

**Mikrobieller Abbau von Chloraromaten:
Gene des *ortho*- und *meta*-Weges**

Dem Fachbereich Chemie an der Bergischen Universität Wuppertal
vorgelegte Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

eingereicht von
Dipl.-Chem. Markus Göbel

Wuppertal
im Mai 2003

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden im Zeitraum von Juli 1999 bis März 2002 an der Bergischen Universität Wuppertal am Lehrstuhl für Chemische Mikrobiologie des Fachbereichs 9 in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Walter Reineke angefertigt.

Herrn Professor Dr. Walter Reineke gilt mein besonderer Dank für die interessante Aufgabenstellung, sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und zahlreichen Anregungen.

Herrn Privatdozent Dr. Eberhard Schmidt danke ich für die Übernahme des Koreferates und die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Herrn Dr. Stefan R. Kaschabek danke ich für die Bereitstellung von Stamm SK1.

Herrn Dr. Udo Pagga (BASF Ludwigshafen) danke ich für die Bereitstellung einer Belebtschlammprobe.

Herr Dipl.-Chem. Oliver Kranz danke ich für die Unterstützung bei Enzymtests und die Durchführung der Messungen der Turnover-Kapazitäten.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Reineke und Piepersberg für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir den Rücken frei gehalten haben, wann immer es die Umstände erforderten.

Bärbel Eberhard und Fiona danke ich für den geduldigen Beistand bei der Erstellung dieser Arbeit.

Alina Göbel danke ich dafür, dass ich sie kennen lernen durfte.

Xerxes von der Neesenburg danke ich für seine Anwesenheit beim Lernen während meines Studiums.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

Göbel, M., K. Kassel-Çati, E. Schmidt und W. Reineke. **2002**. Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13: cloning, characterization, and analysis of sequences coding 3-oxoadipate:succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase. *J. Bacteriol.* **184**:216–223.

Wer vom Ziel nichts weiß, wird den Weg nicht finden.

Christian Morgenstern

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis.....	I
	Zusammenfassung.....	V
	Summary	VII
	Abkürzungen	IX
1	Einleitung.....	1
1.1	Der Abbau von Aromaten und Chloraromaten über den 3-Oxoadipat-Weg bzw. modifizierten <i>ortho</i> -Weg	2
1.2	Der Abbau von Aromaten und Chloraromaten über den <i>meta</i> -Weg.....	6
1.3	Ziele und Aufgabenstellungen der Arbeit	9
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Bakterienstämme und Plasmide	10
2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide für die Untersuchungen des modifizierten <i>ortho</i> -Weges	10
2.1.2	Bakterienstämme und Plasmide für die Untersuchungen des <i>meta</i> -Weges	11
2.2	Oligonukleotide	13
2.2.1	Oligonukleotide bei den Untersuchungen des modifizierten <i>ortho</i> -Weges	13
2.2.2	Oligonukleotide bei den Untersuchungen des <i>meta</i> -Weges.....	13
2.3	Stammhaltung.....	14
2.4	Chemikalien, Medienbestandteile und Enzyme	15
2.4.1	Chemikalien	15
2.4.2	Medienbestandteile.....	15
2.4.3	Enzyme.....	15
2.5	Kits	15
2.6	Verschiedenes.....	16

2.7	Sequenzanalyse und Computerprogramme.....	16
2.8	Geräte	17
2.9	Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> und Pseudomonaden.....	18
2.9.1	LB-Medium.....	18
2.9.2	SOB-Medium	18
2.9.3	SOC-Medium	19
2.9.4	Minimalmedium.....	19
2.9.5	King-Agar B.....	19
2.10	Isolierung von Chlorbenzol-Verwertern	20
2.10.1	Isolierung ohne Selektion.....	20
2.10.2	Anreicherung mit verlangsamter Chlorbenzoldiffusion.....	21
2.11	Isolierung von DNA	22
2.11.1	Isolierung plasmidischer DNA aus <i>E. coli</i>	22
2.11.2	Isolierung von Gesamt-DNA	22
2.12	Enzymatische Hydrolyse von DNA	23
2.13	Gelelektrophorese.....	23
2.14	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	23
2.15	Quantifizierung von DNA.....	23
2.16	Klonierung von DNA	24
2.16.1	Ligation von DNA mit Plasmid-DNA	24
2.16.1.1	Herstellung von transformationskompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	24
2.16.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α	25
2.16.2	Verwendung von Klonierungskits und Aufarbeitung der eingesetzten DNA..	25
2.17	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.18	Enzymaktivitäten.....	27
2.18.1	Enzymaktivitäten des unteren <i>ortho</i> -Weges	27
2.18.1.1	3-Oxo adipat:Succinyl-CoA-Transferase-Aktivität	28
2.18.1.2	3-Oxo adipyl-CoA-Thiolase-Aktivität	28
2.18.1.3	3-Oxo adipat-Enollacton-Hydrolase-Aktivität	29
2.18.2	Enzymaktivitäten des <i>meta</i> -Weges	30
2.18.2.1	Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität	30
2.18.2.2	2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase-Aktivität	30
2.18.2.3	Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend)-Aktivität.....	31

2.18.2.4	4-Oxalocrotonat-Isomerase-Aktivität.....	32
2.19	Nukleinsäure-Blotting	33
2.19.1	DNA-Blotting (Southern-Blot)	33
2.19.2	Dot-Blot.....	33
2.19.3	Kolonie-Blot.....	33
2.20	Radioaktive Markierung von DNA	35
2.21	Hybridisierung.....	35
2.21.1	Hybridisierungs-Reaktion	35
2.21.2	Autoradiographie.....	35
3	Experimente und Ergebnisse.....	36
3.1	Gene des unteren <i>ortho</i> -Weges in <i>Pseudomonas</i> sp. B13.....	36
3.1.1	Die 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase.....	36
3.1.2	Die 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase	39
3.1.3	Die 3-Oxoadipat-Enollacton-Hydrolase.....	43
3.1.4	Sequenzanalyse der Region stromabwärts von <i>catD</i>	46
3.2	Der <i>meta</i> -Weg	47
3.2.1	Anzucht und Isolierung neuer Stämme mit Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase..	47
3.2.2	Identifizierung der neuen Chlorbenzol-abbauenden Stämme	48
3.2.2.1	Identifizierung der Stämme SK1, 16-6A und MG61	48
3.2.3	RAPD-Analysen.....	50
3.2.3.1	RAPD-Analyse der Stämme GJ31, SK1 und 16-6A.....	50
3.2.3.2	RAPD-Analyse der Stämme MG61 und 16-6A	51
3.2.4	Klonierung und Sequenzierung der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase aus den neuen Stämmen.....	52
3.2.5	Expression der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen und Aktivitätstests	56
3.2.6	Design <i>cbzE</i> -spezifischer Primer	56
3.2.7	Klonierung der Nukleotidsequenzen stromauf- und stromabwärts des <i>cbzE</i> -Gens aus den Stämmen SK1 und 16-6A	58
3.2.8	Die Hydratase, Aldolase und Dehydrogenase des unteren <i>meta</i> -Weges aus den Stämmen SK1 und 16-6A.....	60
4	Diskussion	67
4.1	Gene des unteren <i>ortho</i> -Weges in <i>Pseudomonas</i> sp. B13.....	67
4.2	Chlorbenzol-verwertende Neuisolate und ihre Gene des <i>meta</i> -Weges.....	72
4.2.1	Isolierung von Stämmen mit Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase	72

4.2.2	Vergleich der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen	73
4.2.3	Evolutionäre Aspekte	79
4.2.4	Die <i>cbzJ</i> -, <i>cbzQ</i> - und <i>cbzK</i> -Gene der Stämme SK1 und 16-6A.....	80
4.3	Ausblick	81
5	Literatur	82
6	Anhang	95

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Abbausequenzen für Chloraromaten untersucht. Ein Schwerpunkt lag auf der Untersuchung der Schritte des *ortho*-Weges in *Pseudomonas* sp. Stamm B13, die die Metabolite aus Benzoat und 3-Chlorbenzoat in den zentralen Stoffwechsel überführen. Die 3-Oxadipat:Succinyl-CoA-Transferase und die 3-Oxadipyl-CoA-Thiolase sind beteiligt an der Umwandlung von Benzoat und 3-Chlorbenzoat zu Intermediaten des Krebs-Zyklus in Bakterien über den *ortho*-Weg. Die Isolierung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten mit einer Gesamtlänge von 5.9 kb aus *Pseudomonas* sp. Stamm B13, die diese Enzyme kodieren, wird beschrieben. DNA-Sequenzanalysen erbrachten fünf offene Leserahmen und einen nicht vollständigen ORF1 mit unbekannter Funktion mit einer Länge von 414 bp. Eine Ribosomenbindestelle wurde stromaufwärts von ORF1 gefunden, während ein ρ -unabhängiger Terminator stromabwärts zu finden ist. ORF2 (*catI*) kodiert ein Polypeptid von 282 Aminosäuren Länge und startet bei Nukleotid 813. ORF3 (*catJ*) kodiert ein Polypeptid von 260 Aminosäuren Länge und startet bei Nukleotid 1661. CatI und CatJ sind Untereinheiten der 3-Oxadipat:Succinyl-CoA-Transferase, deren Aktivität im Expressionsvektor pET11a nachgewiesen wurde. ORF4 (*catF*) kodiert ein Protein mit 3-Oxadipyl-CoA-Thiolase-Aktivität. Die drei ORFs bilden offenbar ein Operon, da sie in derselben Richtung orientiert sind und eine Überlappung von 1 bp zwischen *catI* und *catJ* und von 4 bp zwischen *catJ* und *catF* zeigen. Das Operon startet mit einem potenziellen σ 70-ähnlichen Promotor stromaufwärts von *catI* und endet mit einer Sequenz eines potenziellen ρ -unabhängigen Terminators 50 bp stromabwärts von *catF*. Konservierte funktionelle Gruppen, die wichtig für die katalytische Aktivität von CoA-Transferasen und -Thiolasen sind, wurden in CatI, CatJ und CatF identifiziert. ORF5 (*catD*) kodiert die 3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolase. Die Nukleotidsequenz der 5'-flankierenden Region von *catD* war einem *E. coli*-Promotor ähnlich, während die Sequenz eines potenziellen ρ -unabhängigen Terminators stromabwärts gefunden wurde. Ein nicht kompletter ORF6 von 1183 kb Länge wurde stromabwärts von ORF5 gefunden, der in entgegengesetzter Richtung orientiert ist. Die abgeleitete Proteinsequenz von ORF6 zeigte eine wahrscheinliche AMP-bindende Domänenstruktur.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war der Abbau von Chlorbenzol über den *meta*-Weg. Nachdem bisher nur *Pseudomonas putida* GJ31 bekannt war, der Chlorbenzol über den *meta*-Weg abbaut, konnten drei neue Stämme gefunden werden, die ebenfalls Chlorbenzol über den *meta*-Weg verwerten: *Pseudomonas fluorescens* SK1, *Pseudomonas veronii* 16-6A

und *Pseudomonas* sp. MG61. Zusätzlich wurde eine Kultur aus einer Belebtschlammprobe angereichert, die auf Chlorbenzol wachsen kann. Die Stämme wurden aus verschiedenen Proben durch Direktisolierung oder über Anreicherungen mit verlangsamter Chlorbenzoldiffusion gewonnen.

Mit Hilfe von RAPD (Random amplified polymorphic DNA)-Analysen konnte belegt werden, dass es sich bei Stamm GJ31 und den neu isolierten Stämmen tatsächlich um verschiedene Stämme handelt.

Die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen (CbzE) der neuen Stämme wurden nach PCR-Amplifikation der Gene in *E. coli* kloniert. Aus einer Belebtschlamm-Anreicherungskultur konnte keine Reinkultur isoliert werden, die auf Chlorbenzol wuchs. Deshalb wurde die Mischkultur eingesetzt, um ebenfalls über PCR ein *cbzE*-ähnliches Gen zu amplifizieren. Die vier neuen Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase-Gene wiesen untereinander eine hohe Zahl von mehr als 99% identischer Nukleotide auf und 97% im Vergleich mit *cbzE* aus Stamm GJ31. Die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen wurden exprimiert.

Für Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen des Typs GJ31 wurden aus den Sequenzen der Gene der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen aus *P. putida* GJ31 und *P. fluorescens* SK1 und der 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase aus *P. putida* UCC2 die spezifischen Primer CC23O-1 und CC23O-2 entwickelt. Das entsprechende Thermocycler-Programm wurde optimiert.

Die Stämme SK1 und 16-6A zeigten auch in den Regionen stromauf- und stromabwärts des *cbzE*-Gens eine hohe Zahl identischer Nukleotide untereinander und im Vergleich mit Stamm GJ31. Die klonierten Sequenzen umfassten einen Bereich von insgesamt 3037 bp, worauf u. a. die Gene von *cbzT* (Ferredoxin), *cbzX* (Gen mit unbekannter Funktion) und Teile von *cbzG* (2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase) lokalisiert sind.

Aus den Stämmen SK1 und 16-6A wurde jeweils ein 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase-Gen (*cbzJ*) von 786 bp Länge, ein 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase-Gen (*cbzK*) von 1038 bp Länge und ein Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend)-Gen (*cbzQ*) von 939 bp Länge kloniert und sequenziert. *CbzJ*, *cbzK* und *cbzQ* aus Stamm SK1 wiesen mehr als 99% identische Nukleotide mit ihren entsprechenden Gegenstücken aus Stamm 16-6A auf.

Summary

This work deals with several steps in different biodegradation pathways for chloroaromatics. One part of this work treats steps of the modified *ortho*-cleavage pathway and the 3-oxoadipate pathway (*ortho*-cleavage pathway) in *Pseudomonas* sp. B13. 3-Oxoadipate:succinyl-CoA transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase carry out the ultimate steps in the conversion of benzoate and 3-chlorobenzoate to tricarboxylic acid cycle intermediates in bacteria utilising the 3-oxoadipate pathway. This study describes the characterisation of a DNA fragment with the overall length of 5.9 kb from *Pseudomonas* sp. strain B13 that encodes these enzymes. DNA sequence analysis revealed five open reading frames plus an incomplete one. ORF1 of unknown function has a length of 414 bp. A ribosome-binding sequence was found upstream and a potential ρ -independent terminator is present downstream of ORF1. ORF2 (*catI*) encodes a polypeptide of 282 amino acids in length and starts at nucleotide 813. ORF3 (*catJ*) encodes a polypeptide of 260 amino acids and begins at nucleotide 1661. CatI and CatJ are the subunits of the 3-oxoadipate:succinyl-CoA transferase, whose activity was demonstrated when both genes were ligated into the expression vector pET11a. ORF4, termed *catF*, codes for a protein of 401 amino acid residues with a predicted mass of 41,678 Da with 3-oxoadipyl-CoA thiolase activity. The three ORFs seem to form an operon since they were oriented in the same direction and showed an overlapping of 1 bp between *catI* and *catJ* and of 4 bp between *catJ* and *catF*. The operon starts with a potential *Escherichia coli* σ 70-like promoter upstream of *catI* and ends with a sequence of a potential ρ -independent terminator 50 bp downstream of *catF*. Conserved functional groups important for the catalytic activity of CoA transferases and thiolases were identified in CatI, CatJ, and CatF. ORF5 (*catD*) encodes the 3-oxoadipate enol-lactone hydrolase. The nucleotide sequence of the 5'-flanking region of *catD* showed a promoter sequence similar to an *E. coli* promoter sequence and a sequence of a potential ρ -independent terminator downstream. An incomplete ORF6 of 1183 kb length downstream of ORF5 was found, which is oriented in opposite direction. The deduced protein sequence of ORF6 showed a putative AMP-binding domain signature.

Another part of this work deals with the degradation of chlorobenzene via *meta*-cleavage pathway. Since only *Pseudomonas putida* GJ31 was known to degrade chlorobenzene by using this pathway, three new strains were isolated also able to degrade chlorobenzene using the *meta*-cleavage pathway: *Pseudomonas fluorescens* SK1, *Pseudomonas veronii* 16-6A and

Pseudomonas sp. MG61. Additionally, a mixed culture of an enrichment of a sludge sample showed the same abilities. The strains were isolated from different samples via direct isolation or after an enrichment using diffusion of the substrate through polypropylene tubes. RAPD-analyses showed that all isolated strains were different.

The chlorocatechol 2,3-dioxygenases of the new strains were cloned after PCR amplification into *E. coli*. From the enrichment no pure culture could be isolated. Because of this, the whole mixed culture was used to amplify the *cbzE*-gene. The four new chlorocatechol 2,3-dioxygenases showed a high number of more than 99% identical nucleotides among each other and 97% in comparison with strain GJ31. The dioxygenases were expressed. For the chlorocatechol 2,3-dioxygenase of the type GJ31 the specific primers CC23O-1 and CC23O-2 from the *cbzE* sequences of strains GJ31 and SK1 and the 3-methylcatechol 2,3-dioxygenase from *P. putida* UCC2 were generated. The appropriate thermocycler programme was optimised.

Strains SK1 and 16-6A featured in the regions up- and downstream of the *cbzE* genes a high number of identical nucleotides among each other and with strain GJ31, too. The cloned sequences comprised 3037 bp each other, containing among others, the genes of *cbzT* (ferredoxin), *cbzX* (gene with unknown function), and parts of *cbzG* (2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase). For strains SK1 and 16-6A a 2-hydroxypent-2,4-dienoate hydratase gene (*cbzJ*) of 786 bp length, a 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase gene (*cbzK*) of 1038 bp length, and an acetaldehyde dehydrogenase (acylating) gene (*cbzQ*) of 939 bp length were cloned and sequenced at each case. *CbzJ*, *cbzK*, and *cbzQ* from strain SK1 exhibited over 99% identical nucleotides compared with their analogues from strain 16-6A

Abkürzungen

AS	Aminosäure	rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
bp	Basenpaare	SSC	sodium salt citrate, Natriumcitrat
Ci	Curie	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Da	Dalton	TE	Tris-EDTA
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser	Temp.	Temperatur
DMSO	Dimethylsulfoxid	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure	U	Unit(s)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate	Upm	Umdrehungen pro Minute
ϵ	Extinktionskoeffizient	UV	Ultraviolett
h	Stunde(n)	w/v	weight per volume
kb	Kilobasen	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
LB	Luria broth		
min	Minute(n)		
OD _x	optische Dichte bei x nm und 1 cm Schichtdicke		
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)		
p. a.	pro analysi		
PCR	polymerase chain reaction		
pers.	persönlich(e)		
RAPD	Random amplified polymorphic DNA		

1 Einleitung

Chlorierte Kohlenwasserstoffe werden synthetisch hergestellt und für einen weiten Bereich verschiedener Anwendungen in der Industrie eingesetzt. Die Bayer AG produziert beispielsweise 60000 Jahrestonnen an Chlortoluolen als Vorläufer für die Produktion von selektiven Herbiziden, Photoresists, Life-Science-Produkten, Flammenschutzmitteln oder Antioxidantien (SCHMIDT, 2000). Chlorierte Kohlenwasserstoffe gehören zu der wichtigsten und am weitesten verbreiteten Klasse von Kontaminationen des Bodens und des Grundwassers.

Aufgrund von Unfällen, unsachgemäßer Handhabung und Müllbeseitigung wurde die Umwelt mit chlorierten Kohlenwasserstoffen verschmutzt. Die Präsenz von Organohalogenen in der Umwelt stellt ein ernstes gesundheitliches Risiko dar, da diese Verbindungen zur Bioakkumulation tendieren.

