Clardy.** 2002. New natural product families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster. *J Am Chem Soc* **124**:9968-9969.
 24. **Brady, S. F., C. J. Chao, J. Handelsman, and J. Clardy.** 2001. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Org Lett* **3**:1981-1984.
 25. **Brady, S. F., and J. Clardy.** 2003. Synthesis of long-chain fatty acid enol esters isolated from an environmental DNA clone. *Org Lett* **5**:121-124.
 26. **Britt, A. J., N. C. Bruce, and C. R. Lowe.** 1992. Identification of a cocaine esterase in a strain of *Pseudomonas maltophilia*. *J Bacteriol* **174**:2087-2094.
 27. **Burton, S. G., D. A. Cowan, and J. M. Woodley.** 2002. The search for the ideal biocatalyst. *Nat Biotechnol* **20**:37-45.
 28. **Cameron, G. W., K. N. Jordan, P. J. Holt, P. B. Baker, C. R. Lowe, and N. C. Bruce.** 1994. Identification of a heroin esterase in *Rhodococcus sp.* strain H1. *Appl Environ Microbiol* **60**:3881-3883.
 29. **Chabeaud, P., A. de Groot, W. Bitter, J. Tommassen, T. Heulin, and W. Achouak.** 2001. Phase-variable expression of an operon encoding extracellular alkaline protease, a serine protease homolog, and lipase in *Pseudomonas brassicacearum*. *J Bacteriol* **183**:2117-2120.
 30. **Chahinian, H., L. Nini, E. Boitard, J. P. Dubes, L. C. Comeau, and L. Sarda.** 2002. Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids* **37**:653-662.
 31. **Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, and J. D. Thompson.** 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**:3497-3500.
 32. **Cho, J. C., and J. M. Tiedje.** 2002. Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* **68**:1425-1430.
 33. **Chou, T. F., P. Bieganski, K. Shilinski, J. Cheng, C. Brenner, and C. R. Wagner.** 2005. 31P NMR and genetic analysis establish hinT as the only *Escherichia coli* purine nucleoside phosphoramidase and as essential for growth under high salt conditions. *J Biol Chem* **280**:15356-15361.
 34. **Clark, J. S., and M. D. Middleton.** 2002. Synthesis of novel alpha-substituted and alpha,alpha-disubstituted amino acids by rearrangement of ammonium ylides generated from metal carbenoids. *Org Lett* **4**:765-768.
 35. **Cottrell, M. T., J. A. Moore, and D. L. Kirchman.** 1999. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **65**:2553-2557.
 36. **Courtois, S., C. M. Cappellano, M. Ball, F. X. Francou, P. Normand, G. Helyncx, A. Martinez, S. J. Kolvek, J. Hopke, M. S. Osburne, P. R. August, R. Nalin, M. Guerinneau, P. Jeannin, P. Simonet, and J. L. Pernodet.** 2003. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol* **69**:49-55.
 37. **Courtois, S., A. Frostegard, P. Goransson, G. Depret, P. Jeannin, and P. Simonet.** 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ Microbiol* **3**:431-439.
 38. **Cummings, L., L. Riley, L. Black, A. Souvorov, S. Resenchuk, I. Dondoshansky, and T. Tatusova.** 2002. Genomic BLAST: custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes. *FEMS Microbiol Lett* **216**:133-138.
 39. **Daniel, R.** 2005. The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol* **3**:470-478.
 40. **de la Torre, J. R., L. M. Christianson, O. Beja, M. T. Suzuki, D. M. Karl, J.**

-
- Heidelberg, and E. F. DeLong.** 2003. Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:12830-12835.
41. **Dechema, e. V.** 2004. Weisse Biotechnologie: Chancen für Deutschland. Positionspapier der Dechema e.V; Internet: www.dechema.de oder www.i-s-b.org/brennpunkt/041110.htm.
 42. **Degrassi, G., B. C. Okeke, C. V. Bruschi, and V. Venturi.** 1998. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Bacillus pumilus*. *Appl Environ Microbiol* **64**:789-792.
 43. **Denef, V. J., J. Park, J. L. Rodrigues, T. V. Tsoi, S. A. Hashsham, and J. M. Tiedje.** 2003. Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional genomics studies on bacterial communities. *Environ Microbiol* **5**:933-943.
 44. **DeSantis, G., Z. Zhu, W. A. Greenberg, K. Wong, J. Chaplin, S. R. Hanson, B. Farwell, L. W. Nicholson, C. L. Rand, D. P. Weiner, D. E. Robertson, and M. J. Burk.** 2002. An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. *J Am Chem Soc* **124**:9024-9025.
 45. **Desnuelle, P., L. Sarda, and G. Ailhaud.** 1960. Inhibition of pancreatic lipase by diethyl-p-nitrophenyl phosphate in emulsion. *Biochim Biophys Acta* **37**:570-571.
 46. **Dharmsthiti, S., and S. Luchai.** 1999. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *FEMS Microbiol Lett* **179**:241-246.
 47. **Dharmsthiti, S., J. Pratuangdejkul, G. T. Theeragool, and S. Luchai.** 1998. Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *J Gen Appl Microbiol* **44**:139-145.
 48. **Diaz-Torres, M. L., R. McNab, D. A. Spratt, A. Villedieu, N. Hunt, M. Wilson, and P. Mullany.** 2003. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1430-1432.
 49. **Dong, H., S. Gao, S. Han, and S. Cao.** 1999. Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media. *Biotechnol Appl Biochem* **30**:251-256.
 50. **Doolittle, W. F.** 1999. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* **284**:2124-2129.
 51. **Drew, R. E., and S. A. Wilson.** 1992. Regulation of amidase expression in *Pseudomonas aeruginosa*, p. 207-213. In E. Galli, S. Silver, and E. Witholt (ed.), *Pseudomonas: molecular biology and biotechnology*. American Society of Microbiology, Washington D.C., USA.
 52. **Duong, F., C. Soscia, A. Lazdunski, and M. Murgier.** 1994. The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system. *Mol Microbiol* **11**:1117-1126.
 53. **Eggert, T.** 2001. Die lipolytischen Enzyme LipA und LipB von *Bacillus subtilis*: Charakterisierung und Optimierung mit gerichteter Evolution. Dissertation, Universität Bochum.
 54. **Eggert, T., C. Leggewie, M. Puls, W. Streit, G. van Pouderooyen, B. W. Dijkstra, and K. E. Jaeger.** 2004. Novel biocatalysts by identification and design. *Biocatal Biotrans* **22**:139-144.
 55. **Eggert, T., G. Pencreac'h, I. Douchet, R. Verger, and K. E. Jaeger.** 2000. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur J Biochem* **267**:6459-6469.
 56. **Elend, C., C. Schmeisser, C. Leggewie, H. Steele, J. L. Reymond, K. E. Jaeger, and W. R. Streit.** 2005. Isolation and biochemical characterisation of two novel metagenome derived esterases as part of possible ancient antibiotic resistance clusters. Zur Veröffentlichung eingereicht.
 57. **Entcheva, P., W. Liebl, A. Johann, T. Hartsch, and W. R. Streit.** 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol* **67**:89-99.
 58. **Eschenfeldt, W. H., L. Stols, H. Rosenbaum, Z. S. Khambatta, E. Quaiterandall, S. Wu, D. C. Kilgore, J. D. Trent,**
-