Während für leicht abbaubare Verschmutzungen wie Mineralöl, abbauende Fähigkeiten ubiquitär zu sein scheinen, glaubt man, dass für persistente Verbindungen wie chlorierte Aromaten, das Potenzial der Mikroorganismen für die Mineralisation dieser Verbindungen nicht ausreicht. Oft kommt es bei einer bakteriellen Umwandlung zur Akkumulation von Metaboliten, deren toxikologisches Potenzial unbekannt ist. Andererseits können diese Metaboliten von anderen Mitgliedern der mikrobiellen Gemeinschaft umgewandelt oder sogar mineralisiert werden. Einige, an sich harmlose Chemikalien, können enzymatisch in toxische Produkte umgewandelt werden (ALEXANDER, 1981). Deshalb ist die genaue Kenntnis der Abbauege und die Aufklärung des metabolischen Netzwerks in mikrobiellen Gemeinschaften wichtig für die Beurteilung des Schicksals von Umweltverschmutzungen und für die Optimierung von Bioremediationsprozessen.

Einige der in Bakterien vorkommenden Abbauege sind unvollständig und ineffizient, vor allem für vom Menschen synthetisierte Verbindungen (REINEKE und SCHLÖMANN, 1997). Solche „Flaschenhalse“ in den Abbausequenzen, die einen schnellen Abbau verhindern, gilt es aufzuspüren und, wenn möglich, zu umgehen oder wirksamer zu gestalten.

Die Mineralisierung oder der vollständige Abbau von organischen Molekülen in Gewässern oder Böden ist fast immer eine Konsequenz aus mikrobieller Aktivität (ALEXANDER, 1981). Das Interesse an der Anwendung von Methoden der Bioremediation zur Beseitigung von Kontaminationen wächst deshalb schnell (LAU und DE LORENZO, 1999).

1.1 Der Abbau von Aromaten und Chloraromaten über den 3-Oxadipat-Weg bzw. modifizierten *ortho*-Weg

Catechol wird in der Natur aus verschiedenen aromatischen Kohlenwasserstoffen, Aminoaromaten und Lignin-Monomeren über periphere Abbausequenzen generiert (**Abb. 1**) und über den chromosomal kodierten 3-Oxadipat- (oder *ortho*-Weg) abgebaut (HARWOOD und PARALES, 1996).

In Gattungen wie *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Comamonas*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* u. a. konnte dieser Abbauweg nachgewiesen werden (STANIER and ORNSTON, 1973).

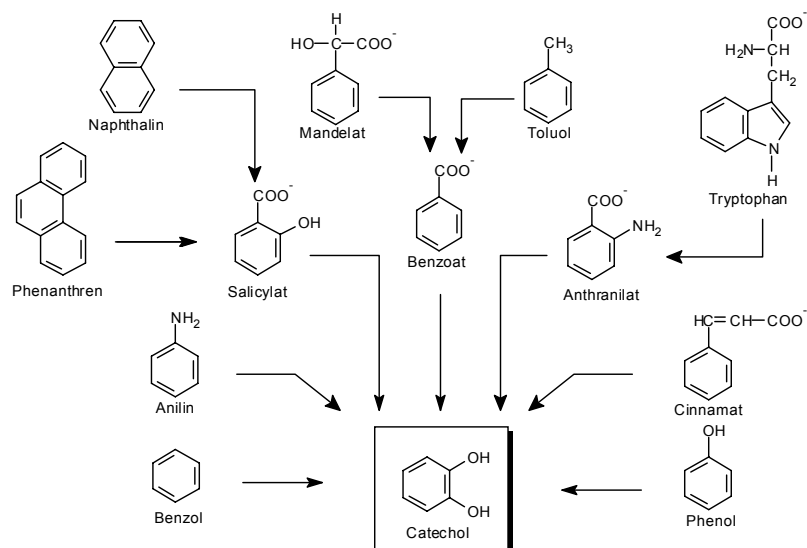


Abb. 1: Konvergenz auf der Stufe des Catechols (HARWOOD und PARALES, 1996).

Phenol-Derivate, einschließlich *p*-Kresol, 4-Hydroxybenzoat und zahlreichen Lignin-Monomeren, konvergieren auf der Stufe des Protocatechuats (**Abb. 2**). Dieses wird ebenfalls über den *ortho*-Weg abgebaut (HARWOOD und PARALES, 1996) und ist eine bekannte aromatische Verbindung, die von Pflanzen synthetisiert wird und im Boden vorkommt (PARKE, 1997).

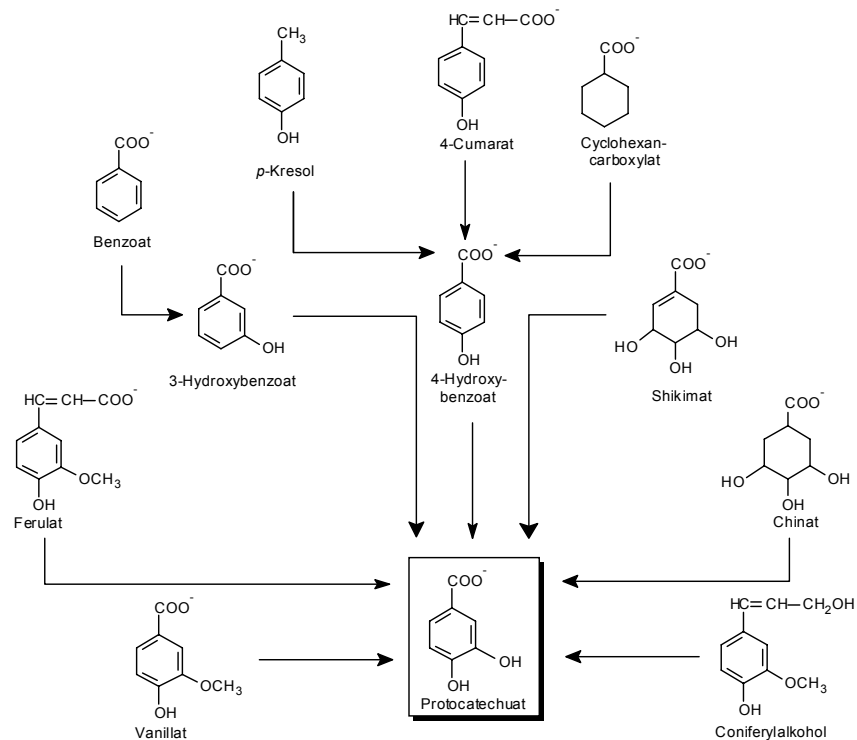


Abb. 2: Konvergenz auf der Stufe des Protocatechuats (HARWOOD und PARALES, 1996).

Der Abbau von Chloraromaten erfolgt hingegen hauptsächlich über den modifizierten *ortho*-Weg, dabei sind Chlorcatechole Schlüsselintermediate (REINEKE, 2001). Abb. 3 zeigt, wie viele Chloraromaten auf der Stufe des Chlorcatechols konvergieren.

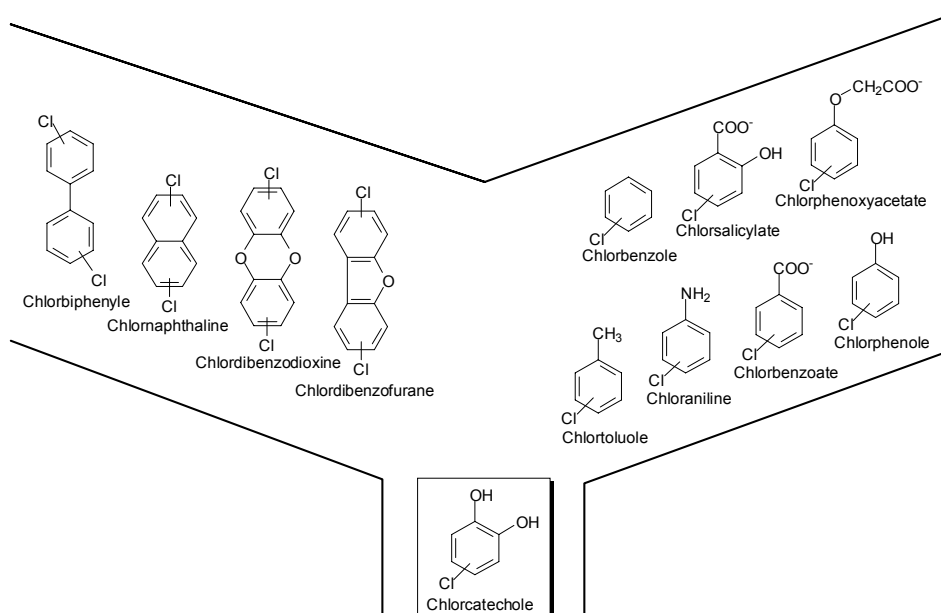


Abb. 3: Konvergenz von Chloraromaten auf der Stufe der Chlorcatechole.

Die zentrale Abbausequenz des Catechols in *Acinetobacter calcoaceticus* (HARTNETT et al., 1990; KOWALCHUK et al., 1994; SHANLEY et al., 1994) beginnt mit einer Intradiol-Spaltung durch eine Catechol-1,2-Dioxygenase (CatA), wobei molekularer Sauerstoff als Substrat notwendig ist (Abb. 4). Das gebildete *cis,cis*-Muconat wird anschließend mittels einer Muconat-Cycloisomerase (CatB; *cis,cis*-Muconat-lactonisierendes Enzym) zum Muconolacton zyklisiert. Dieses wird durch die Tautomerisierungsreaktion einer Muconolacton-Isomerase (CatC) in 3-Oxo adipat-Enollacton umgewandelt. Es folgt eine hydrolytische Spaltung des Enollactons durch eine 3-Oxo adipat-Enollacton-Hydrolase (CatD) zum 3-Oxo adipat. Dieses wird durch die CoA-Transferase (PcaJ/CatJ) zu 3-Oxo adipyl-CoA umgewandelt, welches schließlich durch die CoA-Lyase (PcaF/CatF) in Acetyl-CoA und Succinyl-CoA gespalten wird.

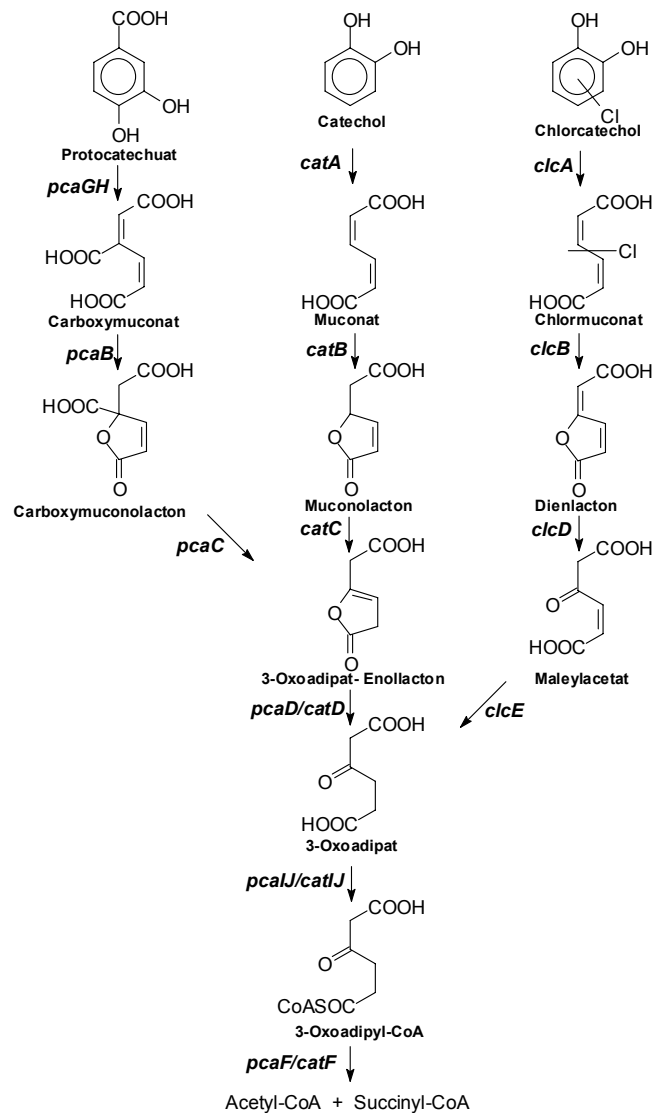


Abb. 4: Der *ortho*-Weg und der modifizierte *ortho*-Weg. Die Genbezeichnungen sind kursiv angegeben.

Protocatechuat wird im ersten Schritt des 3-Oxo adipat-Weges in *Pseudomonas putida* PRS2000 (HUGHES et al., 1988; PARALES und HARWOOD, 1992; WILLIAMS et al., 1992; FRAZEE et al., 1993; PARALES und HARWOOD, 1993; HARWOOD et al., 1994; ROMERO-STEINER et al., 1994; HARWOOD und PARALES, 1996) mittels Intradiol-Spaltung einer Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (PcaGH) in 3-Carboxymuconat umgewandelt (**Abb. 4**). Das entstandene 3-Carboxymuconat wird durch eine 3-Carboxymuconat-Cycloisomerase (PcaB; 3-Carboxymuconat-lactonisierendes Enzym) zum 4-Carboxymuconolacton zyklisiert. Im nächsten Abbauschritt konvergieren der Protocatechuat- und der Catechol-Zweig auf der Stufe des 3-Oxo adipat-Enollactons, welches durch Tautomerisierung und Decarboxylierung des 4-Carboxymuconolactons durch eine 4-Carboxymuconolacton-Decarboxylase (PcaC) entsteht.

Längere Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Enzyme des modifizierten *ortho*-Weges die gleichen Reaktionen wie die des 3-Oxo adipat-Weges katalysieren. Unterschiede sollten demnach nur in ihren relativen Aktivitäten gegenüber den chloresubstituierten Verbindungen bestehen (DORN und KNACKMUSS, 1978; SCHMIDT und KNACKMUSS, 1980; PIEPER und TIMMIS, 1996). VOLLMER et al. (1994) zeigten jedoch, dass aus 2-Chlormuconat durch Muconat-Cycloisomerasen 5-Chlor- und 2-Chlormuconolacton entstehen, während eine Chlormuconat-Cycloisomerase direkt das für die Zelle ungiftige *trans*-Dienlacton bildet. PRUCHA et al. (1996) gelang der Nachweis, dass die Chlormuconolactone durch Muconat-Cycloisomerasen weiter umgesetzt werden. 5-Chlormuconolacton wird demnach über Muconat-Cycloisomerasen zu ungiftigem *cis*-Dienlacton umgesetzt, während durch Dechlorierung und Decarboxylierung Protoanemonin entsteht, das antibiotische Wirkung besitzt.

Pseudomonas putida AC858 besitzt den Gencluster *clcABDE*, der diesem Stamm ermöglicht, über den modifizierten *ortho*-Weg 3-Chlorbenzoat abzubauen (FRANTZ und CHAKRABARTY, 1989). Ebenso ist *Pseudomonas* sp. Stamm B13 in der Lage, mit Hilfe des modifizierten *ortho*-Weges auf 3-Chlorbenzoat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen (DORN et al., 1974). Der Abbau des 3-Chlorbenzoats durch Stamm B13 erfolgt ähnlich dem des Benzoats oder 4-Hydroxybenzoats. Der modifizierte *ortho*-Weg wird in **Abb. 4** dem *ortho*-Weg gegenübergestellt. Auch hier wird mittels einer Dioxygenase, in diesem Fall eine Chlorcatechol-1,2-Dioxygenase (ClcA), das Chlorcatechol intradiol gespalten. Es entsteht Chlor-*cis,cis*-muconat. Im nächsten Schritt entsteht durch eine Chlormuconat-Cycloisomerase (ClcB) - je nach Substitutionsgrad - ein Chlordienlacton oder ein Dienlacton mit einer exozyklischen Doppelbindung, wobei Chlorwasserstoff entsteht. Im weiteren Verlauf des Abbaus wird das jeweilige Dienlacton durch eine Dienlacton-Hydrolase (ClcD) geöffnet. Es wird

(Chlor)-Maleylacetat gebildet. Die Verbindung wird durch eine Maleylacetat-Reduktase in 3-Oxoadipat umgewandelt (KASBERG et al., 1997). Die Maleylacetat-Reduktase (ClcE) ist notwendig, um Metabolite desselben Oxidationszustandes wie im normalen *ortho*-Weg herzustellen. Durch die Reduktion der Doppelbindung des (Chlor)-Maleylacetats unter Verbrauch von NADH, ist es in der Lage, (Chlor)-Maleylacetat in ein Produkt des normalen *ortho*-Weges umzuwandeln. Dies ist der letzte Schritt in diesem Abbauweg bei dem eine Freisetzung von Chlorwasserstoff möglich ist. Nach dieser Umwandlung erfolgt der weitere Abbau im normalen und modifizierten *ortho*-Weg über eine 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase (CatIJ) und 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase (CatF). Das 3-Oxoadipat wird mit Hilfe der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase zu 3-Oxoadipyl-CoA umgesetzt. Die 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase ist in der Lage, aus diesem Succinyl-CoA und Acetyl-CoA zu generieren (HARWOOD und PARALES, 1996; REINEKE und SCHLÖMANN, 1997).

Succinyl-CoA und Acetyl-CoA werden anschließend unter anderem im Tricarbonsäurezyklus weiter zur Gewinnung von Energie und als Kohlenstoffquelle verwendet.

1.2 Der Abbau von Aromaten und Chloraromaten über den *meta*-Weg

Für lange Zeit konnte ein Abbau von Chloraromaten über den *meta*-Weg nicht nachgewiesen werden, da Extradiol-Dioxygenasen durch 3-Chlorcatechol inaktiviert werden (KLEČKA und GIBSON, 1981; BARTELS et al., 1984). Als Ursache wurde die Bildung eines Selbstmordproduktes, eines Acyl-Chlorides, vermutet, das aus 3-Chlorcatechol durch die Catechol-2,3-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* PaW1 gebildet wird (Abb. 5) und zur Inaktivierung des Ring-öffnenden Enzyms führt (BARTELS et al., 1984). Zusätzlich ist 3-Chlorcatechol, wegen seines Potenzials Eisen(II)-Ionen zu chelieren, in der Lage, eine Catechol-2,3-Dioxygenase reversibel zu inaktivieren (KLEČKA und GIBSON, 1981).

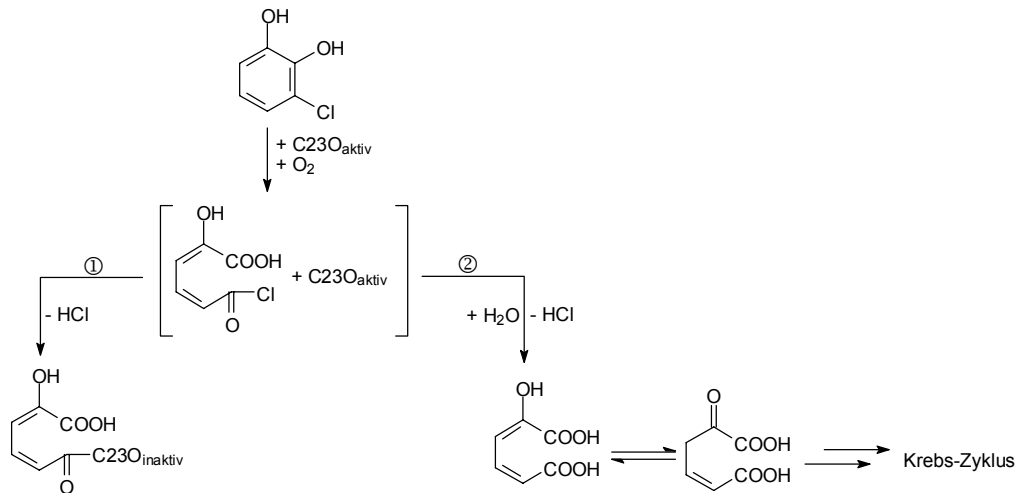


Abb. 5: Reaktionen der Catechol-2,3-Dioxygenase mit 3-Chlorcatechol (nach BARTELS et al., 1984; REINEKE, 2001). ① Konversion führt zur Suizid-Inaktivierung der 2,3-Dioxygenase ② produktive Konversion in Stamm GJ31.

Der aus dem Rhein isolierte Stamm *Pseudomonas putida* GJ31 ist in der Lage, Chlorbenzol schnell über 3-Chlorcatechol über den *meta*-Weg abzubauen (OLDENHUIS et al., 1989; MARS et al., 1997). Im Gegensatz zu anderen Catechol-2,3-Dioxygenasen, welche einer Inaktivierung unterliegen, wandelt die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase (CbzE) aus Stamm GJ31 3-Chlorcatechol produktiv um (KASCHABEK et al., 1998). Untersuchungen konnten zeigen, dass die durch 4-Chlorcatechol inaktivierte Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase aus *P. putida* GJ31 durch ein [2Fe-2S]-Ferrodoxin (CbzT), das in der Nukleotidsequenz direkt stromaufwärts von *cbzE* lokalisiert ist, reaktiviert werden kann (TROPEL et al., 2002).

In Stamm GJ31 wird zunächst unter Verbrauch von Sauerstoff Chlorbenzol durch eine Chlorbenzol-Dioxygenase zu 3-Chlor-*cis*-benzol-dihydrodiol umgewandelt. Mit Hilfe einer Chlorbenzol-dihydrodiol-Dehydrogenase entsteht 3-Chlorcatechol. Die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase katalysiert die Reaktion von 3-Chlorcatechol mit weiterem Sauerstoff zu dem instabilen Intermediat 5-Chlorcarbonyl-2-hydroxy-2,4-dienoat, das durch Einwirkung von Wasser HCl abspaltet und zu 2-Hydroxymuconat reagiert. Eine Oxalocrotonat-Isomerase bewirkt eine Tautomerisierung zum 4-Oxalocrotonat. Kohlendioxid wird durch eine Oxalocrotonat-Decarboxylase abgespalten und es entsteht 2-Hydroxypent-2,4-dienoat, das durch eine 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase zu 4-Hydroxy-2-oxovalerat umgewandelt wird. Eine 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase spaltet dieses Molekül in Pyruvat und Acetaldehyd. Letzteres kann mittels einer Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) zu Acetyl-CoA umgesetzt werden.

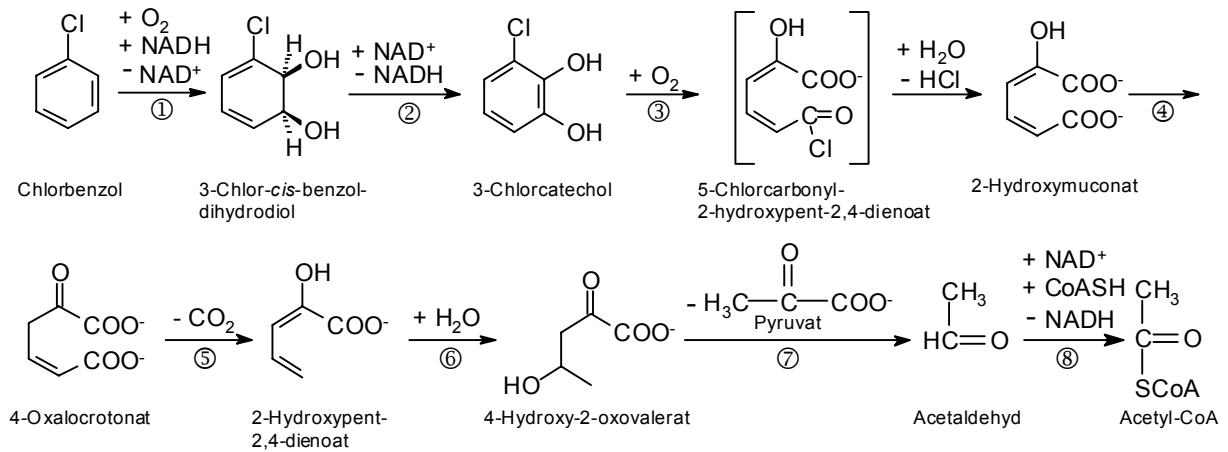


Abb. 6: Der *meta*-Weg (nach MARS et al., 1997). Enzyme: ① Chlorbenzol-Dioxygenase; ② Chlorbenzol-dihydrodiol-Dehydrogenase; ③ Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase; ④ Oxalocrotonat-Isomerase; ⑤ Oxalocrotonat-Decarboxylase; ⑥ 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase ⑦ 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase; ⑧ Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend).

1.3 Ziele und Aufgabenstellungen der Arbeit

Die hier vorliegende Arbeit bearbeitet zwei Schwerpunkte. Der erste Schwerpunkt beschäftigt sich mit dem modifizierten *ortho*-Weg in *Pseudomonas* sp. Stamm B13 und der zweite mit dem Abbau von Chlorbenzol über den *meta*-Weg.

1. Schwerpunkt: Gene des unteren *ortho*-Weges

Hier sollten die Arbeiten von KASSEL-ÇATI (1999) und GÖBEL (1999) fortgesetzt werden.

Die Aufgabenstellungen waren im einzelnen:

1. Klonierung und Charakterisierung der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. Stamm B13, die die vorletzte Stufe des Abbaus von Catechol und Chlorcatechol zum Tricarbonsäurezyklus katalysiert.
2. Klonierung und Charakterisierung der 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. Stamm B13, die die letzte Stufe des Abbaus von Catechol und Chlorcatechol zum Tricarbonsäurezyklus katalysiert.
3. Klonierung und Charakterisierung der 3-Oxoadipat-Enollacton-Hydrolase aus *Pseudomonas* sp. Stamm B13, die die Umwandlung von 3-Oxoadipat-Enollacton in 3-Oxoadipat katalysiert.

2. Schwerpunkt: Der *meta*-Weg

Da zu Beginn dieser Arbeit nur *P. putida* GJ31 als einziger Stamm in der Lage war Chlorbenzol über den *meta*-Weg abzubauen, sollte untersucht werden, ob diese Fähigkeit eine Rarität darstellt oder ob weitere Stämme isoliert werden könnten.

Die Aufgabenstellungen waren im einzelnen:

1. Isolierung weiterer Stämme mit Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase (*cbzE*).
2. Entwicklung neuer Strategien für die Isolierung von Stämmen mit *cbzE*-Gen.
3. Entwicklung *cbzE*-spezifischer Primer, die zur Suche neuer Stämme mit Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen eingesetzt werden können.
4. Vergleich der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen aus den neuen Isolaten mit *cbzE* aus Stamm GJ31.
5. Genetische Charakterisierung weiterer Enzyme, die in den *meta*-Weg involviert sind.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide für die Untersuchungen des modifizierten *ortho*-Weges

Die Bakterienstämme und Plasmide, die im Zusammenhang mit den Untersuchungen von *Pseudomonas* sp. Stamm B13 verwendet und neu hergestellt wurden, sind in **Tab. 1** wiedergegeben.

Tab. 1: Bakterienstämme und Plasmide, die bei der Untersuchung von *Pseudomonas* sp. Stamm B13 verwendet wurden.

Stamm oder Plasmid	Genotyp, Phänotyp oder Beschreibung	Referenz
Stämme		
<i>Pseudomonas</i> sp. Stamm B13	Wildtyp; Benzoat ⁺ , 3-Chlorbenzoat ⁺	DORN et al., 1974
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁻) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	Gibco BRL
Epicurian Coli [®] XL10-Gold [®] Kan ultracompetent cells	Tet ^R Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lac</i> ^f Z Δ M15 Tn10 (Tet ^R) Tn5 (Kan ^R) Amy]	Stratagene
Epicurian Coli [®] SoloPack [™] Gold supercompetent cells	Tet ^f Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lac</i> ^f Z Δ M15 Tn10 (Tet ^f) Amy Cam ^r]	Stratagene
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B m _B) dcm gal (DE3) pLysS Cm ^f	Promega
Plasmide		
pET11a	Ap ^f , T7 Expressionsvektor	Stratagene
pUC18	Ap ^f , Klonierungsvektor	YANISH-PERRON et al., 1985
pPCR-Script [™] Amp SK(+)	Ap ^f , Klonierungsvektor	Stratagene
pMGTH2	2.3 kb <i>Pst</i> I-Fragment mit <i>catF</i> in pUC18	GÖBEL, 1999
pMGTH	wie pMGTH2, entgegengesetzte Orientierung	GÖBEL, 1999
pMGTR11R	2.3kb <i>Eco</i> RI-Fragment mit <i>catI</i> und einem Teil von <i>catJ</i>	GÖBEL, 1999
pMGTR2	wie pMGTR11R, entgegengesetzte Orientierung	GÖBEL, 1999
pMGTR4	1.65 kb PCR-Produkt in pPCR-Script [™] Amp SK(+)	diese Arbeit
pMGTR3	wie pMGTR4, entgegengesetzte Orientierung	diese Arbeit
pESBLT8	pMGTR4 hydrolysiert mit <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI; ausgeschnittenes Fragment ligiert in pET11a/ <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	diese Arbeit
pMGTR2H380	0.38 kb <i>Hinc</i> I-Fragment von pMGTR2 in pUC18	GÖBEL, 1999
pMGTR2H550	0.55 kb <i>Hinc</i> II-Fragment von pMGTR2 in pUC18	GÖBEL, 1999
pMGTR2H880	0.88 kb <i>Hinc</i> II-Fragment von pMGTR2 in pUC18	GÖBEL, 1999
pMGELH3	3.6 kb <i>Eco</i> RI-Fragment mit <i>catD</i> in pUC18	diese Arbeit
pMGELH3E/S2	2.4 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Sma</i> I-Fragment von pMGELH3 in pUC18	diese Arbeit
pMGELH3Pst1	1.1 kb <i>Pst</i> I-Fragment von pMGELH3 in pUC18	diese Arbeit
pMGELH3Apo1	0.7 kb <i>Apo</i> I-Fragment von pMGELH3 in pUC18	diese Arbeit
pMGELH3S/Su1	0.9kb <i>Sal</i> I/ <i>Sma</i> I-Fragment von pMGELH3 in pUC18	diese Arbeit
pMGELH3S/So2	1.6 kb <i>Sal</i> I/ <i>Sma</i> I-Fragment von pMGELH3 in pUC18	diese Arbeit
pMGELHExpr7	1.1 kb PCR-Produkt (MG-ELH-1, MG-ELH-2) mit generierten <i>Nhe</i> I/ <i>Bam</i> HI- Restriktionsstellen, hydrolysiert mit <i>Nhe</i> I/ <i>Bam</i> HI und ligiert in pET11a/ <i>Nhe</i> I/ <i>Bam</i> HI	diese Arbeit

2.1.2 Bakterienstämme und Plasmide für die Untersuchungen des *meta*-Weges

Die Bakterienstämme und Plasmide, die im Zusammenhang mit den Untersuchungen des *meta*-Weges verwendet wurden, sind in **Tab. 2** wiedergegeben.

Tab. 2: Bakterienstämme und Plasmide, die bei den Untersuchungen des *meta*-Weges verwendet wurden.

Stamm oder Plasmid	Genotyp, Phänotyp oder Beschreibung	Referenz
Stämme		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Stamm SK1	Wildtyp; Chlorbenzol ⁺ , Toluol ⁺	KASCHABEK (pers. Mitteilung)
<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm 16-6A	Wildtyp; Chlorbenzol ⁺ , Toluol ⁺	diese Arbeit
<i>Pseudomonas</i> sp. Stamm MG61	Wildtyp; Chlorbenzol ⁺ , Toluol ⁺	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31	Wildtyp; Chlorbenzol ⁺ , Toluol ⁺	OLDENHUIS et al., 1989; MARS et al., 1997
Escherichia coli		
Epicurian Coli [®] XL10-Gold [®] Kan ultracompetent cells	Tet ^R Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^fΔM15 Tn10</i> (Tet ^R) Tn5 (Kan ^R) Amy]	Stratagene
Epicurian Coli [®] SoloPack [™] Gold supercompetent cells	Tet ^f Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^fΔM15 Tn10</i> (Tet ^f) Amy Cam ^r]	Stratagene
One Shot [®] TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
One Shot [®] TOP10F'	F ⁻ { <i>lacI^f</i> , <i>Tn10</i> (Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
One Shot [®] BL21(DE3)pLysS EZ Competent Cells	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen
	[F'::Tn10(Tc ^f) <i>proA⁺B⁺ lacI^fΔM15</i>] <i>recA1 endA1 hasdR17</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) <i>lac glnV44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Qiagen
Plasmide		
pPCR-Script [™] Amp SK(+)	Ap ^f , Klonierungsvektor	Stratagene
pCR [®] 4Blunt-TOPO [®]	Ap ^f , Klonierungsvektor	Invitrogen
pCR [®] 4-TOPO [®]	Ap ^f , Klonierungsvektor	Invitrogen
pCR [®] T7/CT-TOPO [®]	Ap ^f , Expressionsvektor	Invitrogen
pDrive Cloning Vector	Ap ^f , Klonierungsvektor	Qiagen
pJOE2702	ColE1, <i>bla</i> , P _{<i>rhaBAD</i>} , <i>rrnB</i> , Expressionsvektor	Volff et al., 1996
pMGSK116S30	1.3 kb PCR-Produkt mit Teilen der 16S rDNA aus Stamm SK1 in pPCR-Script [™] Amp SK(+)	diese Arbeit
pMGC2304	1.0 kb PCR-Produkt mit vollständiger Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm SK1 in pPCR-Script [™] Amp SK(+)	diese Arbeit
pMGSK1ExprCC230	PCR-Produkt zur Expression der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm SK1 in pCR [®] T7/CT-TOPO [®]	diese Arbeit
pMG16-6ACC230	1.0 kb PCR-Produkt mit vollständiger Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm 16-6A in pPCR-Script [™] Amp SK(+)	diese Arbeit
pMG16ExprCC230	PCR-Produkt zur Expression der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm 16-6A in pCR [®] T7/CT-TOPO [®]	diese Arbeit
pMGTX16-6A	1.3 kb PCR-Produkt mit Teilen der 16S rDNA aus Stamm 16-6A in pPCR-Script [™] Amp SK(+)	diese Arbeit
pTDN1-1018	2.1 kb <i>SstI/HindIII</i> -Fragment aus <i>P. putida</i> UCC2 in pHG327 mit vollständigem <i>tdnC</i> -Gen	SAINT et al., 1990
pMGSK1SURU1	0.9 kb PCR-Produkt mit Sequenz stromaufwärts der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm SK1 in pPCR-Script [™] Amp SK(+)	diese Arbeit

Fortsetzung

Fortsetzung Tab. 2

pMGSK1SURD1	1.3 kb PCR-Produkt mit Sequenz stromabwärts der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm SK1 in pPCR-Script™ Amp SK(+)	diese Arbeit
pMG16SURU1	0.9 kb PCR-Produkt mit Sequenz stromaufwärts der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm 16-6A in pPCR-Script™ Amp SK(+)	diese Arbeit
pMG16SURD1	1.3 kb PCR-Produkt mit Sequenz stromabwärts der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm 16-6A in pPCR-Script™ Amp SK(+)	diese Arbeit
pMGSK1HOA932	0.9 kb PCR-Produkt mit Teilen der Sequenz der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase aus Stamm SK1 in pCR®4Blunt-TOPO®	diese Arbeit
pMG16HOA932	0.9 kb PCR-Produkt mit Teilen der Sequenz der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase aus Stamm 16-6A in pPCR-Script™ Amp SK(+)	diese Arbeit
pMGSK1UNAB2849	2.8 kb PCR-Produkt mit vollständigen Sequenzen der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) und 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase aus Stamm SK1 in pCR®4Blunt-TOPO®	diese Arbeit
pMGSK1UNAB1150	1.1 kb PCR-Produkt mit vollständiger Sequenz der Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) aus Stamm SK1 in pCR®4Blunt-TOPO®	diese Arbeit
pMGSK1UNAB1137	1.1 kb PCR-Produkt mit vollständiger Sequenz der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase aus Stamm SK1 in pPCR-Script™ Amp SK(+)	diese Arbeit
pMG16UNAB2849	2.8 kb PCR-Produkt mit vollständigen Sequenzen der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) und 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase aus Stamm 16-6A in pCR®4Blunt-TOPO®	diese Arbeit
pMG16UNAB1150	1.1 kb PCR-Produkt mit vollständiger Sequenz der Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) aus Stamm 16-6A in pCR®4Blunt-TOPO®	diese Arbeit
pMG16UNAB1137	1.1 kb PCR-Produkt mit vollständiger Sequenz der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase aus Stamm 16-6A in pPCR-Script™ Amp SK(+)	diese Arbeit
pMG16UNAB546	0.5 kb PCR-Produkt mit Teilen der Sequenz der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase und Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) aus Stamm 16-6A in pDrive Cloning Vector	diese Arbeit
pMGSK1ExprADA	PCR-Produkt zur Expression der Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) aus Stamm SK1 in pCR®T7/CT-TOPO®	diese Arbeit
pMG16ExprADA	PCR-Produkt zur Expression der Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) aus Stamm 16-6A in pCR®T7/CT-TOPO®	diese Arbeit
pMGSK1ExprOEH	PCR-Produkt zur Expression der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase aus Stamm SK1 in pCR®T7/CT-TOPO®	diese Arbeit
pMG16ExprOEH	PCR-Produkt zur Expression der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase aus Stamm 16-6A in pCR®T7/CT-TOPO®	diese Arbeit
pMGBCC230	1.0 kb PCR-Produkt mit vollständiger Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase aus der Anreicherungskultur der BASF-Probe in pCR®4-TOPO®	diese Arbeit
pD3403	972 bp PCR Produkt mit <i>NdeI/BamH1</i> -Schnittstelle hergestellt aus pMGBCC230 als Template, geschnitten mit <i>NdeI/BamH1</i> und in pJOE2702 ligiert zur Expression der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase der BASF-Anreicherungskultur	Schmidt (pers. Mitteilung)
pMG61CC230	1.0 kb PCR-Produkt mit vollständiger Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm MG61 in pCR®4-TOPO®	diese Arbeit
pMG61TAX3	1.3 kb PCR-Produkt mit Teilen der 16S rDNA aus Stamm MG61 in pCR®4-TOPO®	diese Arbeit

2.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen oder stammen aus dem Ready-To-Go™ RAPD Analysis Kit von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg).

2.2.1 Oligonukleotide bei den Untersuchungen des modifizierten *ortho*-Weges

In **Tab. 3** sind die Oligonukleotide gezeigt, die bei den Untersuchungen von *Pseudomonas* sp. B13 Verwendung fanden.

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide für die Untersuchungen von *Pseudomonas* sp. B13.

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
CATF1	GGCTGGCGCTTCATCAA	GÖBEL, 1999
CATF2	AAGGCTTCGTT (GC) AG (CT) TC (AG) AT	GÖBEL, 1999
ESTR1	CGAGACCGAGCATATGGCTGAACTCCTGACC	SCHMIDT (pers. Mitteilung)
ESTR2	GTGCGCACGGGATCCAGATGTAGACTTCGCG	SCHMIDT (pers. Mitteilung)
MG-ELH-1	GTTCCCGATGGCTAGCGTCAAACCTCG	diese Arbeit
MG-ELH-2	CTGTGTGAACGGATCCGCCAGACCAT	diese Arbeit

2.2.2 Oligonukleotide bei den Untersuchungen des *meta*-Weges

In **Tab. 4** sind die Oligonukleotide gezeigt, die bei den Untersuchungen des *meta*-Weges und Klassifizierung verschiedener Stämme Verwendung fanden.