- and M. I. Donnelly. 2001. DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductases. *Appl Environ Microbiol* **67**:4206-4214.
59. **EuropaBio.** 2003. White Biotechnology: Gateway to a more sustainable future. EuropaBio, Lyon.
 60. **Faber, K.** 2000. Biotransformations in organic chemistry, 2 ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
 61. **Farnaud, S., R. Tata, M. K. Sohi, T. Wan, P. R. Brown, and B. J. Sutton.** 1999. Evidence that cysteine-166 is the active-site nucleophile of *Pseudomonas aeruginosa* amidase: crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the enzyme. *Biochem J* **340**:711-714.
 62. **Felber, S.** 2001. Optimierung der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse. Dissertation, Universität Düsseldorf.
 63. **Festel, G., J. Knöll, H. Götz, and H. Zinke.** 2004. Der Einfluß der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie. *Chem. Ing. Tech.* **76**:307-312.
 64. **Fiedler, S., and R. Wirth.** 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal Biochem* **170**:38-44.
 65. **Figurski, D. H., and D. R. Helinski.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:1648-1652.
 66. **Frazzetto, G.** 2003. White biotechnology - The application of biotechnology to industrial production holds many promises for sustainable development, but many products still have to pass the test of economic viability. *Embo Rep.* **4**:835-837.
 67. **Friedman, A. M., S. R. Long, S. E. Brown, W. J. Buikema, and F. M. Ausubel.** 1982. Construction of a broad host range cosmid vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* **18**:289-296.
 68. **Fuchs, G.** 1999. Oxidation of organic compounds. In J. W. Lengeler, G. Drews, and H. G. Schlegel (ed.), *Biology of the Prokaryotes*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
 69. **Fuhrmann, M., L. Ferbitz, A. Hausherr, T. Schödl, and P. Hegemann.** 2003. Monitoring expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. <http://gcua.schoedl.de/sequential.html>.
 70. **Gabor, E. M., W. B. Alkema, and D. B. Janssen.** 2004. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ Microbiol* **6**:879-886.
 71. **Gabor, E. M., E. J. de Vries, and D. B. Janssen.** 2003. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol Ecol* **44**:153-163.
 72. **Ghigo, J. M., and C. Wandersman.** 1994. A carboxyl-terminal four-amino acid motif is required for secretion of the metalloprotease PrtG through the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion pathway. *J Biol Chem* **269**:8979-8985.
 73. **Gillespie, D. E., S. F. Brady, A. D. Bettermann, N. P. Cianciotto, M. R. Liles, M. R. Rondon, J. Clardy, R. M. Goodman, and J. Handelsman.** 2002. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**:4301-4306.
 74. **Goddard, J. P., and J. L. Reymond.** 2004. Enzyme activity fingerprinting with substrate cocktails. *J Am Chem Soc* **126**:11116-11117.
 75. **Goodner, B., G. Hinkle, S. Gattung, N. Miller, M. Blanchard, B. Qurollo, B. S. Goldman, Y. Cao, M. Askenazi, C. Halling, L. Mullin, K. Houmiel, J. Gordon, M. Vaudin, O. Iartchouk, A. Epp, F. Liu, C. Wollam, M. Allinger, D. Doughty, C. Scott, C. Lappas, B. Markelz, C. Flanagan, C. Crowell, J. Gurson, C. Lomo, C. Sear, G. Strub, C. Cielo, and S. Slater.** 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**:2323-2328.
 76. **Gottesman, S.** 2003. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**:565-587.