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide für die Untersuchungen zum *meta*-Weg.

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	EDWARDS et al., 1989
pH*	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	EDWARDS et al., 1989
pB	TAACACATGCAAGTCGAACG	EDWARDS et al., 1989
pG*	ACGGGCGGTGTGTAC	LANE et al., 1985
C23O-1	TCTA (CT) CTGAAGGCCTGGACCGAGGT	diese Arbeit
C23O-2	TAGATGGTCTTGCCGTGAGTCAGGC	diese Arbeit
C23O-3	AGGGTTCGTTTCATCAACGAACGAG	diese Arbeit
C23O-4	CAAGCTGATGAATCAAGACTTGGGG	diese Arbeit
CC23O-1	TGATGCGCCGACTCCC	diese Arbeit
CC23O-2	AACTGCGCGACCCGCTTGA	diese Arbeit
UCC2-1	GGTGTACTGAGAATCGGCCACGCGA	diese Arbeit
UCC2-2	TGAAGGACGGCACCAGATCACCCGT	diese Arbeit
16C23O1	ATGAGTATTATGAGAGTTGGCC	diese Arbeit
16C23O2	GCCCCACTGGTCATTCAATCG	diese Arbeit
SUR9	TGCAGGCGAGGGCGCACTTGGGGT	diese Arbeit
SUR10	TTGATGCTGACGTGGCCAACCTCTC	diese Arbeit

Fortsetzung

Fortsetzung Tab. 4

SUR11	ATTTCTTCGACCCTAGCGGCAACC	diese Arbeit
SUR12	ACCGGCGGTTGATCTCGGCAACCA	diese Arbeit
MG-HOA-1	GGCAGCCATGCCATTCGCCACCA	diese Arbeit
MG-HOA-2	TCATGTCTTCCTGGCCGCCGACCAT	diese Arbeit
UNAB-1	CATCATGACCTCCGCCGCGCTGGCT	diese Arbeit
UNAB-2	CCTGGTCACGGGTCAGAGTGC GGTT	diese Arbeit
UNAB-3	CGAGGTGATCCTGTCCGGCTCGCT	diese Arbeit
UNAB-4	GGTGGCGAATGGCATGGCTGCCGT	diese Arbeit
UNAB-5	ACGCCGCTGCCATTTCTGAGAGA	diese Arbeit
UNAB-6	CAGCACCTGGTCACGGGTCAGAGT	diese Arbeit
16UNAB7	ATCCTCAAGAAGGACCTGATCGGC	diese Arbeit
16UNAB8	GTTGCGCAGCACCTTGATCATCAG	diese Arbeit
SK1-OEH-1	ATGGACCAGATAATGATCAACGCG	diese Arbeit
SK1-OEH-2	TCTGGTTCATCTGCAAGCCTCCAA	diese Arbeit
16-OEH-2	TCTGGTTCATCAGCAAGCCTCCAA	diese Arbeit
16ADA1	ATGAACCAGAAACTCAAAGTCG	diese Arbeit
16ADA2	GATTGAACGTTCATGGTGCAGTC	diese Arbeit
RAPD Analysis Primer 1	GGTGCGGGAA	Amersham Pharmacia Biotech
RAPD Analysis Primer 2	GTTTCGCTCC	Amersham Pharmacia Biotech
RAPD Analysis Primer 3	GTAGACCCGT	Amersham Pharmacia Biotech
RAPD Analysis Primer 4	AAGAGCCCGT	Amersham Pharmacia Biotech
RAPD Analysis Primer 5	AACGCGCAAC	Amersham Pharmacia Biotech
RAPD Analysis Primer 6	CCCGTCAGCA	Amersham Pharmacia Biotech

2.3 Stammhaltung

Die *Escherichia coli*-Zellen wurden in LB-Medium bei 37°C im Schüttelwasserbad (Typ G76, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) oder auf LB-Platten angezogen. Die Selektion von *E. coli*-Zellen, die ein rekombinantes Plasmid enthielten, erfolgte auf LB-Festmedium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum. Gegebenenfalls wurde nach vorhergehender Transformation die Selektionsmediumplatte mit 40 mg/mL X-Gal versetzt, um die *E. coli*-Zellen auf β -Galactosidase-Aktivität zu testen.

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden auf Agarplatten bei 4°C gelagert. Die Pseudomonaden wurden auf Selektivmedien kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C im Schüttelwasserbad (oder auf entsprechenden Agarplatten im Brutschrank). Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 0.2 oder 0.5 mL Glycerin mit 0.8 bzw. 1.0 mL Zellsuspension gemischt bei –80°C eingefroren und gelagert.

2.4 Chemikalien, Medienbestandteile und Enzyme

2.4.1 Chemikalien

Es wurden handelsübliche Chemikalien in p. a. Qualität der Firmen Boehringer (Mannheim), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) verwendet. Antibiotika wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen oder St. Louis, USA) bezogen.

2.4.2 Medienbestandteile

Für die Herstellung von Medien wurden die benötigten Bestandteile von den Firmen Difco (Detroit, USA), Fluka (Buchs), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Oxoid (Wesel), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.4.3 Enzyme

Advantage [®] cDNA Polymerase Mix	Clontech (Palo Alto, California, USA)
Advantage [®] -GC cDNA Polymerase Mix	Clontech (Palo Alto, California, USA)
AmpliTaq [®] DNA Polymerase	Perkin Elmer (Weiterstadt)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Life Technologies (Karlsruhe)
Restriktionsendonukleasen	Boehringer (Mannheim) Gibco BRL (Eggenstein) New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)
T4 DNA Ligase	Gibco BRL (Eggenstein) USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA)
DNA Polymerase I Klenow Fragment	Life Technologies (Karlsruhe)

2.5 Kits

DNA-Marker-Kit QSK 101	Roth (Karlsruhe)
DNeasy Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Prep Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)

Readiprime II DNA labelling system	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, GB)
Ready-To-Go™ RAPD Analysis Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, GB)
PCR-Script™ Amp Cloning Kit	Stratagene (Amsterdam, NL)
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen (Groningen, NL)
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen (Groningen, NL)
pCR® T7/CT-TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen (Groningen, NL)
QIAGEN PCR Cloning ^{plus} Kit	Qiagen (Hilden)

2.6 Verschiedenes

API 20 NE-Test	bioMérieux Deutschland GmbH (Nürtingen)
Blocking reagent	Roche Diagnostics (Mannheim)
Hybond N+ Nylonmembran	Amersham Buchler (Braunschweig)
Hyperfilm-MP	Amersham Buchler (Braunschweig)
Whatman 3MM-Papier	Whatman (Maidstone, GB)
Redivue stabilised [α - ³² P]dCTP	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, GB)
Sterilfilter Größe 0.2 μ	Renner (Dannstadt)

2.7 Sequenzanalyse und Computerprogramme

Zusammengestellte Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe von Clustal W (Version 1.7) (THOMPSON et al., 1994) und ClustalX (Version 1.8) (THOMPSON et al., 1997) verglichen. Weiterhin wurde bei den Arbeiten mit Nukleotid- und Aminosäuresequenzen mit den Programmen BioEdit Sequence Alignment Editor 4.8.9 (HALL, 1999) und GeneDoc 2.5.006 (NICHOLAS and NICHOLAS, 1997; www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml) gearbeitet, wobei letzteres vor allem Verwendung fand bei der Erstellung der Prozentzahlen aus den Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleichen. Prophet 6.0 (AbTech Corporation, Charlottesville, VA, USA) diente zur Berechnung der G+C-Gehalte der Nukleotidsequenzen, zur Translation der Nukleotidsequenzen, und zur Berechnung der Molekulargewichte der Proteine.

Die Sequenzen wurden in das MSF-Format konvertiert und mit dem PredictProtein-Server an EMBL (http://embl-heidelberg.de/predictprotein/phd_pred.html oder <http://domo.cpmc.columbia.edu>) für die Konsensus-Sekundärstrukturvorhersage nach der PHD-Methode (ROST, 1996; ROST und SANDER, 1993) übermittelt. Die Protein-Sekundärstrukturvorhersagen der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenasen wurden mit dem Programm SSPro8 (<http://promoter.ics.uci.edu/BRNN-PRED/>) erstellt (BALDI et al., 1999; POLLASTRI et al., 2001).

Mit dem Programm Primer-Find 3.0 (Fröbel Labor-Geräte, Lindau, D) wurden die Oligonukleotide für die PCR-Experimente entwickelt.

Für das Screening homologer Proteine wurde BLAST 2.0 (ALTSCHUL et al., 1997), angeboten vom National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), eingesetzt.

Für die Suche nach Konsensus-Sequenzen wurde die Prosite-Datenbank (<http://www.expasy.ch/prosite>) genutzt (BAIROCH et al., 1997).

Wahrscheinliche Promotorsequenzen wurden mit dem Neural Network Promoter Prediction Programme (REESE et al., 1996) ermittelt, welches vom Human Genome Sequencing Department vom Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA (<http://www-hgc.lbl.gov/projects/promoter.html>) zur Verfügung gestellt wurde.

Phylogenetische Stammbäume wurden mit TreeView (Version 1.5.2) erstellt (PAGE, 1996; <http://taxo-nomy.zoology.gla.ac.uk/rod/tod.html>). Der Stammbaum basiert auf den Ergebnissen einer Distance Matrix Analysis, die mit ClustalX durchgeführt wurde.

2.8 Geräte

Folgende, im weiteren nicht gesondert erwähnten Geräte, wurden verwendet:

Rundschüttler	Gyrotory Water Bath Shaker Model G76, New Brunswick Scientific (Edison, N. J., USA)
UV-Leuchttisch	UV-Transilluminator, UVP Inc. (USA)
Videodokumentationssystem	Video-Copy-Processor von Mitsubishi (Japan) mit Videokamera (Firma Intas)
Zentrifugen	Sorvall Ultracentrifuge OTD Combi, Du Pont (Bad Nauheim) Sigma 3K-1, Sigma (Stedt am Harz) Biofuge Pico, Heraeus (Osterode)
French Press	French Pressure Cell Press, American Instrument Company (Silver Spring, Maryland, USA)

2.9 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli* und Pseudomonaden

Alle verwendeten Nährmedien wurden mindestens 20 min bei 200 kPa und 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Komponenten wurden mit Sterilfiltern (0.2 μ) filtriert und nach dem Abkühlen der Medien auf 50°C zugegeben. Die festen Medien erhielten zusätzlich zur Nährlösung 1.5% (w/v) Agar.

Wenn erforderlich, wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin (Natriumsalz)	100 μ g/mL
Chloramphenicol	34 μ g/mL

Im Falle des Chloramphenicols wurde zur Herstellung der Stammlösung Ethanol statt Wasser verwendet.

2.9.1 LB-Medium

LB-Medium wurde nach MILLER (1972) hergestellt.

Trypton	10.0 g/L
Hefeextrakt	5.0 g/L
NaCl	10.0 g/L
pH 7.0	

2.9.2 SOB-Medium

Hefeextrakt (Difco)	5 g/L
Bacto Trypton (Difco)	20 g/L
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium separat autoklavierte Lösungen von $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ zugegeben, bis Endkonzentrationen von jeweils 10 mM erreicht wurden (HANAHAN, 1983). Anschließend wurde das Medium auf pH 6.8 eingestellt.

2.9.3 SOC-Medium

Zu SOB-Medium (**Kap.** 2.9.2) wurde nach dem Autoklavieren D-Glucose (steril filtriert) zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 20 mM erreicht wurde (HANAHAN, 1983).

2.9.4 Minimalmedium

Grundlage der Minimalmedien ist die von DORN et al. (1974) angegebene chloridfreie, phosphatgepufferte Minerallösung, wobei zur besseren pH-Stabilisierung die Pufferkonzentration verdoppelt wurde (HARTMANN et al., 1979). Die notwendigen Kohlenstoffquellen wurden den Medien über die Dampfphase zugegeben.

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	7.0 g/L
KH ₂ PO ₄	2.0 g/L
Ca(NO ₃) ₂	0.05 g/L
NH ₄ Fe(III)-citrat·6H ₂ O	0.1 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g/L
1 mL Spurenelementlösung nach PFENNIG und LIPPERT (1966) ohne Zusatz von EDTA und FeSO ₄ auf 1 L	
pH 6.8	

2.9.5 King-Agar B

Dieser nicht sehr selektive Nährboden nach KING et al. (1954) wurde für die Stimulierung der Bildung wasserlöslicher, fluoreszierender Farbstoffe (Pyoverdine) bei Pseudomonaden neben anderen Methoden zur taxonomischen Einordnung der isolierten Pseudomonaden eingesetzt. Dazu wurde die veränderte Zusammensetzung nach BAST (1999) verwendet.

Proteose-Pepton	20.0 g/L
Glycerin	10.0 g/L
K ₃ PO ₄ ·3H ₂ O	1.8 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5 g/L
Agar	15.0 g/L
pH 7.2	

2.10 Isolierung von Chlorbenzol-Verwertern

Zur Anreicherung von Chlorbenzol-Verwertern wurde Minimalmedium mit belastetem Abwasser oder Sediment beimpft und mit Chlorbenzol und/oder Toluol über die Gasphase gefüttert. Im wesentlichen wurden dabei zwei Vorgehensweisen gewählt, die sich zudem in der Art der Chlorbenzol- bzw. Toluolzufuhr unterschieden: Die Direktisolierung (**Kap.** 2.10.1) und die Anreicherung (**Kap.** 2.10.2). Bei der Direktisolierung erfolgte die Isolierung sofort über das Ausplattieren auf Minimalmedium und der Inkubation mit dem Substrat. Bei der anderen Methode wurde zunächst eine Anreicherungskultur mit Chlorbenzol und/oder Toluol hergestellt. Die Isolierung der einzelnen Stämme sowie die Anreicherung von Bakterien aus einer weiteren Probe wird in **Kap.** 2.10.1 und **Kap.** 2.10.2 näher beschrieben.

2.10.1 Isolierung ohne Selektion

Zur Isolierung von Chlorbenzol-Verwertern, die den *meta*-Weg nutzen, wurden jeweils 100 μ L mehrere Proben Bitterfelder Grundwässer auf Minimalmedium ausplattiert und in einer Chlorbenzolatmosphäre (100 μ L in einem 5 L Glastopf) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zehntägiger Bebrütung wurden die Platten mit einer 10 mM 4-Chlorcatechol-Lösung besprüht. Organismen mit *meta*-Weg bilden die gelb gefärbte Verbindung 5-Chlor-2-hydroxy-muconsäuresemialdehyd (REIFENRATH, pers. Mitteilung). Bei einer Platte fiel eine sehr kleine, lediglich andeutungsweise gelb gefärbte Kolonie auf. Diese wurde auf eine Minimalmedium-Platte überimpft und mit Toluol inkubiert. Mehrmaliges Überimpfen und Vereinzeln mit Toluol als Substrat führte zur Reinkultur, welche dann wieder auf Chlorbenzol kultiviert wurde. Diese Reinkultur wurde als SK1 bezeichnet.

Die Grundwasserproben 14 und 16 aus dem MAROC-Projekt wurden nach folgender Vorgehensweise behandelt. Jeweils 10 \times 50 μ L jeder Probe wurden auf Minimalmedium ausplattiert und in einen Glastopf mit einem Volumen von 5 L bei 30°C gestellt. Über die Gasphase wurden 20 μ L Chlorbenzol zugegeben. Nach einer Woche wurde mit 20 μ L Chlorbenzol nachgefüttert. Nach einer weiteren Woche befanden sich viele Kolonien auf den Platten. Zum Auffinden der Kolonien, die den *meta*-Weg zum Abbau nutzten, wurden die Platten mit 4-Chlorcatechol übersprüht. Kolonien, die zitronengelb wurden, wurden auf Minimalmedium-Platten mit Chlorbenzol als Kohlenstoffquelle angezogen. Zur Herstellung von Reinkulturen wurden von Verdünnungsausstrichen einzelne Kolonien wieder auf Minimalmedium ausplattiert und mit Chlorbenzol über die Gasphase gefüttert. Fünf

Reinkulturen wurden aufgewählt, sie erhielten die Bezeichnungen 16-6A, 16-37A, 14-4A, 14-2B und 14-2EK.

Zur Gewinnung von Gesamt-DNA wurden die Reinkulturen in flüssigem LB-Medium angezogen. Die Gesamt-DNA der Reinkulturen wurde als Template in Test-PCRs mit den spezifischen Primern CC23O-1/CC23O-2 eingesetzt (**Kap. 2.17**). Die erwarteten Amplifikate von 262 bp Länge konnten bei allen fünf Reinkulturen gefunden werden.

2.10.2 Anreicherung mit verlangsamer Chlorbenzoldiffusion

Zur Anreicherung weiterer Bakterienkulturen auf Chlorbenzol wurde Minimalmedium (20 mL) in ein Greiner-Röhrchen aus Polypropylen gefüllt und mit 100 μ L einer Umweltprobe beimpft. Das Greiner-Röhrchen wurde zusammen mit einem offenen Eppendorf-Cup, welches das Substrat enthielt, in eine Wheaton-Flasche (500 mL) mit Teflonverschluss (**Abb. 7**) oder einen Glastopf (5 L) gegeben. Das äußere Gefäß wurde fest verschlossen und auf einem Schüttler bei 30°C inkubiert. Das Substrat diffundierte durch das Polypropylen des Greiner-Röhrchens in das Minimalmedium.

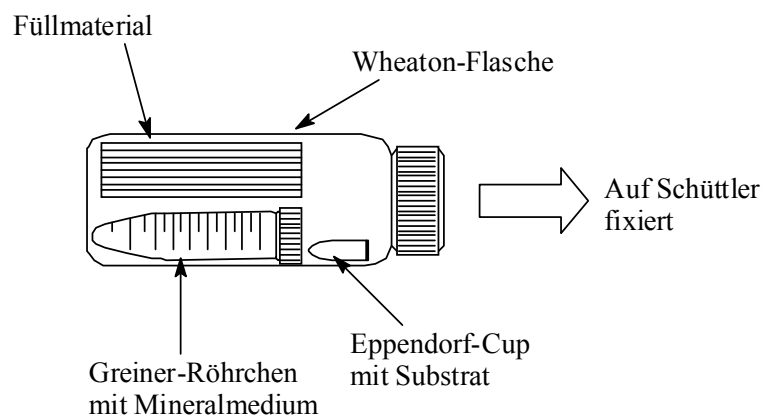


Abb. 7: Versuchsaufbau für die Anreicherung von Stamm MG61 mit Toluol.

Bei der Anreicherung einer Kultur aus der MAROC-Probe 10 wurde folgendermaßen verfahren: Am ersten Tag wurden 20 μ L Toluol in das Eppendorf-Cup gegeben, am siebenten Tag ebenfalls 20 μ L und am fünfzehnten Tag 40 μ L. Da inzwischen eine Trübung im Medium sichtbar geworden war, wurde am 21. Tag eine Test-PCR (**Kap. 2.17**) durchgeführt. Dazu wurden 100 μ L der Anreicherungskultur zentrifugiert und das Pellet in die Test-PCR eingesetzt. Das erwartete PCR-Produkt von 262 bp konnte nachgewiesen werden. Kolonien

aus der Anreicherungskultur auf LB-Platten wurden ebenfalls mit der Test-PCR untersucht und eine positive Kolonie ausgewählt. Diese Kolonie wurde über einen Verdünnungsausstrich auf King-Agar B gereinigt, auf Minimalmedium angezogen und als MG61 bezeichnet.

Die Anreicherungskultur mit einer Belebtschlammprobe von der BASF Ludwigshafen wurde folgendermaßen durchgeführt: Anfangs wurde die Kultur mit einem Cocktail aus 10 μL Toluol und 10 μL Chlorbenzol inkubiert und jede Woche mit derselben Menge über einen Zeitraum von sechs Wochen nachgefüttert. Danach wurde zwei Wochen lang nur mit Chlorbenzol inkubiert. In der ersten Woche wurden 20 μL Chlorbenzol zugegeben und nach einer Woche mit 20 μL nachgefüttert. Mit Hilfe der Test-PCR wurde die Chlorbenzol-Anreicherungskultur überprüft, ob sie Organismen mit *cbzE* enthielt. Ein Amplifikat von 262 bp konnte gefunden werden. Anschließend wurden jeweils 50 μL aus der Anreicherungskultur auf Minimalmedium ausplattiert und mit Chlorbenzol inkubiert. Auch auf LB-Medium oder King B-Agar wurden jeweils 50 μL der Anreicherungskultur ausplattiert. Auf allen Platten fanden sich Kolonien. Diese wurden mittels Test-PCR auf die Präsenz des *cbzE*-Gens geprüft. Alle PCRs führten nicht zum erwarteten Produkt, so dass keine Reinkultur mit dem gewünschten Enzym gewonnen werden konnte.

2.11 Isolierung von DNA

2.11.1 Isolierung plasmidischer DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung plasmidischer DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Zur Gewinnung der erforderlichen Zellen wurden 2–5 mL einer in LB-Medium (und – insofern die Resistenz dafür vorhanden war – mit Ampicillin versetzten) angezogenen Übernachtskultur etwa 6 min bei 13000 Upm zentrifugiert und nach Herstellerangaben weiterverarbeitet.

2.11.2 Isolierung von Gesamt-DNA

Für die Isolierung von Gesamt-DNA aus Pseudomonaden wurde das DNeasy Tissue Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Zur Gewinnung der erforderlichen Zellen wurden diese entweder in Minimalmedium mit entsprechender Kohlenstoffquelle oder in LB-Medium angezogen. Einige mL der Kultur wurden bei 13000 Upm zentrifugiert und das Sediment nach Herstellerangaben weiterverarbeitet.

2.12 Enzymatische Hydrolyse von DNA

Zur Spaltung von DNA in einzelne Fragmente wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers für Puffer- und Inkubationsbedingungen umgesetzt. Die Hydrolyse der DNA wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.13 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit $\frac{1}{10}$ ihres Volumens mit Auftragungspuffer (0.5 g/mL Saccharose; 160 mM EDTA, pH 8.0; 0.5 mg/mL Bromphenol-Blau; 0.5 mg/mL Xylencyanol) gemischt und in 0.8-2.0%igen (w/v) Agarosegelen (Agarose NEEO Ultra-Qualität, Firma Roth, Karlsruhe) mit Ethidiumbromid (0.1 μ g/mL) versetzt und in horizontaler Richtung in einer Submarine-Gelelektrophorese-Kammer aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer diente TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8.3-8.5). Es wurde eine Spannung von 100 V bei einer Stromstärke von etwa 150 mA angelegt. Die Größe der DNA-Fragmente wurde unter langwelligem UV-Licht von 366 nm mit einem Längenstandard bestimmt.

2.14 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.15 Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung von DNA-Lösungen erfolgte mit dem DNA-Marker-Kit QSK 101 der Firma Roth (Karlsruhe) mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.16 Klonierung von DNA

Im folgenden Abschnitt wird die Klonierung ausgewählter DNA-Stücke beschrieben. Dazu wurde zunächst die gewünschte DNA in einen Vektor ligiert und die rekombinanten Plasmide anschließend in einen *E. coli*-Stamm transformiert.

2.16.1 Ligation von DNA mit Plasmid-DNA

Die Ligation von DNA mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von SGAMARELLA et al. (1970) oder nach den Anleitungen in den jeweiligen benutzten Klonierungskits.

2.16.1.1 Herstellung von transformationskompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung transformationskompetenter Zellen von *E. coli* DH5 α wurde die Methode nach HANAHAH (1985) verwendet. Alle Schritte, mit Ausnahme der Anzucht der Bakterien, wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

Mit einer über Nacht bei 37°C in SOB-Medium angezogenen Vorkultur wurden 50 mL SOB-Medium angeimpft ($OD_{578} = 0.03$). Dieser Ansatz wurde bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0.5-0.6 inkubiert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis gestellt und anschließend durch Zentrifugation (3500 Upm, 4°C) sedimentiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 17 mL eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und erneut durch Zentrifugation (3500 Upm, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 4 mL eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 140 μ L DMSO wurden die Zellen für 5 min auf Eis gekühlt und dann erneut mit 140 μ L DMSO versetzt. Die Zellen wurden in Aliquots von 200 μ L aufgeteilt, für 20 h bei -20°C eingefroren und dann bei -80°C gelagert.

FSB-Puffer:

Kaliumacetat (pH 7.0)	10 mM
KCl	100 mM
MnCl ₂	45 mM
CaCl ₂	3 mM
(NH ₃) ₆ CoCl ₃	10 % (v/v)

Mit 0.1 M HCl wurde auf pH 6.4 eingestellt und anschließend steril filtriert.

2.16.1.2 Transformation von *E. coli* DH5 α

Nach MANDEL und HIGA (1970) wurden etwa 100 ng der zu transformierenden DNA zu 200 μ L der transformationskompetenten Zellen DH5 α -Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock (90 s bei 42°C) ausgesetzt, für 2 min auf Eis abgekühlt, mit 800 μ L SOC-Medium versetzt und zur Expression der Ampicillinresistenz 1 h bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden in geeigneten Verdünnungen auf selektiven Agarplatten ausgestrichen. Bei Verwendung von pUC18-Derivaten wurden selektive Agarplatten mit X-Gal (40 μ g/mL) verwendet.

Käuflich erworbene kompetente *E. coli*-Zellen (**Tab. 1** und **Tab. 2**) wurden nach Herstellerangaben transformiert.

2.16.2 Verwendung von Klonierungskits und Aufarbeitung der eingesetzten DNA

Bei Verwendung von Kits, die mit glatten Enden der Inserts und Vektoren arbeiteten, wurde nach erfolgter PCR zu dem Ansatz 1 μ L Klenow-Fragment gegeben und 20 min auf Eis gestellt.

Bei der Verwendung von Kits, die mit TA-Überhängen der Inserts und Vektoren arbeiteten, wurde nach erfolgter PCR zu dem Ansatz 1 μ L Taq DNA Polymerase gegeben und anschließend für 10 min auf 72°C temperiert.

Verwendete Kits, die glatte Enden einsetzen:

PCR-Script™ Amp Cloning Kit	Stratagene (Amsterdam, NL)
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen (Groningen, NL)

Verwendete Kits, die TA-Überhänge einsetzen:

TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen (Groningen, NL)
pCR®T7/CT-TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen (Groningen, NL)
QIAGEN PCR Cloning ^{plus} Kit	Qiagen (Hilden)

2.17 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktionen wurden in Thermocyclern von Biometra (Göttingen) mit einer Heizrate von 2°C/s durchgeführt. Es wurden das Advantage[®] cDNA PCR Kit bzw. Advantage-GC[®] cDNA PCR Kit (Clontech, Heidelberg) oder AmpliTaq[®] DNA Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt) unter den von den Herstellern empfohlenen Reaktionsbedingungen verwendet. Die PCR-Ansätze wurden jeweils mit 50 µL sterilem Mineralöl überschichtet. Die für die Amplifizierung des Zielgens entsprechenden geeigneten Primerpaare wurden mit dem Programm Primer-Find 3.0 (Fröbel Labor Geräte, Lindau) ermittelt. Ausgehend von einem Standardprotokoll wurden die PCR-Bedingungen für jedes verwendete Primerpaar optimiert. Die Dauer der Denaturierungsschritte lag zwischen 60 und 300 s für die erste Denaturierung und zwischen 30 und 60 s für die zweiten. Beide Denaturierungsschritte wurden bei 94°C durchgeführt. Die Dauer des Annealings lag zwischen 30 und 120 s. Es wurden jeweils 30 Zyklen durchlaufen. **Tab. 5** gibt die Art des Templates, die Annealing-Temperatur, die Elongationszeit und die Größe des PCR-Produkts für jedes Primerpaar an.

Tab. 5: Angaben zu den PCR-Programmen.

Primer	Template	Annealingtemp. [°C]	Elongationszeit [s]	Produkt [bp]
CATF1/CATF2	Gesamt-DNA aus Stamm B13	48	60	539
ESTR1/ESTR2	Gesamt-DNA aus Stamm B13	68	160	1677
MG-ELH-1/MG-ELH-2	Plasmid-DNA (pMGELH3)	68	60	1153
pA/pH*	Gesamt-DNA	37	240	ca. 1500
pB/pG*	Gesamt-DNA	37	240	ca. 1300
C23O-1/C23O-2	Gesamt-DNA	55	60	640
C23O-3/C23O-4	Gesamt-DNA oder ganze Zellen	57	70	1043
CC23O-1/CC23O-2	Gesamt-DNA oder ganze Zellen	60	45	262
16C23O1/16C23O2	Gesamt-DNA	56	60	968
SUR9/SUR10	Gesamt-DNA	59	90	1352
SUR11/SUR12	Gesamt-DNA	68	90	987
MG-HOA-1/MG-HOA-2	Gesamt-DNA	45 oder 60	60	932

Fortsetzung

Fortsetzung Tab. 5

Primer	Template	Annealingtemp. [°C]	Elongationszeit [s]	Produkt [bp]
UNAB-5/UNAB-6	Gesamt-DNA	60	180	2849
UNAB-1/UNAB-2	Gesamt-DNA	67	70	1137
UNAB-5/UNAB-6	Gesamt-DNA	67	70	1150
16UNAB7/16UNAB8	Gesamt-DNA	57	50	546
SK1-OEH-1/SK1-OEH-2	Gesamt-DNA	56	60	811
SK1-OEH-1/16-OEH-2	Gesamt-DNA	56	60	811

Das Protokoll für die Verwendung der Primer CC23O-1/CC23O-2 wurde optimiert und wird im Folgenden als Test-PCR bezeichnet. Die Annealingtemperatur wurde auf 64°C heraufgesetzt. Wenn statt gereinigter Gesamt-DNA ganze Bakterienzellen als Template eingesetzt wurden, wurde der erste Denaturierungsschritt auf 10 min ausgedehnt.

2.18 Enzymaktivitäten

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte in 1 cm Quarzküvetten mit dem Zweistrahl-Photometer Uvikon 710 der Firma Kontron Instruments (Zürich, Schweiz) mit angeschlossenen Schreiber (Uvikon Recorder 21) oder mit dem Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer der Firma Varian (Darmstadt).

Eine Enzymeinheit (U) wird definiert als die Aktivität, die den Umsatz von 1 μmol Substrat bzw. die Bildung von 1 μmol Produkt in einer Minute bei 25°C katalysiert. Die spezifische Aktivität wird in Einheiten pro Milligramm Protein angegeben.

2.18.1 Enzymaktivitäten des unteren *ortho*-Weges

In diesem Kapitel werden die Aktivitätstests auf 3-Oxoacetyl-CoA-Synthase, 3-Oxoacetyl-CoA-Thiolase und 3-Oxoacetyl-CoA-Enollacton-Hydrolase beschrieben.

2.18.1.1 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase-Aktivität

Die Aktivität der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase wurde nach der Methode von KATAGIRI und HAYAISHI (1957) bestimmt. Es wurde die Zunahme der Absorption des 3-Oxoadipyl-CoA-Mg²⁺-Komplexes ($\epsilon = 16300 \text{ L}\cdot\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (KASCHABEK et al., 2002) bei 305 nm gemessen (**Abb. 8**). Der Testansatz (1 mL) beinhaltete:

35 μmol	Tris-HCl-Puffer (pH 8.0)
25 μmol	MgCl ₂
3.5 μmol	Dinatrium-3-oxoadipat
1.5 μmol	Succinyl-CoA
50 μL	Rohextrakt

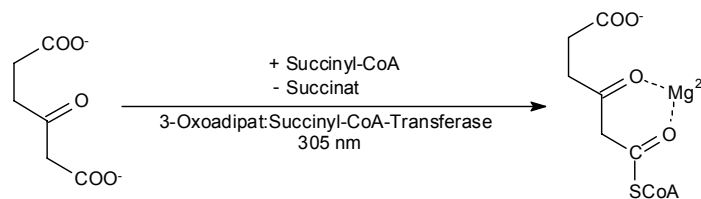


Abb. 8: Bildung des 3-Oxoadipyl-CoA-Mg²⁺-Komplexes.

2.18.1.2 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase-Aktivität

Die Aktivität der 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase wurde bei einer Wellenlänge von 305 nm bestimmt. Der Testansatz (1 mL) beinhaltete:

35 μmol	Tris-HCl-Puffer (pH 8.9)
25 μmol	MgCl ₂
3.5 μmol	Dinatrium-3-oxoadipat
1.5 μmol	Succinyl-CoA
2 μL	Lösung gereinigter 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase

Anschließend wurde etwa 15 min die Bildung von 3-Oxoadipyl-CoA) abgewartet, bis die Absorption begann abzunehmen. Dann wurden 0.2 μmol Coenzym A hinzugefügt. Nach etwa 1 min wurden 60 μL Rohextrakt zugegeben. Es wurde die Abnahme der Absorption des 3-Oxoadipyl-CoA-Mg²⁺-Komplexes ($\epsilon = 16300 \text{ L}\cdot\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (KASCHABEK et al., 2002) gemessen (**Abb. 9**).

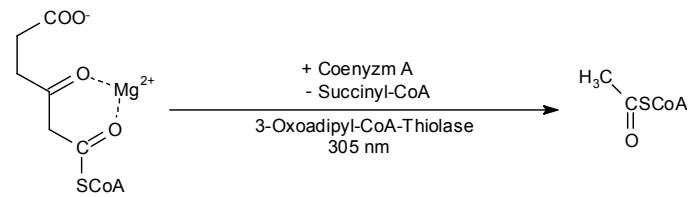


Abb. 9: Abnahme des 3-Oxoadipyl-CoA-Mg²⁺-Komplexes.

2.18.1.3 3-Oxoadipat-Enollacton-Hydrolase-Aktivität

Die Aktivität der 3-Oxoadipat-Enollacton-Hydrolase wurde nach der Methode von ORNSTON (1966a) bestimmt. Das benötigte Muconolacton wurde nach der Methode von ELVIDGE et al. (1950a, 1950b) durch die Behandlung mit Schwefelsäure aus Muconsäure gewonnen. Die Muconolacton-Isomerase wurde, wie bei ORNSTON (1966b) beschrieben, durch einen Hitzeschritt (30 min) bei 55°C aus dem Rohextrakt von *Pseudomonas putida* A3.12 (DSM291) gewonnen. Der Testansatz (1 mL) beinhaltete:

30 µmol	Tris-HCl-Puffer (pH 7.5)
0.5 µmol	Muconolacton
20 µL	Lösung einer Muconolacton-Isomerase

Es wurde etwa 2 min die ausreichende Bildung von 3-Oxoadipat-Enollacton abgewartet und anschließend 20 µL Rohextrakt zugegeben. Gemessen wurde die Abnahme der Absorption des 3-Oxoadipat-Enollactons ($\epsilon = 2049 \text{ L} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ORNSTON, 1966a)) bei einer Wellenlänge von 230 nm (**Abb. 10**).

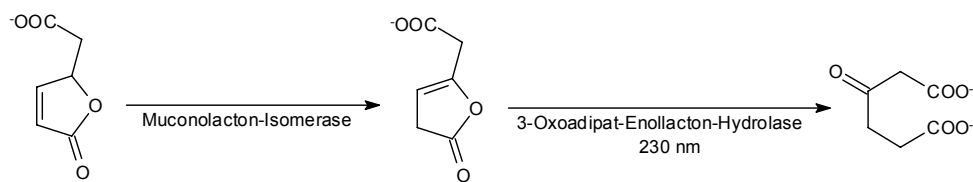


Abb. 10: Schematischer Verlauf der Untersuchung auf 3-Oxoadipat-Enollacton-Hydrolase-Aktivität.

2.18.2 Enzymaktivitäten des *meta*-Weges

In diesem Kapitel werden die Enzymaktivitätstests beschrieben, die bei den Arbeiten zum *meta*-Weg durchgeführt wurden.

2.18.2.1 Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität

Die Aktivität der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase wurde nach der durch KASCHABEK et al. (1998) veränderten Methode von NOZAKI (1970) bestimmt. Es wurde die Bildung von 2-Hydroxyomuconat ($\epsilon = 12500 \text{ L}\cdot\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (KASCHABEK et al., 1998) bei 290 nm gemessen (**Abb. 11**). Der Testansatz (1 mL) beinhaltete:

45 μmol Phosphatpuffer (pH 7.4)
 0.5 μmol 3-Chlorcatechol
 10 μL Rohextrakt (variierend)

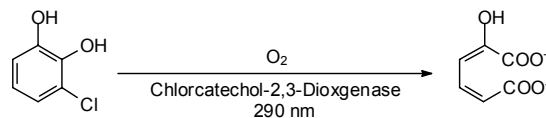


Abb. 11: Abbau des 3-Chlorcatechols durch Catechol-2,3-Dioxygenase zu 2-Hydroxyomuconat.

2.18.2.2 2-Hydroxy-pent-2,4-dienoat-Hydratase-Aktivität

Die Aktivität der 2-Hydroxy-pent-2,4-dienoat-Hydratase wurde bei einer Wellenlänge von 265 nm nach der Methode von COLLINSWORTH et al. (1973) bestimmt. Es wurde die Bildung des 4-Hydroxy-2-oxovalerats gemessen (**Abb. 12**). Zur Herstellung von Vinylpyruvat wurde die Synthese nach COLLINSWORTH et al. (1973) durchgeführt. Dazu wurden 5 mg L-Aminosäure-Oxidase in 0.5 mL 0.1 M NaCl-Lösung suspendiert. 0.9 mg (60 μmol) DL-Allylglycin wurden in 5.5 mL Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5) gelöst und mit der Suspension und 10 μL Katalase versetzt. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL 6%iger Perchlorsäure gestoppt und der Niederschlag abzentrifugiert. Die Lösung wurde im Enzymtest verwendet.

In 1 mL Gesamtvolumen wurden Phosphatpuffer, MgCl_2 und frisch hergestelltes Vinylpyruvat in einer Quarzküvette vorgelegt und die Blindreaktion ohne Enzym bei 265 nm beobachtet. Die verstärkte Extinktionsabnahme infolge der Zugabe von Rohextrakt wurde

bestimmt und der Blindwert von der Aktivität subtrahiert ($\epsilon = 10000 \text{ L}\cdot\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) Der Testansatz (1 mL) beinhaltet:

- 50 μmol Phosphatpuffer, pH 7.2
- 0.33 μmol MgCl_2
- 0.2 μmol frisch hergestelltes Vinylpyruvat
- 10 μL Rohextrakt (variierend)

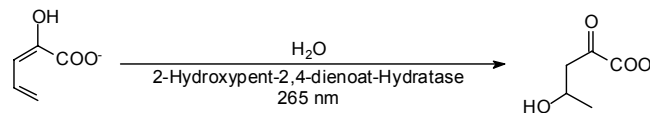


Abb. 12: Bildung von 4-Hydroxy-2-oxovalerat (Keto-Form) aus 2-Hydroxypent-2,4-dienoat durch eine 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase.

2.18.2.3 Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend)-Aktivität

Die Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) wurde nach der Methode von SHINGLER et al. (1992) bestimmt. Es wurde die Bildung von NADH ($\epsilon = 6300 \text{ L}\cdot\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) bei 340 nm gemessen (**Abb. 13**).