77. **Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom, and D. Hanahan.** 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4645-4649.
78. **Groisman, E. A., N. Pagratis, and M. J. Casadaban.** 1991. Genome mapping and protein coding region identification using bacteriophage Mu. *Gene* **99**:1-7.
79. **Gupta, R., N. Gupta, and P. Rathi.** 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:763-781.
80. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
81. **Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, and R. M. Goodman.** 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**:245-249.
82. **Hayes, W. S., and M. Borodovsky.** 1998. Deriving ribosomal binding site (RBS) statistical models from unannotated DNA sequences and the use of the RBS model for N-terminal prediction. *Pac Symp Biocomput*:279-290.
83. **Healy, F. G., R. M. Ray, H. C. Aldrich, A. C. Wilkie, L. O. Ingram, and K. T. Shanmugam.** 1995. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**:667-674.
84. **Hecht, H. J., H. Sobek, T. Haag, O. Pfeifer, and K. H. van Pee.** 1994. The metal-ion-free oxidoreductase from *Streptomyces aureofaciens* has an alpha/beta hydrolase fold. *Nat Struct Biol* **1**:532-537.
85. **Henke, E., and U. T. Bornscheuer.** 2002. Esterases from *Bacillus subtilis* and *B. stearothermophilus* share high sequence homology but differ substantially in their properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**:320-326.
86. **Henne, A., R. Daniel, R. A. Schmitz, and G. Gottschalk.** 1999. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* **65**:3901-3907.
87. **Henne, A., R. A. Schmitz, M. Bomeke, G. Gottschalk, and R. Daniel.** 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**:3113-3116.
88. **Henning, H., C. Leggewie, T. Eggert, M. Pohl, and K. E. Jaeger.** 2005. Development of a growth selection system for detection of thiamine diphosphate-dependent enzymes and isolation of a new Benzoylformiate decarboxylase. In *Vorbereitung*.
89. **Herrero, M., V. de Lorenzo, B. Ensley, and K. N. Timmis.** 1993. A T7 RNA polymerase-based system for the construction of *Pseudomonas* strains with phenotypes dependent on TOL-meta pathway effectors. *Gene* **134**:103-106.
90. **Hugenholtz, P., B. M. Goebel, and N. R. Pace.** 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**:4765-4774.
91. **Hugenholtz, P., C. Pitulle, K. L. Hershberger, and N. R. Pace.** 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* **180**:366-376.
92. **Hummel, W., and M. R. Kula.** 1989. Dehydrogenases for the Synthesis of Chiral Compounds. *Eur J Biochem* **184**:1-13.
93. **IUBMB.** 1992. International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Enzyme Nomenclature.
94. **Jaeger, K. E., B. W. Dijkstra, and M. T. Reetz.** 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* **53**:315-351.
95. **Jaeger, K. E., and T. Eggert.** 2004. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr Opin Biotechnol* **15**:305-313.
96. **Jaeger, K. E., and T. Eggert.** 2002. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**:390-397.
97. **Jaeger, K. E., S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. Vanheuver, and O. Misset.**

-
1994. Bacterial Lipases. FEMS Microbiol Rev **15**:29-63.
98. **Jaeger, K. E., S. Ransac, H. B. Koch, F. Ferrato, and B. W. Dijkstra.** 1993. Topological Characterization and Modeling of the 3d Structure of Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett **332**:143-149.
 99. **Jaeger, K. E., and M. T. Reetz.** 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol **16**:396-403.
 100. **Jaeger, K. E., B. Schneidinger, F. Rosenau, M. Werner, D. Lang, B. W. Dijkstra, K. Schimossek, A. Zonta, and M. T. Reetz.** 1997. Bacterial lipases for biotechnological applications. J Mol Catal, B Enzym **3**:3-12.
 101. **Jeng, S. T., J. F. Gardner, and R. I. Gumpert.** 1990. Transcription termination by bacteriophage T7 RNA polymerase at *rho*-independent terminators. J Biol Chem **265**:3823-3830.
 102. **Kalia, V. C., A. Chauhan, G. Bhattacharyya, and Rashmi.** 2003. Genomic databases yield novel bioplastic producers. Nat Biotechnol **21**:845-846.
 103. **Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Kramer, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, B. Mockel, W. Pfefferle, A. Puhler, D. A. Rey, C. Ruckert, O. Rupp, H. Sahm, V. F. Wendisch, I. Wiegrabe, and A. Tauch.** 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. J Biotechnol **104**:5-25.
 104. **Kane, M. D., T. A. Jatkoe, C. R. Stumpf, J. Lu, J. D. Thomas, and S. J. Madore.** 2000. Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. Nucleic Acids Res **28**:4552-4557.
 105. **Kanhere, A., and M. Bansal.** 2005. A novel method for prokaryotic promoter prediction based on DNA stability. BMC Bioinformatics **6**:1.
 106. **Kawai, E., A. Idei, H. Kumura, K. Shimazaki, H. Akatsuka, and K. Omori.** 1999. The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33. Biochim Biophys Acta **1446**:377-382.
 107. **Kazlauskas, R. J.** 1994. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. Trends Biotechnol **12**:464-472.
 108. **Kelley, K. C., K. J. Huestis, D. A. Austen, C. T. Sanderson, M. A. Donoghue, S. K. Stickel, E. S. Kawasaki, and M. S. Osburne.** 1995. Regulation of sCD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*. Gene **156**:33-36.
 109. **Kelly, M., and P. H. Clarke.** 1962. An Inducible Amidase Produced by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. **27**:305-316.
 110. **Kim, M. J., Y. I. Chung, Y. K. Choi, H. K. Lee, D. Kim, and J. Park.** 2003. (S)-Selective dynamic kinetic resolution of secondary alcohols by the combination of subtilisin and an aminocyclopentadienylruthenium complex as the catalysts. J Am Chem Soc **125**:11494-11495.
 111. **Kim, U. J., B. W. Birren, T. Slepak, V. Mancino, C. Boysen, H. L. Kang, M. I. Simon, and H. Shizuya.** 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. Genomics **34**:213-218.
 112. **Kingsley, M. T., T. A. Straub, D. R. Call, D. S. Daly, S. C. Wunschel, and D. P. Chandler.** 2002. Fingerprinting closely related *Xanthomonas pathovars* with random nonamer oligonucleotide microarrays. Appl Environ Microbiol **68**:6361-6370.
 113. **Kizaki, N., Y. Yasohara, J. Hasegawa, M. Wada, M. Kataoka, and S. Shimizu.** 2001. Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. Appl Microbiol Biotechnol **55**:590-595.
 114. **Knietsch, A., S. Bowien, G. Whited, G. Gottschalk, and R. Daniel.** 2003.
-

- Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* **69**:3048-3060.
115. **Knietsch, A., T. Waschowitz, S. Bowien, A. Henne, and R. Daniel.** 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**:1408-1416.
 116. **Knietsch, A., T. Waschowitz, S. Bowien, A. Henne, and R. Daniel.** 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**:46-56.
 117. **Kojima, Y., M. Yokoe, and T. Mase.** 1994. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* Ak102. *Biosci Biotech Bioch* **58**:1564-1568.
 118. **Kok, R. G., V. M. Christoffels, B. Vosman, and K. J. Hellingwerf.** 1993. Growth-Phase-Dependent Expression of the Lipolytic System of *Acinetobacter-Calcoaceticus* Bd413 - Cloning of a Gene Encoding One of the Esterases. *J Gen Microbiol* **139**:2329-2342.
 119. **Kouker, G., and K. E. Jaeger.** 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* **53**:211-213.
 120. **Kovach, M. E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop, 2nd, and K. M. Peterson.** 1994. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**:800-802.
 121. **Krsek, M., and E. M. Wellington.** 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J Microbiol Methods* **39**:1-16.
 122. **Kula, M. R., and C. Wandrey.** 1987. Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration. *Methods Enzymol* **136**:9-21.
 123. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
 124. **Lang, D. A., M. L. M. Mannesse, G. H. De Haas, H. M. Verheij, and B. W. Dijkstra.** 1998. Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem* **254**:333-340.
 125. **Lange, S., A. Musidlowska, C. Schmidt-Dannert, J. Schmitt, and U. T. Bornscheuer.** 2001. Cloning, functional expression, and characterization of recombinant pig liver esterase. *Chembiochem* **2**:576-582.
 126. **Lee, D., Y. Koh, K. Kim, B. Kim, H. Choi, D. Kim, M. T. Suhartono, and Y. Pyun.** 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol Lett* **179**:393-400.
 127. **Lee, S. W., K. Won, H. K. Lim, J. C. Kim, G. J. Choi, and K. Y. Cho.** 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**:720-726.
 128. **Leggewie, C., H. Henning, C. Schmeisser, W. R. Streit, and K. E. Jaeger.** 2005. A novel transposon for functional expression of DNA libraries. Zur Veröffentlichung eingereicht.
 129. **Liebeton, K., and J. Eck.** 2004. Identification and Expression in *E. coli* of Novel Nitrile Hydratases from the Metagenome. *Eng Life Sci* **4**:557-562.
 130. **Liese, A., K. Seelbach, and C. Wandrey.** 2005. *Industrial Biotransformations*, 2 ed. Wiley-VCH, Weinheim.
 131. **Lindroos, K., U. Liljedahl, M. Raitio, and A. C. Syvanen.** 2001. Minisequencing on oligonucleotide microarrays: comparison of immobilisation chemistries. *Nucleic Acids Res* **29**:E69-69.
 132. **Longhi, S., and C. Cambillau.** 1999. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1441**:185-196.
 133. **Lorenz, P., and J. Eck.** 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* **3**:510-516.

134. **Lorenz, P., J. Eck, and H. Zinke.** 2004. Technologien zum Erschließen nicht kultivierbarer Mikroorganismen. *Laborwelt* **5**:14-16.
135. **Lorenz, P., K. Liebeton, F. Niehaus, and J. Eck.** 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnol* **13**:572-577.
136. **Lorenz, W. W., and J. Wiegel.** 1997. Isolation, analysis, and expression of two genes from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL YS485: a beta-xylosidase and a novel acetyl xylan esterase with cephalosporin C deacetylase activity. *J Bacteriol* **179**:5436-5441.
137. **MacNeil, I. A., C. L. Tiong, C. Minor, P. R. August, T. H. Grossman, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, T. Phillips, S. Narula, R. Sundaramoorthi, A. Tyler, T. Aldredge, H. Long, M. Gilman, D. Holt, and M. S. Osburne.** 2001. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:301-308.
138. **Majernik, A., G. Gottschalk, and R. Daniel.** 2001. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na⁽⁺⁾(Li⁽⁺⁾)/H⁽⁺⁾ antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. *J Bacteriol* **183**:6645-6653.
139. **Makrides, S. C.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**:512-538.
140. **Martinez, A., S. J. Kolvek, C. L. Yip, J. Hopke, K. A. Brown, I. A. MacNeil, and M. S. Osburne.** 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**:2452-2463.
141. **McKinsey.** 2003. Industrial Biotechnology. Internet: www.mckinsey.com.
142. **Moore, J. T., A. Uppal, F. Maley, and G. F. Maley.** 1993. Overcoming Inclusion Body Formation in a High-Level Expression System. *Protein Expres Purif* **4**:160-163.
143. **Norman, R. A., C. L. Poh, L. H. Pearl, B. P. O'Hara, and R. E. Drew.** 2000. Steric hindrance regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* amidase operon. *J Biol Chem* **275**:30660-30667.
144. **Norris, T. B., J. M. Wraith, R. W. Castenholz, and T. R. McDermott.** 2002. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Appl Environ Microbiol* **68**:6300-6309.
145. **Nthangeni, M. B., H. Patterson, A. van Tonder, W. P. Vergeer, and D. Litthauer.** 2001. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme Microb Technol* **28**:705-712.
146. **Ogram, A., G. S. Saylor, and T. Barkay.** 1987. The Extraction and Purification of Microbial DNA from Sediments. *J Microbiol Methods* **7**:57-66.
147. **Pelletier, I., and J. Altenbuchner.** 1995. A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology* **141**:459-468.
148. **Petersen, E. I., G. Valinger, B. Solkner, G. Stubenrauch, and H. Schwab.** 2001. A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to beta-lactamases and DD-peptidases. *J Biotechnol* **89**:11-25.
149. **Peterson, G. L.** 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**:346-356.
150. **Piel, J.** 2002. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:14002-14007.
151. **Porath, J., J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage.** 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**:598-599.
152. **Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, and J. C. Murrell.** 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**:646-649.
153. **Radajewski, S., G. Webster, D. S. Reay, S. A. Morris, P. Ineson, D. B. Nedwell, J. I.**