In 1 mL Testansatz wurden Phosphatpuffer, Acetaldehyd, NAD^+ und Rohextrakt pipettiert. Die Reduktion von NAD^+ wurde durch Zugabe von Coenzym A gestartet und durch die Extinktionszunahme bei 340 nm verfolgt. Der Ansatz (1 mL) beinhaltet:

- 50 μmol Phosphatpuffer, pH 7.5
- 30 μmol Acetaldehyd
- 0.9 μmol NAD^+
- 50 μL Rohextrakt (variierend)
- 0.9 μmol Coenzym A

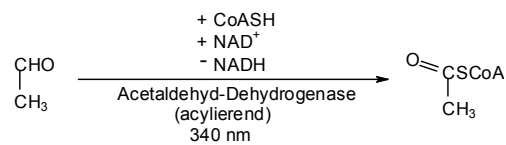


Abb. 13: Bildung von Acetyl-CoA aus Acetaldehyd durch Acetaldehyd-Dehydrogenase.

2.18.2.4 4-Oxalocrotonat-Isomerase-Aktivität

Die Aktivität der 4-Oxalocrotonat-Isomerase wurde nach der Methode von SALA-TREPAT und EVANS (1992) und HARAYAMA et al. (1989) bestimmt. Gemessen wurde die Bildung der Keto-Form von 4-Oxalocrotonat (2-Hydroxymuconsäure) (**Abb. 14**). 2-Hydroxymuconsäure wurde aus 2-Pyron-6-carbonsäure hergestellt. Dieses wurde hergestellt nach der Methode von WILEY und HART (1954) durch die Zyklisierung des Kondensationsproduktes aus Diethyl-oxalat und Ethylcrotonat in Anwesenheit von Kalium. 2-Hydroxymuconsäure wurde *in situ* durch eine alkalische Hydrolyse der 2-Pyron-6-carbonsäure hergestellt. Dazu wurde eine 10 mM wässrige Lösung des Pyrons mit einem 5fach molaren Überschuss an Natriumhydroxid bei 60°C für 5 min inkubiert. Die resultierende Lösung, die das gelbe Trianion der 2-Hydroxymuconsäure (SAEKI et al., 1980) enthielt, wurde vor dem Gebrauch auf Eis gestellt.

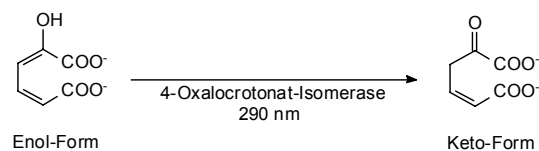


Abb. 14: Tautomerisierung von 4-Oxalocrotonat (Enol-Form) durch 4-Oxalocrotonat-Isomerase zu 4-Oxalocrotonat (Keto-Form).

Es wurden Puffer und Substrat vorgelegt, der Blindwert beobachtet, anschließend Rohextrakt hinzugegeben und die Abnahme der Extinktion ($\epsilon = 12500 \text{ L Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei 290 nm beobachtet. Die Messung erfolgte nach Einstellung des Gleichgewichtes. Der Blindwert ohne Zellextrakt wurde von der enzymbedingten Abnahme subtrahiert. Der Testansatz (1 mL) enthielt:

10 μmol	10 mM Phosphatpuffer (pH 7.3)
0.05 μmol	4-Oxalocrotonat (2-Hydroxymuconat)
5 μL	Rohextrakt (variierend)

2.19 Nukleinsäure-Blotting

2.19.1 DNA-Blotting (Southern-Blot)

Zur Überführung von DNA auf eine Nylonmembran wurde die Methode von SOUTHERN (1975) durchgeführt. Dazu wurde die DNA zuerst verschiedenen enzymatischen Hydrolysen unterworfen und mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Agarose-Gel wurde dann auf Filterpapier gelegt, welches mit 0.4 N NaOH getränkt war. Auf das Gel wurde die Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Buchler, Braunschweig) in entsprechender Größe und auf die Membran mehrere Lagen Filterpapier gelegt, welche mit einem Gewicht beschwert wurden. Die DNA wurde so durch die NaOH, welche durch kapillare Kräfte durch das Gel und die Membran in die oberen Schichten Filterpapier gesogen wurde, denaturiert und an die Nylonmembran transferiert. Das DNA-Blotting erfolgte über 14–16 h. Anschließend wurde die Membran zur Fixierung der DNA bei 80°C gebacken.

2.19.2 Dot-Blot

Für den Dot-Blot wurde die Methode von COSTANZI und GILLESPIE (1987) in modifizierter Form durchgeführt. Mit Restriktionsenzymen verdaute DNA wurde auf einem Agarosegel (0.8%) aufgetrennt. Gelstücke, die Fragmente in der gesuchten Größe beinhalteten, wurden ausgeschnitten. Nach Gelextraktion wurden mehrere Fraktionen erhalten, von denen jeweils 8 µL, verdünnt mit 8 µL Bdest, nebeneinander auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Buchler, Braunschweig) getüpfelt wurden. Anschließend wurde ein Hybridisierungsexperiment mit der entsprechenden Sonde durchgeführt. Die Fraktion mit dem stärksten Hybridisierungssignal wurde für die spätere Ligation und Transformation verwendet.

2.19.3 Kolonie-Blot

Für ein schnelles Screening von Transformanden wurden die Methoden von GRUNSTEIN und HOGSTEIN (1975) sowie VOGELI und KAYTES (1987) modifiziert.

Die zu untersuchenden Kolonien wurden auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Prozedur der Aufbereitung für das Hybridisierungsexperiment wurde nach „The DIG System User’s Guide for Filter Hybridization“ von Roche

Molecular Biochemicals (1995, S. 51) durchgeführt. Für den Blot wurden folgende Lösungen benötigt:

Denaturierungslösung	0.5 N NaOH; 1.5 M NaCl
Neutralisierungslösung	1.0 M Tris-HCl, pH 7.5; 1.5 M NaCl
20×SSC	3.0 M NaCl; 300 mM Natriumcitrat, pH 7.0
2×SSC	0.3 M NaCl; 30 mM Natriumcitrat, pH 7.0
Proteinase K	2 mg/mL Proteinase K in 2×SSC-Puffer
Prähybridisierungslösung	0.1% Blocking reagent; 0.1% N-Laurylsarcosinat; 0.02% SDS; 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8; 6×SSC (anschließendes Autoklavieren oder Kochen)

Jeweils zwei Lagen Whatman 3MM-Papier wurden mit der Denaturierungs-, der Neutralisierungslösung und 2×SSC getränkt. Die Platten mit den Kolonien wurden für 30 min bei 4°C vorgekühlt. Anschließend wurde ein zurechtgeschnittenes Stück Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Buchler, Braunschweig) vorsichtig auf die Kolonien gelegt, wobei Blasenbildung vermieden wurde. Die Membran wurde für 1 min auf der Agarplatte belassen. Die auf die Nylonmembran gebrachten Kolonien wurden auf Whatman-Papier kurz getrocknet. Darauf wurde die Membran für 15 min auf das vorbereitete Whatman-Papier mit Denaturierungslösung gebracht. Es folgte wiederum kurzes Trocknen auf Whatman-Papier und dann das Auflegen der Membran auf das Filterpapier mit Neutralisierungslösung für 15 min. Nach erneutem Trocknen wurde die Membran für 10 min auf 2×SSC gegeben. Nach dem Trocknen der Membran wurde sie für mindestens 30 min bei 80°C gebacken.

Anschließend wurde die Membran auf ein sauberes Stück Aluminium-Folie gelegt und etwa 2 mL der vorbereiteten Proteinase K-Lösung auf die Membran pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 1 h. Mit Wasser angefeuchtetes Whatman-Papier wurde dann auf die Membran gelegt und mit einer Flasche angedrückt, damit Zelltrümmer und Agar-Reste am Filterpapier haften bleiben konnten. Die Zelltrümmer und Agar-Reste wurden dann durch Abziehen des Whatman-Papiers von der Membran entfernt.

2.20 Radioaktive Markierung von DNA

DNA-Fragmente wurden mit 5 μl Redivue™ stabilised [α - ^{32}P]-dCTP von Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, GB) mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol nach Angaben des Herstellers mit dem Rediprime II DNA labelling system von Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, GB) radioaktiv markiert.

2.21 Hybridisierung

2.21.1 Hybridisierungs-Reaktion

Zur Vermeidung von unspezifischen Hybridisierungssignalen wurde die Nylonmembran für 3 h bei einer Hybridisierungstemperatur von 60°C in einer mehrmals gewechselten Prähybridisierungslösung geschwenkt.

Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und durch frische Lösung, versetzt mit dem radioaktiv markierten Fragment ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zuerst unter nicht stringenten Bedingungen für je 3×15 min bei 60°C mit einer Lösung aus 6×SSC mit 0.5% SDS gewaschen. Unter stringenten Bedingungen wurde die Membran mit Lösungen von 2×SSC mit 0.1% SDS und 0.5×SSC mit 0.1% SDS für je 30 min gewaschen.

2.21.2 Autoradiographie

Zur Detektion der Hybridisierungssignale wurde in einer Exponierbox die Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm-MP, Amersham Buchler, Braunschweig) gelegt und bei -78°C über Nacht inkubiert.

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Gene des unteren *ortho*-Weges in *Pseudomonas* sp. B13

3.1.1 Die 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase

Für die Klonierung der 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. Stamm B13 wurden zunächst die Primer CATF1 und CATF2 generiert, welche mit konservierten Bereichen des 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase-Gens (*catF*) aus *A. calcoaceticus* (KOWALCHUK et al., 1994) und *pcaF* aus *P. putida* PCH722 (HARWOOD et al., 1994; NICHOLS und HARWOOD, 1995) korrespondierten. Drei Nukleotide waren dabei in CATF2 gewobbelt. Anschließend wurde eine Hot-Start-PCR durchgeführt (**Kap.** 2.17). Ein Produkt von 539 bp wurde erhalten. Das PCR-Produkt wurde als homologe Sonde in Southern-Hybridisierungs-Experimenten verwendet, worauf ein 2.3 kb großes *PstI*-Fragment aus Gesamt-DNA aus *Pseudomonas* sp. B13 mit der Sonde hybridisierte. Eine 2.3 kb große *PstI*-Bande wurde aus einem Agarosegel mit Gesamt-DNA aus Stamm B13 ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde in drei kleinere aufgeteilt und diese gereinigt. Mit Hilfe eines Dot-Blots wurde die Fraktion mit dem größten Anteil an gewünschtem DNA-Fragment ausgewählt. Das erhaltene DNA-Gemisch wurde in pUC18/*PstI* ligiert und die rekombinanten Plasmide in DH5 α transformiert. Mittels Kolonie-Hybridisierungen wurden Klone mit rekombinantem Plasmid ausgewählt. Zwei der rekombinanten Plasmide enthielten dieselben Fragmente in entgegengesetzter Richtung. Sie wurden als pMGTH2 und pMGTH bezeichnet. Im Rohextrakt von *E. coli* DH5 α (pMGTH2) konnte Thiolase-Aktivität (270 Units/g Protein) mit 3-Oxoadipyl-CoA als Substrat nachgewiesen werden, nicht aber in *E. coli* DH5 α (pMGTH) oder *E. coli* DH5 α ohne Plasmid (**Kap.** 2.18.1.2). Unterschiedliche Subklone wurden für die Sequenzierung hergestellt (**Abb.** 15).

Die DNA-Sequenz von pMGTH2 enthielt einen unvollständigen offenen Leserahmen (ORF) von Position 1 bis 514. Die abgeleitete Proteinsequenz zeigte die höchste Identität mit einer Glutaconat-CoA-Transferase aus *Acidaminococcus fermentans* (MACK et al., 1994). Weil die N-terminale Proteinsequenzen beider Untereinheiten der gereinigten 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase von *Pseudomonas* sp. B13 auch die höchste Identität mit dieser CoA-Transferase (KASCHABEK et al., 2002) zeigten, wurde angenommen, dass es sich bei diesem ORF um einen Teil der Transferase-Gene handelte. Der vollständige ORF4, *catF* genannt, reichte von Position 511 bis 1714, was eine Überlappung von 4 bp mit *catJ* bedeutete. Er kodiert ein Protein aus 401 Aminosäureresten mit einer berechneten Masse von 41678 Da.

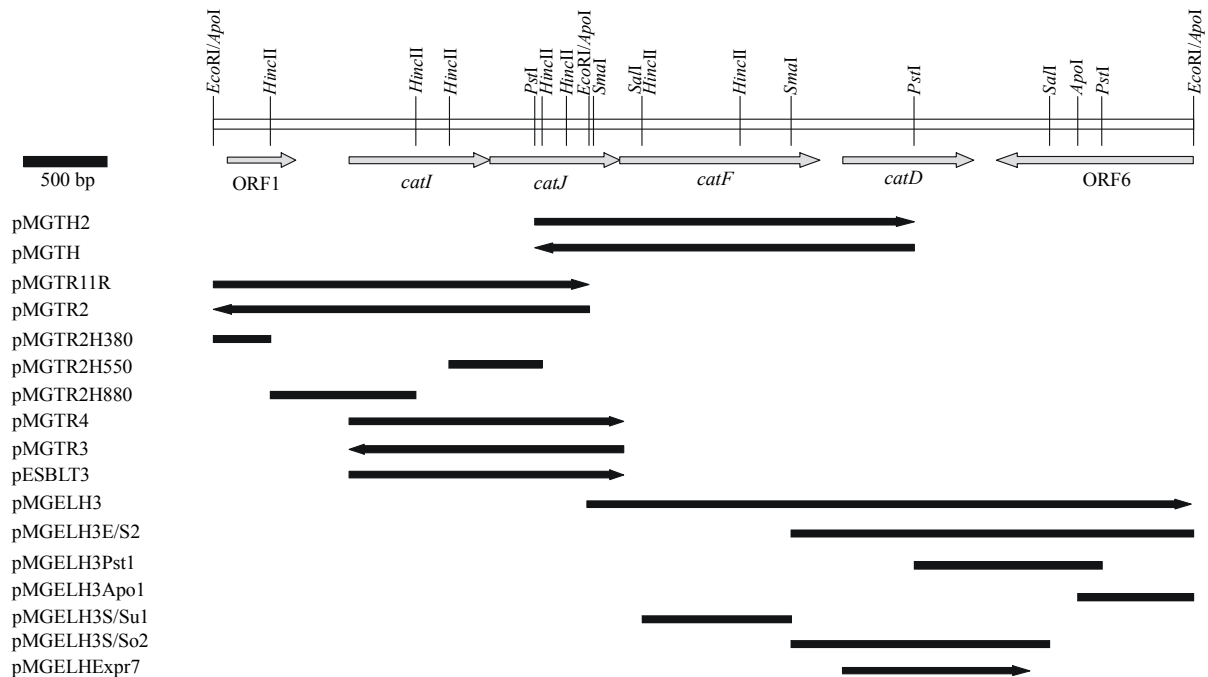


Abb. 15: Schematische Darstellung der Genorganisation der offenen Leserahmen auf den überlappenden 2.3 kb *PstI*-, 2.3 kb *EcoRI*- und 3.6 kb *EcoRI*-Fragmenten und die Positionen der klonierten Sequenzen.

Die N-terminale Aminosäuresequenz der Thiolase, die aus dem gereinigten Enzym (KASCHABEK et al., 2002) ermittelt wurde, war mit der aus den Nukleotiden abgeleiteten Sequenz fast identisch (**Abb. 16**).

Abgeleitete Sequenz:	MSREVYICDAVRTPIGRFG
Gereinigtes Enzym:	-SREVYI-DAVRTPIGRFG
	***** *****

Abb. 16: Vergleich der Proteinsequenzen der abgeleiteten Aminosäuren und des gereinigten Enzyms. Bindestriche (-) geben fehlende Aminosäuren wieder.

50 bp stromabwärts von *catF* begann eine GC-reiche Spiegelbildsequenz eines potenziellen ρ -unabhängigen Terminators (PLATT, 1986). Ein komplementäres Palindrom, das zwei Stämme von 8 bp und zwei Schleifen von 2 bp in einer kreuzförmigen Struktur in der DNA bildete, wurde gefolgt von einer Serie an T-Resten im Nicht-Template-Strang (**Abb. 17**).

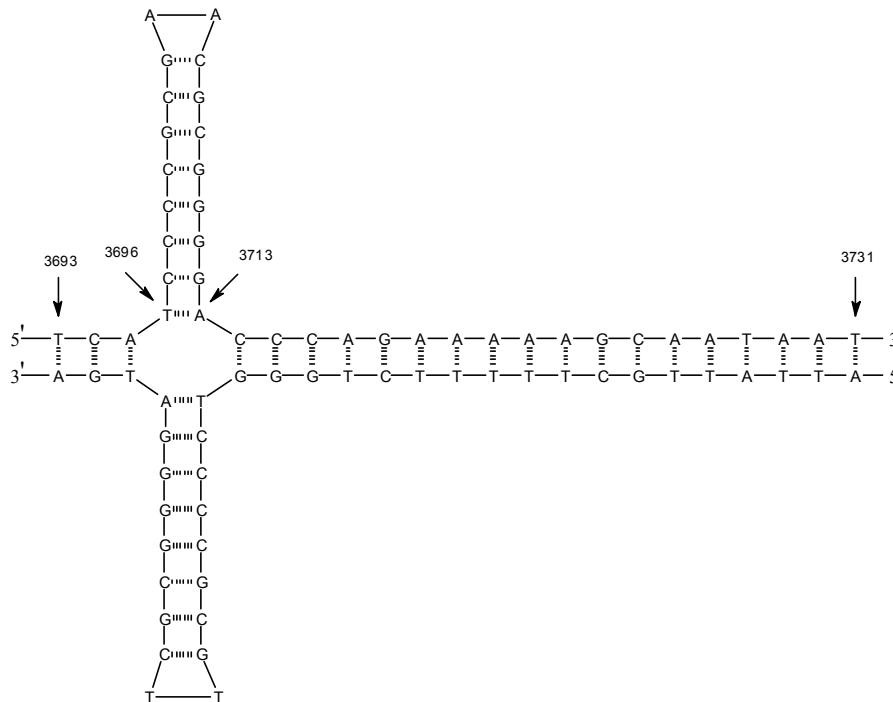


Abb. 17: Komplementäres Palindrom stromabwärts von *catF*. Zahlen geben die Position in einem am Ende erhaltenen 5.9 kb-Fragment an.

Abb. 18 zeigt die abgeleitete Proteinsequenz der Thiolase von *Pseudomonas* sp. B13 im Vergleich zu ihren nächsten Verwandten. Sie besitzt 83% identische Aminosäuren mit PcaF aus *P. putida* und 67% mit CatF und PcaF aus *A. calcoaceticus* sowie vielen anderen Thiolasen verschiedener Genera mit bis zu 40% identischen Aminosäuren. Ein Sequenzvergleich von CatF mit diesen Proteinen zeigte einige Regionen, die komplett konserviert sind. Stromabwärts von *catF* wurde ein zusätzlicher unvollständiger ORF gefunden. ORF5, der von Position 1853 bis 2280 reichte, war *pcaD* aus *A. calcoaceticus* ADP1 ähnlich, deshalb wurde angenommen, dass er den ersten Teil der 3-Oxoacetyl-CoA-Synthase kodiert. Klone, die Sequenzen stromauf- und abwärts von ORF4 tragen, wurden generiert, um die Sequenz für die Gene der Transferase und Hydrolase zu vervollständigen (**Abb. 15**).