- Prosser, and J. C. Murrell.** 2002. Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiology* **148**:2331-2342.
154. **Rappe, M. S., and S. J. Giovannoni.** 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:369-394.
155. **Rathbone, D. A., P. J. Holt, C. R. Lowe, and N. C. Bruce.** 1997. Molecular analysis of the *Rhodococcus* sp. strain H1 her gene and characterization of its product, a heroin esterase, expressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **63**:2062-2066.
156. **Reese, M. G.** 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* **26**:51-56.
157. **Reetz, M. T.** 2001. Combinatorial and evolution-based methods in the creation of enantioselective catalysts. *Angew Chem Int Ed* **40**:284-310.
158. **Reetz, M. T.** 2002. Directed evolution of selective enzymes and hybrid catalysts. *Tetrahedron* **58**:6595-6602.
159. **Religio, A., C. Schwager, A. Richter, W. Ansorge, and J. Valcarcel.** 2002. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* **30**:51.
160. **Rhee, J. K., D. G. Ahn, Y. G. Kim, and J. W. Oh.** 2005. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Appl Environ Microbiol* **71**:817-825.
161. **Richardson, T. H., X. Tan, G. Frey, W. Callen, M. Cabell, D. Lam, J. Macomber, J. M. Short, D. E. Robertson, and C. Miller.** 2002. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *J Biol Chem* **277**:26501-26507.
162. **Riese, J.** 2003. Surfing the third wave: new value chain creation opportunities in industrial biotechnology. McKinsey & Company, Frankfurt.
163. **Riesenfeld, C. S., P. D. Schloss, and J. Handelsman.** 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* **38**:525-552.
164. **Roberts, S. M.** 2004. Biocatalysts in synthetic organic chemistry - Preface. *Tetrahedron* **60**:499-500.
165. **Rochelle, P.** 2001. Extraction of nucleic acids from environmental samples. In *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
166. **Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tjong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, and R. M. Goodman.** 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2541-2547.
167. **Rosenau, F., and K. E. Jaeger.** 2003. Overexpression of biocatalysts in *Pseudomonas*. In A. Svendsen (ed.), *Enzyme functionality: Design, Engineering and Screening*. Marcel Decker, New York, USA.
168. **Rouhi, A. M.** 2004. Chiral chemistry. *Chem Eng News* **82**:47-62.
169. **Roux, K. H.** 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl* **4**:185-194.
170. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
171. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
172. **Santosa, D. A.** 2001. Rapid extraction and purification of environmental DNA for molecular cloning applications and molecular diversity studies. *Mol Biotechnol* **17**:59-64.
173. **Sarda, L., and P. Desnuelle.** 1958. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim Biophys Acta* **30**:513-521.
174. **Schein, C. H., and M. H. M. Noteborn.** 1988. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by

- lower growth temperature. *Biotechnology* **6**:291-294.
175. **Schmeisser, C.** 2005. Metagenomanalyse eines Multispezies-Biofilms: Biochemische Charakterisierung und Kristallisierung der ersten multimeren Esterase aus einem bisher nicht kultivierten Mikroorganismus. Dissertation, Universität Göttingen.
 176. **Schmeisser, C., C. Stockigt, C. Raasch, J. Wingender, K. N. Timmis, D. F. Wenderoth, H. C. Flemming, H. Liesegang, R. A. Schmitz, K. E. Jaeger, and W. R. Streit.** 2003. Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl Environ Microbiol* **69**:7298-7309.
 177. **Schmid, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, and B. Witholt.** 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**:258-268.
 178. **Schmidt, T. M., E. F. DeLong, and N. R. Pace.** 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol* **173**:4371-4378.
 179. **Schmidt-Dannert, C., H. Sztajer, W. Stocklein, U. Menge, and R. D. Schmid.** 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochim Biophys Acta* **1214**:43-53.
 180. **Schoemaker, H. E., D. Mink, and M. G. Wubbolts.** 2003. Dispelling the myths - biocatalysis in industrial synthesis. *Science* **299**:1694-1697.
 181. **Schrag, J. D., Y. Li, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, H. J. Hecht, R. Schmid, D. Schomburg, T. J. Rydel, J. D. Oliver, L. C. Strickland, C. M. Dunaway, S. B. Larson, J. Day, and A. McPherson.** 1997. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* **5**:187-202.
 182. **Sebat, J. L., F. S. Colwell, and R. L. Crawford.** 2003. Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. *Appl Environ Microbiol* **69**:4927-4934.
 183. **Selinger, D. W., R. M. Saxena, K. J. Cheung, G. M. Church, and C. Rosenow.** 2003. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res* **13**:216-223.
 184. **Shalon, D., S. J. Smith, and P. O. Brown.** 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* **6**:639-645.
 185. **Shao, W., and J. Wiegel.** 1995. Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. *Appl Environ Microbiol* **61**:729-733.
 186. **Simon, R., M. O'Connell, M. Labes, and A. Puhler.** 1986. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Meth Enzymol* **118**:640-659.
 187. **Stahl, D. A., D. J. Lane, G. J. Olsen, and N. R. Pace.** 1984. Analysis of Hydrothermal Vent-Associated Symbionts by Ribosomal-RNA Sequences. *Science* **224**:409-411.
 188. **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-964.
 189. **Straathof, A. J., S. Panke, and A. Schmid.** 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* **13**:548-556.
 190. **Streit, W. R., R. Daniel, and K. E. Jaeger.** 2004. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **15**:285-290.
 191. **Streit, W. R., and R. A. Schmitz.** 2004. Metagenomics - the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol* **7**:492-498.
 192. **Studier, F. W.** 1991. Use of bacteriophage T7 lysozym to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* **219**:37-47.