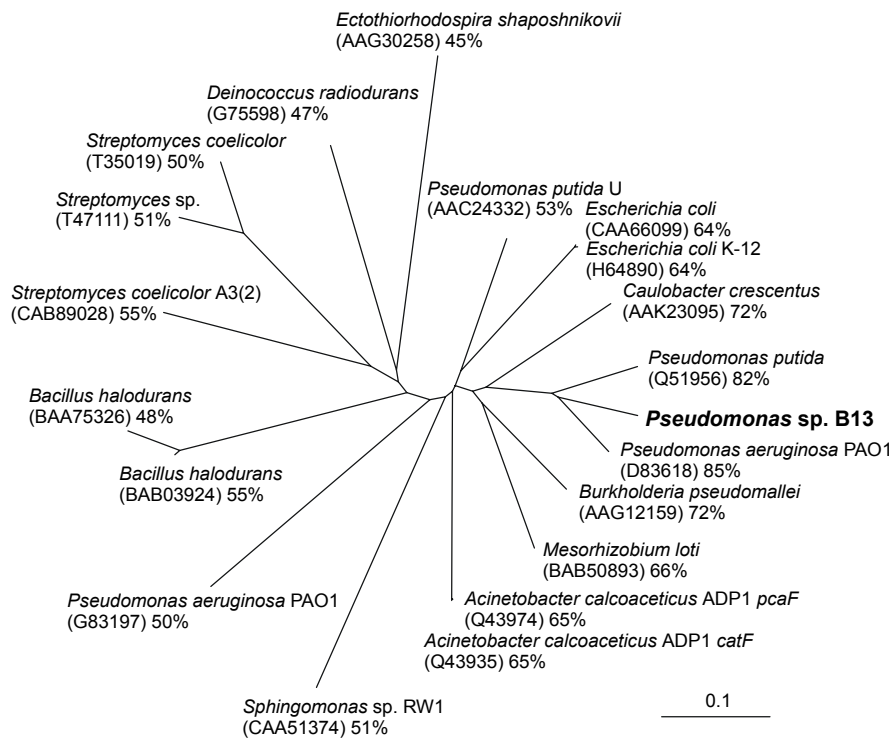


Abb. 18: Unbewurzelter Stammbaum für CatF aus Stamm B13 mit verwandten Thiolasen. Der Stammbaum basiert auf den abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Prozentzahlen geben identische Aminosäuren mit Stamm B13 an. Der Maßstab zeigt die Menge an genetischen Veränderungen, gemessen als die Zahl an Aminosäure-Austauschen pro Position an. 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase (PA0228) (pir||D83618 (STOVER et al., 2000); sp|Q51956 (HARWOOD et al., 1994); gb|AAG12159 (STEINER et al., 2000); emb|CAB89028 (REDENBACH et al., 1996); pir||T35019 (SEEGER et al., 1999); dbj|BAB50893 (KANEKO et al., 2000); gb|AAK23095 (NIERMAN et al., 2001); pir||G75598 (WHITE et al., 1999), 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase, PcaF (sp|Q43974 (KOWALCHUK et al., 1994)), 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase, CatF (sp|Q43935 (SHANLEY et al., 1994)), wahrscheinliche Acyl-CoA-Thiolase (PA3589) (pir||G83197 (STOVER et al., 2000)), Ketothiolase (gb|AAC24332 (OLIVERA et al., 1998)), β -Ketothiolase (gb|AAG30258 (ZHANG et al., 2000)), Acetyl-CoA-Acetyltransferase (emb|CAA66099 (FERRANDEZ et al., 1997b); dbj|BAB03924 (TAKAMI et al., 2000); dbj|BAA75326 (TAKAMI et al. 1999); emb|CAA51374 (ARMENGAUD et al., 1998; ARMENGAUD et al., 1999; HAPPE et al., 1993)), wahrscheinliche (Acetyl-CoA-C-Acyltransferase (pir||H64890 (BLATTNER et al. 1997); pir||T47111 (YANG et al., 1999)).

3.1.2 Die 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase

Für die Klonierung der Gene der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase, wurde ein 326 bp *PstI/EcoRI*-Fragment des zuvor isolierten 2.3 kb *PstI*-Fragmentes als homologe Sonde in einer Southern-Hybridisierung verwendet. Ein 2.3 kb *EcoRI*-Fragment aus Gesamt-DNA aus *Pseudomonas sp.* B13 hybridisierte mit der Sonde. Dieses Fragment wurde in pUC18/*EcoRI* shotgunkloniert. Mit Hilfe von Kolonie-Hybridisierungen wurden Klone mit rekombinantem Plasmid ausgewählt. Zwei Plasmide, die das Insert in entgegengesetzter Orientierung besaßen, wurden ausgewählt und erhielten die Bezeichnungen pMGTR11R und pMGTR2. PARALES und HARWOOD (1992) konnten CoA-Transferase-Aktivität in *E. coli*-Zellextrakten nachweisen, wenn sich ein 2.9 kb-Fragment mit diesem Gen stromabwärts eines *lac*-Promotors

befand. Die Klone mit pMGTR11R und pMGTR2 zeigten hingegen keine Transferase-Aktivität (**Kap.** 2.18.1.1).

Um eine aktive Transferase zu erhalten, wurde ein 1.65 kb PCR-Produkt mit Hilfe der Primer ESTR1 und ESTR2 hergestellt (**Kap.** 2.17). Der Primer ESTR1 (5'-CGA GAC CGA GCA TAT GGC TGA ACT CCT GAC C-3') enthielt eine generierte *NdeI*-Schnittstelle (unterstrichen) und das Startkodon des *clcI*-Gens (kursiv), der Primer ESTR2 (5'-GTG CGC ACG GGA TCC AGA TGT AGA *CTT* CGC G-3') eine generierte *BamHI*-Schnittstelle (unterstrichen) und das Stoppkodon des *clcJ*-Gens (kursiv). Die Ligation mit glatten Enden ergab die rekombinanten Plasmide pMGTR4 und pMGTR3, die die Inserts in entgegengesetzten Richtungen enthielten.

Das Plasmid pMGTR4 wurde mit *NdeI* und *BamHI* hydrolysiert und das entstandene Fragment in den Expressionsvektor pET11a/*NdeI/BamHI* ligiert. Das resultierende rekombinante Plasmid wurde pESBLT8 genannt und in den Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS retransformiert. Aktivitätstests mit Rohextrakt dieses Klons und 3-Oxo adipat als Substrat (**Kap.** 2.18.1.1) zeigten eine starke Aktivität der 3-Oxo adipat:Succinyl-CoA-Transferase verglichen mit den Kontrollen. Es wurden 4.6 U/g Protein gemessen, während keine Aktivität vorhanden war, wenn pET11a kein Insert enthielt.

Es wurden unterschiedliche Subklone für die Sequenzanalyse generiert (**Abb.** 15). Dazu wurde das Plasmid pMGTR2 mit *HincII* hydrolysiert, drei unterschiedlich große Banden aus einem Agarosegel geschnitten und in pUC/*HincII* ligiert. Es erfolgte Transformation in DH5 α -Zellen. Es konnten die rekombinanten Plasmide pMGTR2H380, pMGTR2H550 und pMGTR2H880 isoliert und sequenziert werden. Die DNA-Sequenz von pMGTR2 umfasste einen offenen Leserahmen (ORF1) von Position 83 bis 496 mit unbekannter Funktion. Die aus ORF1 abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte 30% Übereinstimmung mit dem Protein PhnB aus *E. coli*, einem Enzym, das in den Phosphonat-Stoffwechsel involviert ist, aber dessen genaue Funktion unbekannt ist (CHEN et al., 1990) und 60% Übereinstimmung mit dem Protein PA1353 aus *P. aeruginosa* PAO1 ([http:// www. pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

Eine wahrscheinliche Purin-reiche Ribosomenbindesequenz (GGAG) wurde 11 Nukleotide stromaufwärts des ATG-Startkodons von ORF1 identifiziert. Eine Sequenz eines potenziellen ρ -unabhängigen Terminators begann 38 bp stromabwärts von ORF1. Zwei komplementäre Palindromstrukturen (**Abb.** 19) wurden gefolgt von einem Oligo(A).

Zwei vollständige ORFs wurden auf pMGTR2 und dem 5'-Teil von pMGTH gefunden. Nach Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen der Untereinheiten der Transferase

des gereinigten Enzyms (KASCHABEK et al., 2002) mit der abgeleiteten Sequenz, konnten die Translationsstartstellen identifiziert werden.

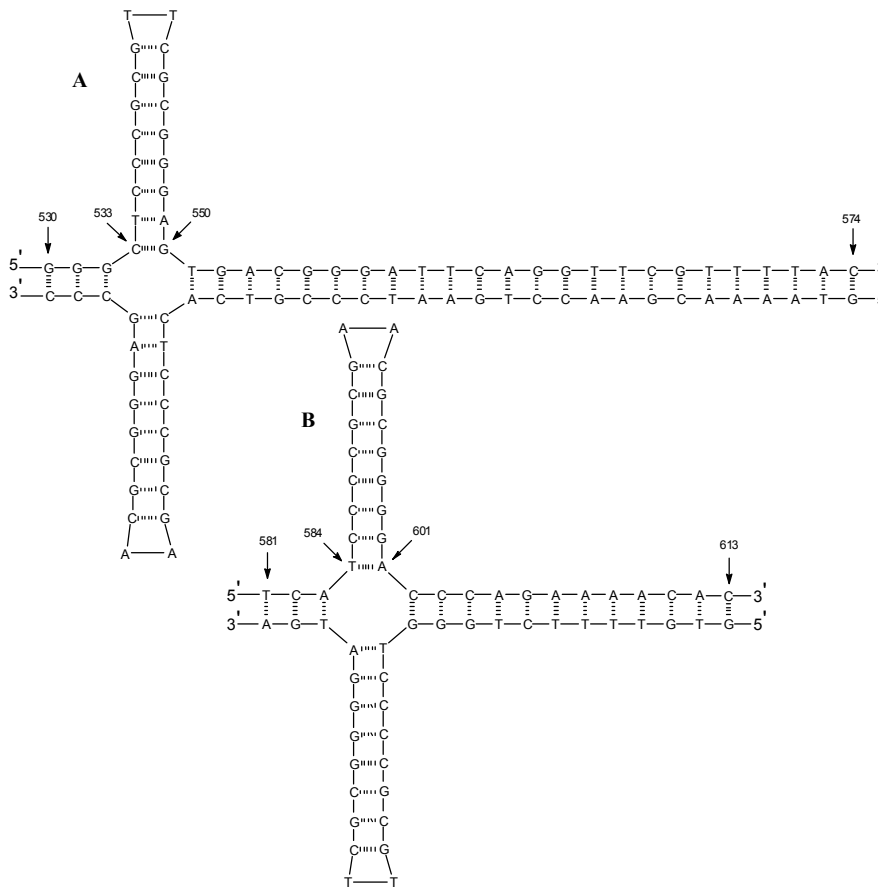


Abb. 19: Erste (A) und zweite (B) komplementäre Palindromstruktur stromabwärts von ORF1. Zahlen geben die Position in einem am Ende erhaltenen 5.9 kb-Fragment an.

Die N-terminale Sequenz des gereinigten Enzyms war nahezu identisch mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz, mit nur einer fehlenden Aminosäure in jeder Untereinheit, was vermutlich auf einen Fehler in der Analyse der Proteinsequenzen zurückzuführen war (**Abb. 20**).

Untereinheit A:

Abgeleitete Sequenz
Gereinigtes Enzym

MAELLTLREAVRFVNDGDTVALEGFTHLIPT
-AELLTLREAVRFVNDG-TVALEGFTHLIPT

Untereinheit B:

Abgeleitete Sequenz
Gereinigtes Enzym

MSAYSTNEMMTVAAARRLKNGAVCFV
-SAYSTNEMMTVAAARRLKNGAVVFV

Abb. 20: Vergleich der Proteinsequenzen der abgeleiteten Aminosäuren und des gereinigten Enzyms der Untereinheiten der Transferase. Bindestriche (-) geben fehlende Aminosäuren wieder.

ORF2 (*catI*) kodierte ein Polypeptid von 282 Aminosäuren Länge und begann bei Nukleotid 813. ORF3 (*catJ*) kodierte ein Polypeptid von 260 Aminosäuren Länge und startete bei Nukleotid 1661. Beide ORFs waren in derselben Richtung orientiert und zeigten eine Überlappung von 1 bp, was eine Verschiebung des Leserahmens von -1 bedeutete (FARABAUGH, 1996).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Untereinheiten der B13-Transferase mit Sequenzen anderer 3-Oxoacetyl-CoA-Succinyl-CoA-Transferasen aus *A. calcoaceticus* und *P. putida* zeigte nur eine geringe Identität im Bereich von weniger als 20% (Abb. 21). Ein Vergleich mit den Untereinheiten der Glutaconat-CoA-Transferase aus *A. fermentans* ergab eine Übereinstimmung von 30 bzw. 29%. 87 bzw. 91% identische Aminosäuren ergaben sich bei einem Vergleich mit PcaI und PcaJ aus *P. aeruginosa* PAO1. Dies ließ den Schluss zu, dass es sich bei diesen Genen ebenfalls um die Untereinheiten einer Transferase handelte.

Ein potenzieller *E. coli* $\sigma 70$ -ähnlicher Promotor (HARLEY und REYNOLDS, 1987; HAWLEY und MCCLURE, 1983) für *catI* fand sich stromaufwärts in der Region von Position 629 bis 729. Für die -10-Region zeigte sich die dem *E. coli*-Konsensus 5'-TATAAT-3' ähnliche Sequenz GATAAT (Position 723 bis 728). In der -35-Region wurde die der *E. coli*-Konsensus 5'-TTGACA-3' ähnliche Sequenz TCGATA gefunden, mit einem Zwischenraum von 15 bp, was ein typisches Merkmal eines $\sigma 70$ -ähnlichen Promotors ist. Eine wahrscheinliche Purin-reiche Ribosomenbindesequenz (AAGACGAG) konnte 16 Nukleotide stromaufwärts des ATG-Startkodons von *catI* identifiziert werden.

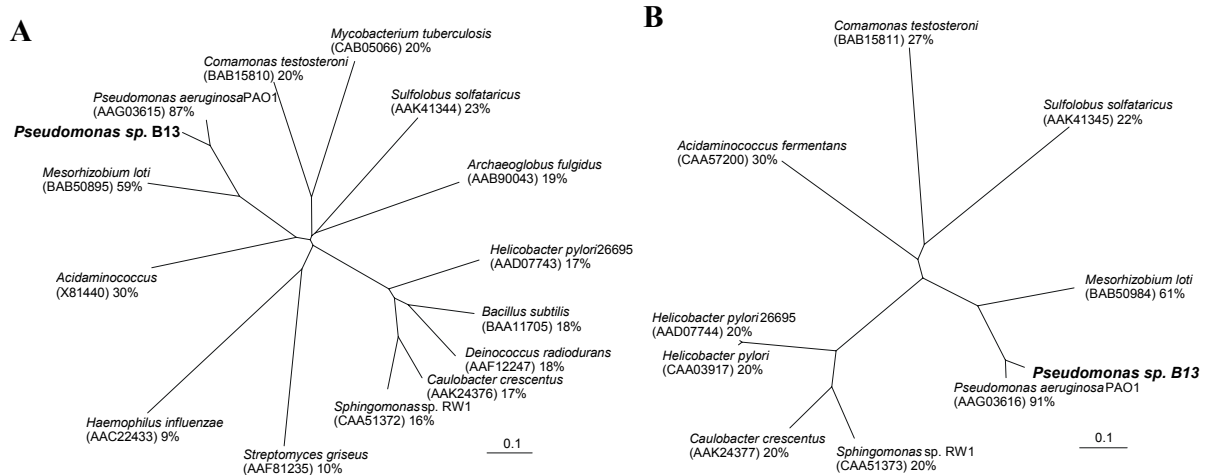


Abb. 21: Unbewurzelter Stammbaum für CatI (A) und CatJ (B) aus Stamm B13 mit den Untereinheiten A und B verschiedener verwandter Transferasen. Die Dendrogramme basieren auf den abgeleiteten Aminosäuresequenzen. A: Glutaconat-CoA-Transferase (emb|X81440 (MACK et al., 1994); gb|*AAB90043* (KLENCK et al., 1997); gb|AAK41344 (SHE et al., 2001)), Glutaconat-CoA-Transferase-ähnliches Protein (gb|AAF81235 (SMITH et al., 2000)), CoA-Transferase (gb|AAF12247 (WHITE et al., 1999)), wahrscheinliche CoA-Transferase (gb|AAG03615 (STOVER et al., 2000)), 3-Oxoacidipat-CoA-Transferase (gb|*AAD07743* (TOMB et al., 1997); gb|AAK24376 (NIERMAN et al., 2001)), hypothetische 3-Oxoacidipat-CoA-Transferase (dbj|BAA11705, (YOSHIDA et al., 1996)), 3-Oxoacidipat:Succinyl-CoA-Transferase (emb|CAA51372 (ARMENGAUD et al., 1998; ARMENGAUD et al., 1999; HAPPE et al., 1993)), Acetat-CoA-Transferase (gb|*AAC22433* (FLEISCHMANN et al., 1995); dbj|BAB50895, (KANEKO et al., 2000)), unbekanntes Protein (dbj|BAB15810 (HORINOUCI et al. 2000)), hypothetisches Protein Rv3551 (emb|CAB05066 (COLE et al., 1998)). B: Glutaconat-CoA-Transferase (emb|CAA57200 (MACK et al., 1998); gb|AAK41345 (SHE et al., 2001)), 3-Oxoacidipat-CoA-Transferase (gb|*AAD07744* (TOMB et al., 1997); gb|AAK24377 (NIERMAN et al., 2001)), Acetoacetyl-CoA-Transferase (dbj|BAB50894 (KANEKO et al., 2000)), 3-Oxoacidipat:Succinyl-CoA-Transferase (emb|CAA51373 (ARMENGAUD et al., 1998; ARMENGAUD et al., 1999; HAPPE et al., 1993)), 3-Oxosäure-CoA-Transferase (emb|CAA03917 (CORTHÉSY-THEULAZ, 1997)), wahrscheinliche CoA-Transferase (gb|AAG03616 (STOVER et al., 2000)), unbekanntes Protein (dbj|BAB15811 (HORINOUCI et al., 2000)). Die Maßstäbe zeigen die Menge an genetischen Veränderungen, gemessen als die Zahl an Aminosäure-Austauschen pro Position an.

3.1.3 Die 3-Oxoacidipat-Enollacton-Hydrolase

Das 539 bp PCR-Produkt, welches einen Teil von *catF* enthielt und zur Hybridisierung des gesamten Thiolase-Gens eingesetzt wurde, wurde als Sonde in einem Southern-Hybridisierungsexperiment verwendet, um das gesamte Hydrolase-Gen zu finden. Ein 3.6 kb *EcoRI*-Fragment aus Gesamt-DNA von *Pseudomonas* sp. B13 hybridisierte mit der Sonde und wurde in pUC18/*EcoRI* shotgunkloniert. Die Transformation der rekombinanten Plasmide in *E. coli* DH5 α wurde gefolgt von Kolonie-Hybridisierungen. Das rekombinante Plasmid erhielt die Bezeichnung pMGELH3. Dieses wurde von den beiden Enden ausgehend so weit wie möglich ansequenziert. Für die Sequenzierung der vollständigen Nukleotidsequenz wurden Subklone hergestellt. Dazu wurde das rekombinante Plasmid pMGELH3 zunächst mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysiert. Die Fragmente wurden in den entsprechend

hydrolysierten pUC18-Vektor ligiert und die rekombinanten Plasmide in DH5 α transformiert. Es wurden fünf Subklone isoliert. Die Lage der Fragmente ist in **Abb. 15** wiedergegeben.