193. **Studier, F. W., and B. A. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**:113-130.
194. **Sullivan, F.** 2003. Advances in Biotechnology for the Manufacture of Chemicals: Part 1 (D481); Advances in Biotechnology for Chemical Manufacture: Part 2 (D482). Technical Insights; Internet: www.frost.com, www.technical-insights.frost.com.
195. **Sunna, A., L. Hunter, C. A. Hutton, and P. L. Bergquist.** 2002. Biochemical characterization of a recombinant thermoalkalophilic lipase and assessment of its substrate enantioselectivity. *Enzyme Microb Technol* **31**:472-476.
196. **Szewzyk, U., R. Szewzyk, W. Manz, and K. H. Schleifer.** 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annu Rev Microbiol* **54**:81-127.
197. **Tan, Y., and K. J. Miller.** 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Appl Environ Microbiol* **58**:1402-1407.
198. **Toone, E. J., M. J. Werth, and J. B. Jones.** 1990. Enzymes in organic-synthesis: active-site model for interpreting and predicting the specificity of pig-liver esterase. *J Am Chem Soc* **112**:4946-4952.
199. **Torsvik, V., F. L. Daae, R. A. Sandaa, and L. Ovreas.** 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol* **64**:53-62.
200. **Torsvik, V., and L. Ovreas.** 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **5**:240-245.
201. **Torsvik, V., R. Sorheim, and J. Goksoyr.** 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities - A review. *J Ind Microbiol* **17**:170-178.
202. **Turner, N. J.** 2004. Enzyme catalysed deracemisation and dynamic kinetic resolution reactions. *Curr Opin Chem Biol* **8**:114-119.
203. **Tyson, G. W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E. E. Allen, R. J. Ram, P. M. Richardson, V. V. Solovyev, E. M. Rubin, D. S. Rokhsar, and J. F. Banfield.** 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**:37-43.
204. **Uchiyama, T., T. Abe, T. Ikemura, and K. Watanabe.** 2005. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol* **23**:88-93.
205. **Vanoort, M. G., A. M. T. J. Deveer, R. Dijkman, M. L. Tjeenk, H. M. Verheij, G. H. Dehaas, E. Wenzig, and F. Gotz.** 1989. Purification and Substrate-Specificity of *Staphylococcus hyicus* Lipase. *Biochemistry* **28**:9278-9285.
206. **Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, and H. O. Smith.** 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**:66-74.
207. **Verger, R.** 1997. 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol* **15**:32-38.
208. **Voget, S., C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K. E. Jaeger, and W. R. Streit.** 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol* **69**:6235-6242.
209. **Wagner, U. G., E. I. Petersen, H. Schwab, and C. Kratky.** 2002. EstB from *Burkholderia gladioli*: a novel esterase with a beta-lactamase fold reveals steric factors to discriminate between esterolytic and beta-lactam cleaving activity. *Protein Sci* **11**:467-478.
210. **Wang, G. Y., E. Graziani, B. Waters, W. Pan, X. Li, J. McDermott, G. Meurer, G. Saxena, R. J. Andersen, and J. Davies.** 2000. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Org Lett* **2**:2401-2404.
211. **Wang, Y. X., K. C. Srivastava, G. J. Shen, and H. Y. Wang.** 1995. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, Strain A30-1 (Atcc-53841). *J Ferment Bioeng* **79**:433-438.
212. **Wellington, E. M., A. Berry, and M. Krsek.** 2003. Resolving functional diversity

- in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Curr Opin Microbiol* **6**:295-301.
213. **Wenderoth, D. F., B. Ferslev, G. Macarri, G. Molinari, H. Lunsdorf, and K. N. Timmis.** 2003. Leitbacteria of microbial biofilm communities causing occlusion of biliary stents. *Environ. Microbiol.* **5**:859-866.
214. **Whitman, W. B., D. C. Coleman, and W. J. Wiebe.** 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:6578-6583.
215. **Wilson, S., and R. Drew.** 1991. Cloning and DNA sequence of *amiC*, a new gene regulating expression of the *Pseudomonas aeruginosa* aliphatic amidase, and purification of the *amiC* product. *J Bacteriol* **173**:4914-4921.
216. **Winkler, U. K., and M. Stuckmann.** 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **138**:663-670.
217. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**:221-271.
218. **Wu, L., D. K. Thompson, G. Li, R. A. Hurt, J. M. Tiedje, and J. Zhou.** 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl Environ Microbiol* **67**:5780-5790.
219. **Wu, Z. L., and Z. Y. Li.** 2003. Practical synthesis of optically active alpha, alpha-disubstituted malonamic acids through asymmetric hydrolysis of malonamide derivatives with *Rhodococcus* sp. CGMCC 0497. *J Org Chem* **68**:2479-2482.
220. **Yannish-Perron, C., J. Vieria, and J. Messing.** 1985. Improved M13 cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
221. **Zammatteo, N., L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi, and J. Remacle.** 2000. Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal Biochem* **280**:143-150.
222. **Zhou, J., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje.** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**:316-322.
223. **Zhou, J., and D. K. Thompson.** 2002. Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Curr Opin Biotechnol* **13**:204-207.
224. **Zhu, L. M., and M. C. Tedford.** 1990. Applications of Pig-Liver Esterases (Ple) in Asymmetric-Synthesis. *Tetrahedron* **46**: 6587-6611.

7 Anhang

7.1 Sequenzen der neu identifizierten Biokatalysatoren

Die Sequenzen von LipA, LipB, EstCE und EstA3 finden sich im Internet unter: <http://wwwuser.gwdg.de/~biofilm/genemining.htm>

a)
ATGACCGATCCCTATGTGCGCCCCGATGTGGCGATGTTTCTGGCTTTCCTTAACAATGCGCCGG
 GACCAAAGCTGCACGAATTAAGCGCGCCCGAAGCGCGGATGGTGCAAAATGCCATGCGCGAC
 ATGGCCGACGCGCCGGTTGGTGAGCTTGCCGTTATGCGCGATCTGGAAATTCGGGGGCCAGCC
 GGAACCATAATGGCGCGGCTTTACGATAAGCAGCCGGGGCGAGGCTCTGGTCCGGCGATGGTA
 TTCTTCCACGGTGGCGGGTTCGTTATCGGCAACATCCATACGTACGAACCCTTTTGCGCCGAGG
 TCGCGCGCCTACTCGACCTTCCAGTCATTTCCGGTCGAATACCGGCTTGGGCCGGAATCTCCATT
 CCCC GCCGCTTCGAGGATTGCGAAGCTGCGGCGCGCTGGGTAGCCAGCAAGCCCGAAGCATT
 GGGCTTTGATGTTTCCGGCCTCATCCTGTCGGGCGACAGTGCAGGCGGCAACCTCACCATTTCG
 ACAAGCATGGCGTTGCGCGACGTTGCAGCCGGGGTGCCAGTAATCGCCCAAATGCCGATCTAT
 CCGGTGGTGACACTCGATCCGGACTGGCCCAGCATGCGCGACTTTGCCGACGGCTATTTACTCA
 CTGCCGAGCTCATTCAATGGTTCGGCGACGGGCATGGCGCAAGCGGCGAGGATTATCGGACGC
 ATCCGCTCGACTTCGACCAGTCGGGAATGCCGCCAACGGTGATTACCACGGCAAGCCTCGATC
 CGCTGCGCGATCAGGGCATGGCCTATTTGAAAAGCTCAAAGCCGCTGGAGTCCGCGCCGAAC
 ATATCAGCGCCGAGGGTAATATCCACGGCCATATCAATGTACGCAAAGGCATTCCGTCGAGCC
 AGCAGGATGTAGAAGGTTATGTTACCGCGCTAACGGCGATGCTGGCCGGGGTTATGGCAGAAG
CATGA

b)
 MTDPYVRPDVAMFLAFLNNAPGPKLHELSAPEARMVQNAMRDMADAPVGELAVMRDLEIPGPAG
 TIMARLYDKQPGRSGPAMVFFHGGFVIGNIHTYEPFCAEVARLLDLPVISVEYRLGPESFPAAFE
 DCEAAARWVASKPEALGFDVSLILSGDSAGGNLTISTSMALRDVAAGVPVIAQMPIYPVVTLDPD
 WPSMRDFADGYLLTAELIQWFGDGHGASGEDYRTHPLDFDQSGMPPTVITTASLDPLRDQGMAYF
 EKLKAAGVRAEHISAEGNIHGHINVRKGIPSSQDVEGYVTALTAMLAGVMAEA.

Abb. 34: Nukleotidsequenz (a) und Aminosäuresequenz (b) von EstCL. Start-, bzw. Stopcodon sowie das putative Pentapeptid des aktiven Zentrums sind unterstrichen.

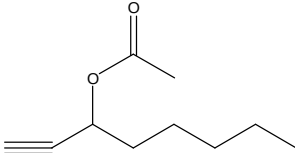
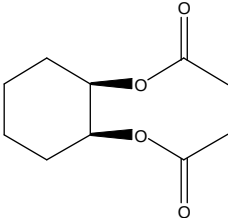
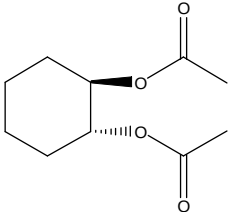
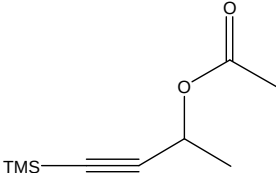
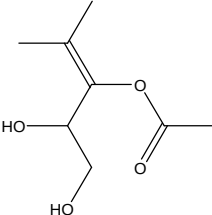
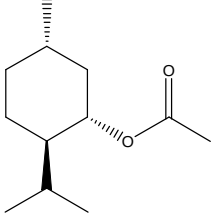
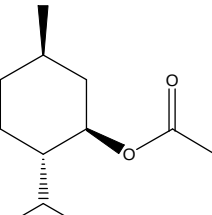
a)
ATGAAAAGAAAAACAATCTTCTCCCGTTTGTCGTTTGCTGCTTTGGGATTGTTTGCTGTCGCGA
 CGATTGCGCTGGATGCAAAGGCGGCAACCACCTGTCCTGCAGGCGCTATCTGCCGTTATGAAG
 AGGCGCCGGGCTCATAACAGCGGCAACGGCCCCCTATACGGTGAGAAGTTACACGCTGTCCAGAT
 TGCAGACGCCGGGCGGCGCTACCGTTTATTACCGTCCAATGCCAGGCCGCCATTCTCGGGCGT
 CGTTTTCACTCCCCCTATAACGGCATCCAGTCCATGTTTGACAGCCTGGGGCCCTTTCTTTGCGT
 CGCACGGTATTGTGATGGTGACCATGGATACCAACACCACGCTGGACACGGTGGACCAGCGCG
 CGAGCCAGCAGAAGCAGGTACTGGATGCGCTGAAAAGGGAAAATACCCGCTCCGCCAGTGCG
 TTGTATGGCAAGCTGAATACGGCGCGCCTGGGTGCGGTGGGCTGGTTCGATGGGTGGCGGCGCC
 ACTTGGATCAACTCTGCTGAATATGCCGACTGAAGAGCGCCATGTCGCTGGCGGGACACAAT
 CTGACAACGGTGGATATCGATTCCAGAGGTGGCAACACACGCATTCCCACCCTGATTCTGAAT
 GGCGCGCTTGATCTCACCTATCTGGGTGGGTGGGCCAGTCCGATGGCGTCTACAATAATATTC
 GCAGTGGTGTGCCAAGGTGTTTATGAAGTGTGAGCGCGGGCCATTTGCCTGGGGTTCTCC
 GACATCAGCCAATCGGGCGGTTGCCGGCATTGCGCTGGCGTTCCACAAGACTTTTCTGGATGGT
 GACACGCGCTGGGTGAGTTACATCAAGCGCCCCAGCTCTGATGTGTCCAAGTGGGCGACTGCA
 AGTTTGCCGAGTAA

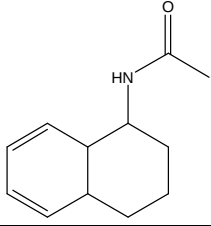
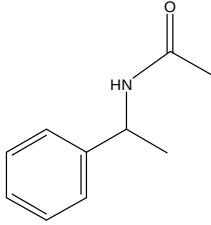
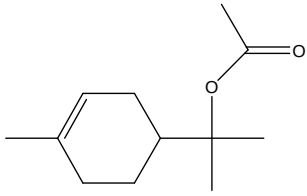
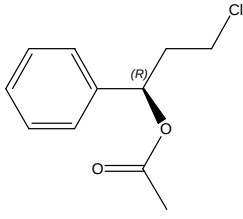
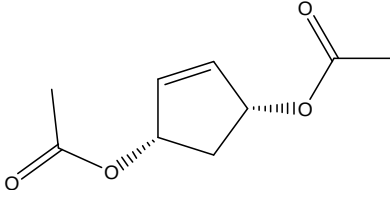
b)
 MKRKTI FSR L SFAALGLFAVATIALDAKAATTC PAGAICRYEEAPGSYSGNGPYTVRSYTL SRLQTP
 GGATVYYPSNARPPFSGVVFTPPYTGIQSMFAAWGPFFASHGIVMTMDTNTTLDTV DQRASQQK
 QVLDALKRENTRSASALYGKLN TARGAVGWSMGGGATWINS AEYAGLKSAMSLAGHNLT TTDI
 DSRGGNTRIPTLILNGALDLTYLGGLGQSDGVYNNIRSGVPKVFYEVSSAGHFAWGSPTSANRAVA
 GIALAFHKTF LDGDTRWVS YIKRPSSDVSKWATASLP O.

Abb. 35: Nukleotidsequenz (a) und Aminosäuresequenz (b) von LCL2. Start-, bzw. Stopcodon sowie zwei für das putative Pentapeptid des aktiven Zentrums in Frage kommende Sequenzen sind unterstrichen.

7.2 Strukturformeln

Tab. 19: Strukturformeln der bei der gaschromatographischen Analyse verwendeten Substrate.

Substratname	Strukturformel
Essigsäureester v. (+/-)-1-Octin-3-ol	
Essigsäureester v. <i>cis</i> -1,2-Cyclohexandiol	
Essigsäureester v. <i>trans</i> -1,2-Cyclohexandiol	
Essigsäureester v. Trimethylsilylbutinol	
Isopropylidenglycerinacetat (rac)	
(+)-Menthylacetat	
(-)-Menthylacetat	

Substratname	Strukturformel
Essigsäureester von Tetrahydronaphthylamin	
Essigsäureester v. Phenylethylamin	
Terpinylacetat	
Essigsäureester v. R-(+)-3-Chlor-1-Phenyl-1-Propanol	
cis-3,5-Diacetoxy-1-Cyclopenten	

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger danke ich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas im Rahmen des BMBF-Projektes „Genomiks“, die konstruktiven Diskussionen und die mir gebotenen Möglichkeiten, frei und selbstständig meinen Ideen nachzugehen.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. C. P. Hollenberg bedanken.

Ich bedanke mich für die finanzielle Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projekts „GenoMiks“, Netzwerk Göttingen.

Herrn Prof. Dr. W. R. Streit (Universität Duisburg-Essen) danke ich für die ausgezeichnete Kooperation und die ausgesprochen freundliche, zeitweilige Integration in seine Arbeitsgruppe am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen im Rahmen des „GenoMik“ Netzwerks Göttingen. Den Herren Prof. Dr. G. Gottschalk und Prof. Dr. W. Liebl danke ich hierbei für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Frau Dr. C. Schmeißer, Frau S. Voget und Herrn C. Elend danke ich für die tolle Zusammenarbeit und die freundschaftliche Aufnahme in dieses Labor und in Göttingen allgemein.

Herrn Dr. A. Ehrenreich (Universität Göttingen) danke ich für die fruchtbare Kooperation im Bereich der Microarrays und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Labors von Herrn Prof. Dr. J.-L. Reymond an der Universität Bern (Schweiz), wo das in dieser Arbeit dargestellte enzymatische Fingerprinting der drei Esterasen durchgeführt wurde.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Hummel (Universität Düsseldorf) möchte ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Bereich des Dehydrogenase-Screenings bedanken.

Den Herren Prof. Dr. M.T. Reetz, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung (Mülheim a. d. Ruhr) und Prof. Dr. M. Müller (Universität Freiburg) danke ich für die Synthese diverser enantiomerenreiner Substrate.

Den Mitarbeitern des Instituts für molekulare Enzymtechnologie danke ich für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima während meiner gesamten Promotionszeit. Mein besonderer Dank gilt Frau S. Heckmann und Herrn Dr. T. Eggert für die aufmerksame und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau V. Svensson für die ausgezeichnete Hilfe bei der Durchführung der Experimente bedanken.

Ausgesprochen dankbar bin ich allen, die mir oft Gastfreundschaft in Jülich und Umgebung gewährt haben; ich möchte die dadurch gewonnenen oder gefestigten Freundschaften nicht missen.

Mein größter Dank aber gilt meiner Familie für die Unterstützung und Ermunterung während der gesamten Promotionszeit.

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 25.11.2005

Christian Leggewie