Zur Expression der Hydrolase wurden als Primer in einer PCR zum einen das Oligonukleotid MG-ELH-1 (5'-GTT CCC GAT GGC TAG CGT CAA ACT CG-3') mit generierter *NheI*-Schnittstelle (unterstrichen) und dem Startkodon des *pcaD*-Gens (kursiv) eingesetzt, zum anderen das Oligonukleotid MG-ELH-2 (5'-CTG TGT GAA CGG ATC CGC CAG ACC AT-3') mit generierter *BamHI*-Schnittstelle (unterstrichen). Als Template-DNA diente das Plasmid pMGLH3. Anschließende Ligation in den Expressionsvektor pET11a/*NdeI*/*BamHI* und darauffolgende Transformation erlaubte die Isolierung des rekombinanten Plasmids pMGELHExpr7. Dieses wurde in den Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS retransformiert.

Aktivitätstests mit Rohextrakten dieses Klons mit Muconolacton als Substrat zeigten eine starke 3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolase-Aktivität verglichen mit den Kontrollen (**Kap. 2.18.1.3**). Es wurden 32.1 Units/mg Protein gemessen, während ein Klon mit dem Plasmid pMGELH3, welches das 3.6 kb *EcoRI*-Fragment beinhaltet, keine Aktivität zeigte.

Die Nukleotid-Sequenz der 5'-flankierenden Region von *catD* zeigte eine Promotorsequenz in der Region von 1755 bis 1800, ähnlich der *E. coli*-Promotorsequenz (-10-Region: AATAAT, Position 1784 bis 1789), während die korrespondierende -35-Region sehr geringe Ähnlichkeit zum *E. coli*-Konsensus zeigte.

Eine A+T-reiche Sequenz (AAAAAGCAATAA) um die -50-Position zeigte eine stromaufwärts gelegene Aktivatorregion an (BUSBY und EBRIGHT, 1994). Das Startkodon ATG war assoziiert mit einer potenziellen Purin-reichen Ribosomenbindestelle AACGGGAG, welche sehr ähnlich dem Konsensus AACGGAG (SHINE und DALGARNO, 1975) war.

Eine Sequenz eines potenziellen ρ -abhängigen Terminators begann 15 bp stromabwärts von ORF5 mit zwei komplementären Palindromstrukturen (**Abb. 22**).

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *catD* von Stamm B13 mit Sequenzen anderer 3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolasen zeigte eine hohe Identität im Bereich von 61% mit der 3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolase aus *P. putida*. 74% identische Aminosäuren zeigte ein Vergleich mit PcaD aus *P. aeruginosa* PAO1.

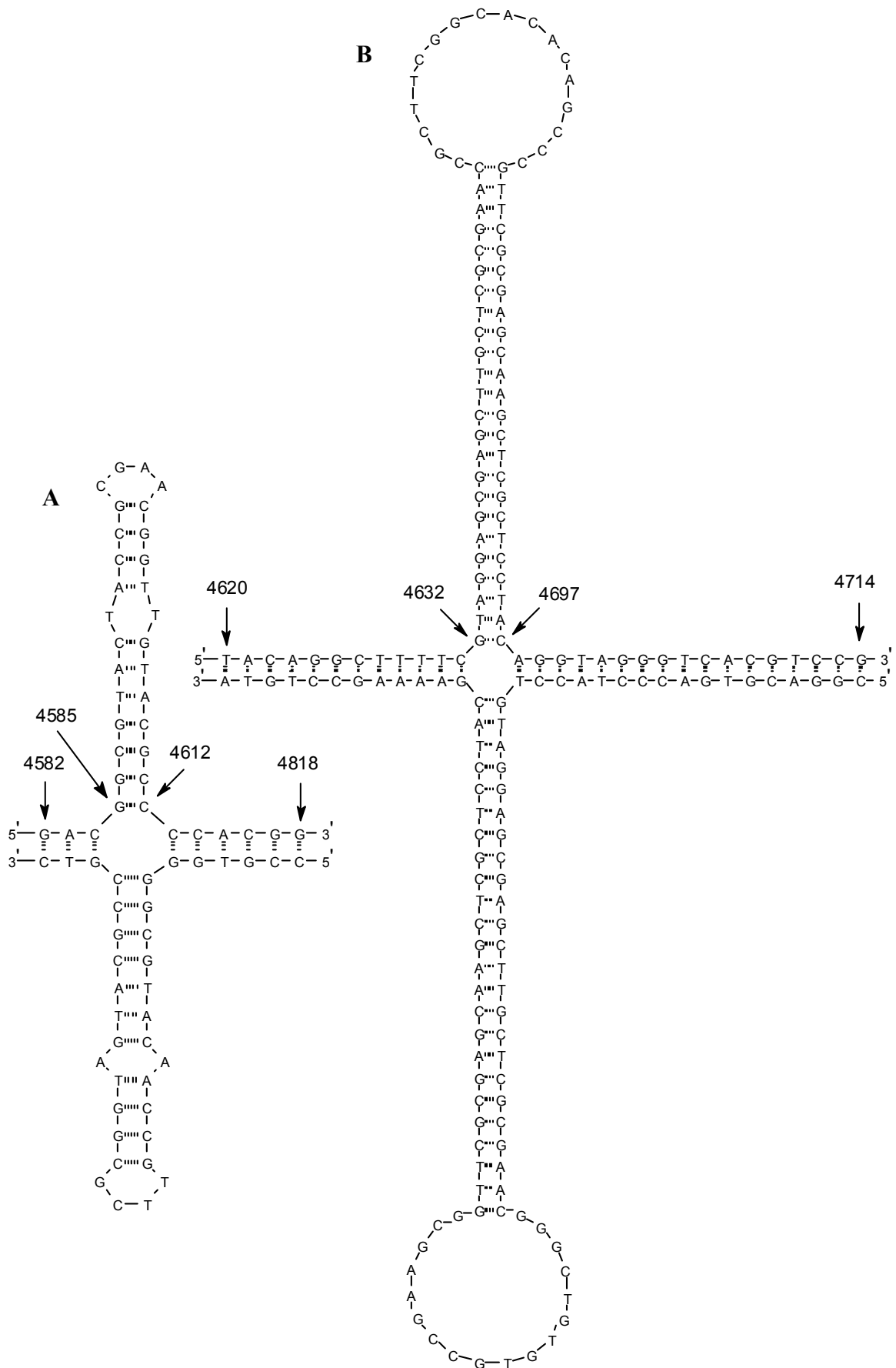


Abb. 22: Erste (A) und zweite (B) komplementäre Palindromstruktur stromabwärts von *catD*. Zahlen geben die Position in einem am Ende erhaltenen 5.9 kb-Fragment an.

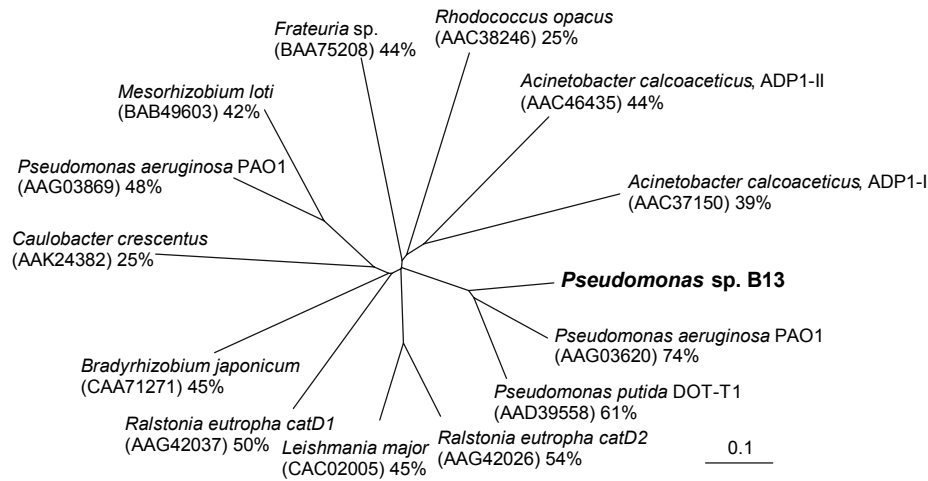


Abb. 23: Unbewurzelter Stammbaum für CatD aus Stamm B13 mit verwandten Hydrolasen. Der Stammbaum basiert auf den abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Der Maßstab zeigt die Menge an genetischen Veränderungen, gemessen als die Zahl an Aminosäure-Austauschen pro Position an. 3-Oxo adipat-Enollacton-Hydrolase (PA0231) (gb|AAG03620 (STOVER et al., 2000); emb|CAA71271, (LORITE et al., 1998); dbj|BAA75208, (MURAKAMI et al. 1999)), 3-Oxo adipat-Enollacton-Hydrolase I (gb|AAC37150, (HARTNETT et al., 1990; HARNETT und ORNSTON, 1994)), 3-Oxo adipat-Enollacton-Hydrolase II (gb|AAC46435, (COLLIER et al., 1998; COLLIER et al., 1997)), wahrscheinliche 3-Oxo adipat-Enollactone-Hydrolase (emb|CAC02005, (MURPHY et al., 2000); dbj|BAB49603, KANEKO et al. 2000)), 3-Oxo adipat-Enollacton-Hydrolase, CatD1 (gb|AAG42037, (HINNER et al., 1998a)), 3-Oxo adipat-Enollacton-Hydrolase, CatD2 (gb|AAG42026, (HINNER et al., 1998b)), 3-Oxo adipat-Enollacton-Hydrolase/4-Carboxymuconolacton-Decarboxylase (gb|AAC38246, (EULBERG et al., 1998); gb|AAK24382, NIERMAN et al., 2001), PcaD-ähnliches Protein (gb|AAD39558, (RAMOS et al., 1998)), wahrscheinliche Hydrolase (PA0480) (gb|AAG03869, (STOVER et al., 2000)).

3.1.4 Sequenzanalyse der Region stromabwärts von *catD*

Stromabwärts der 3-Oxo adipat-Enollacton-Hydrolase wurde ein unvollständiger offener Leserahmen mit einer Länge von 1183 bp gefunden, welcher die gegengesetzte Orientierung von *catIJF* und *catD* besitzt.

Die abgeleitete Proteinsequenz zeigte die höchste Identität von 67% mit einer Acetoacetyl-CoA-Synthetase von *Sinorhizobium meliloti* (CAI et al., 2000). 81% identische Aminosäuren zeigte ein Vergleich mit dem Protein PA1997 von *P. aeruginosa* PAO1, einem Protein mit AMP-bindendem Motiv. Die zweite Terminatorsequenz stromabwärts von *catD* ist wahrscheinlich auch für ORF6 gültig.

3.2 Der *meta*-Weg

3.2.1 Anzucht und Isolierung neuer Stämme mit Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase

Für die Untersuchungen zum *meta*-Weg standen dem Arbeitskreis zur Anzucht und Isolierung neuer Stämme mit Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase verschiedene Umweltproben zur Verfügung (**Tab. 6**).

Tab. 6: Herkunft der Umweltproben.

Stammbezeichnung	Herkunft
SK1	Grundwasser aus Bitterfeld
MAROC 14 und 16	Grundwasser der gleichen Wasserfahne aber an verschiedenen Brunnen genommen
MAROC 10	Sediment aus derselben Wasserfahne wie Proben 14 und 16
BASF	Belebtschlamm aus der Kläranlage der BASF Ludwigshafen

Eine auf Chlorbenzol wachsende Reinkultur wurde unserem Arbeitskreis von KASCHABEK (pers. Mitteilung) zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm wurde aus Bitterfelder Grundwasser mit der Direktmethode (**Kap. 2.10.1**) isoliert und erhielt die Bezeichnung SK1.

Aus dem von der Europäischen Union geförderten Projekt MAROC („Molecular tools for assessing the bioremediation potential in organohalogen-contaminated sites“) standen unterschiedlich belastete Umweltproben zur Verfügung. Die beiden Grundwasserproben 14 und 16 sowie die Sedimentprobe 10 wurden an unterschiedlichen Stellen oder Brunnen genommen, entstammen aber derselben Wasserfahne. Mittels der Direktmethode wurden aus den Proben 14 und 16 die Reinkulturen mit den Bezeichnungen 14-4A, 14-2B, 14-2EK, 16-6A und 16-37A isoliert. Die Reinkultur MG61 wurde wie in **Kap. 2.10.2** beschrieben aus einer Anreicherung mit verlangsamter Chlorbenzoldiffusion mit Hilfe des Test-PCR-Nachweises isoliert.

Aus der von der BASF Ludwigshafen bereitgestellten Belebtschlammprobe wurde mit dieser Methode zwar ebenfalls eine Anreicherungskultur gewonnen, aber keine Reinkultur.

3.2.2 Identifizierung der neuen Chlorbenzol-abbauenden Stämme

3.2.2.1 Identifizierung der Stämme SK1, 16-6A und MG61

Für die taxonomische Einordnung des Stammes SK1 wurde ein API 20 NE-Test durchgeführt. Dieser Test ließ eine Zuordnung des Stammes aufgrund unterschiedlichen Wachstums auf verschiedenen Substraten zur Gattung *Pseudomonas* und zur Spezies *fluorescens* zu (Abb. 24).

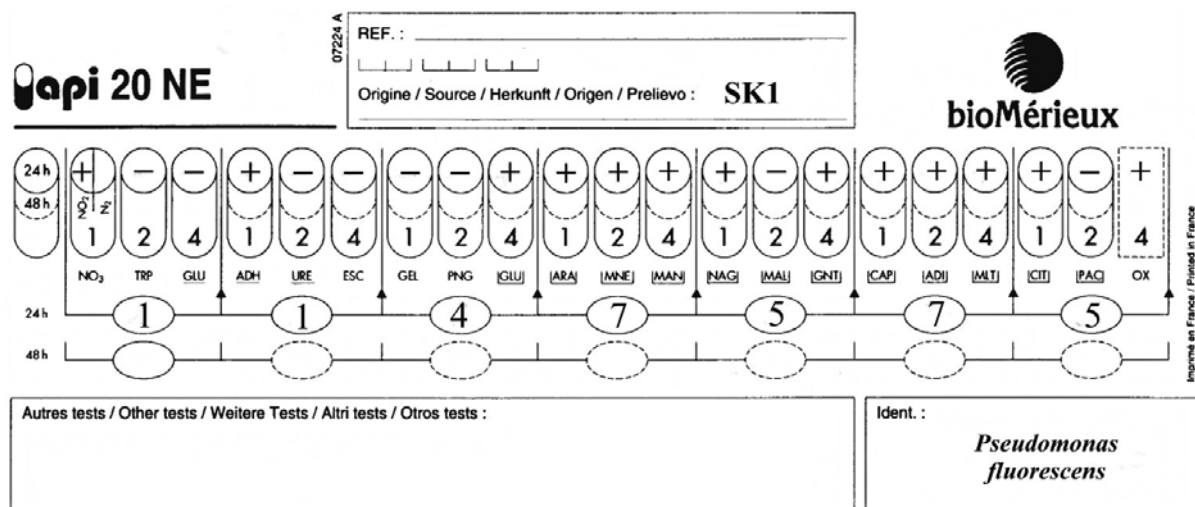


Abb. 24: API 20 NE-Test von Stamm SK1. Abkürzungen: + = positiver Test, - = negativer Test; NO₃ = Nitrat, TRP = Tryptophan, GLU = Glucose, ADH = Arginin-Dehydrolase, URE = Urease, ESC = Äsculin, GEL = Gelatine, PNG = *p*-Nitro-Phenyl-Glucosamin, GLU = Glucose, ARA = Arabinose, MNE = Mannose, MAN = Mannitol, NAG = N-Acetyl-Glucosamin, MAL = Maltose, GNT = Gluconat, CAP = Caprat, ADI = Adipat, MLT = Malat, CIT = Citrat, PAC = Phenyl-Acetat-Assimilation, OX = Oxidase.

Das Wachstum und die Bildung von fluoreszierenden Pyoverdinen von Stamm SK1 auf King B-Agar machte eine Einordnung in die Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden möglich.

Um die bisher erzielten Ergebnisse abzusichern, wurde eine 16S rDNA-Analyse des Stammes SK1 durchgeführt (**Kap. 2.17**). Ein Sequenzvergleich des erhaltenen rekombinanten Plasmids pMGSK116S30 mit BLAST zeigte die größte Übereinstimmung mit *Pseudomonas fluorescens*. **Abb. 25** zeigt einen Stammbaum mit den nächsten Nachbarn von Stamm SK1. Die 16S rDNA aller gezeigten Stämme war zu über 99% mit der aus Stamm SK1 identisch.

Mittels 16S rDNA-Analyse, API 20 NE-Test und Fluoreszenzbildung auf King-Agar B wurde der Stamm SK1 als *Pseudomonas fluorescens* identifiziert.

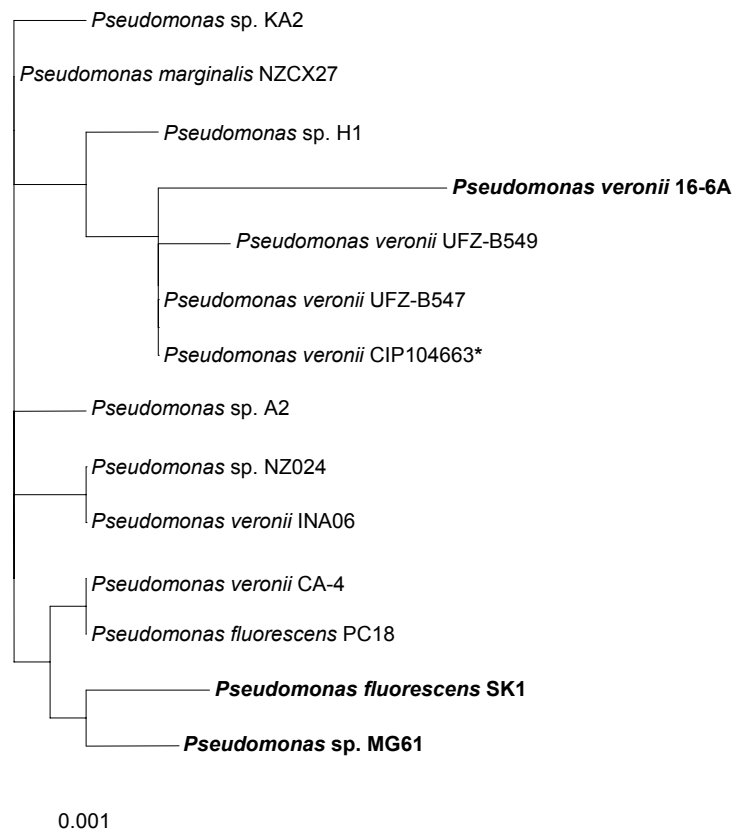


Abb. 25: Phylogenetischer Stammbaum der 16S rDNA aus den Stämmen SK1, 16-6A und MG61 und den nächsten Verwandten. Der Maßstab zeigt die Menge an genetischen Veränderungen, gemessen als die Zahl an Aminosäure-Austauschen pro Position an. *Pseudomonas* sp. KA2 (ERIKSSON und PETERSSON, 1999b; gb|AF195876); *Pseudomonas marginalis* NZCX27 (GODFREY und MARSHALL, 2001; gb|AF364098); *Pseudomonas* sp. H1 (ERIKSSON und PETERSSON, 1999a; gb|AF195777); *Pseudomonas veronii* 16-6A (diese Arbeit); *Pseudomonas veronii* UFZ-B549 (ALFREIDER, 2002a; gb|AF539745); *Pseudomonas veronii* UFZ-B547 (ALFREIDER, 2002b; gb|AY144583); *Pseudomonas veronii* CIP 104663 (ELOMARI et al., 1996; gb|AF064460); *Pseudomonas* sp. A2 (ERIKSSON und PETERSSON, 1999b; gb|195875); *Pseudomonas* sp. NZ024 (GODFREY et al., 2000; gb|AY014806); *Pseudomonas veronii* INA06 (IRIYE, 2001; dbj|AB056120); *Pseudomonas veronii* CA-4 (MEIJER und O'CONNOR, 2002; gb|AY081814); *Pseudomonas fluorescens* PC18 (HEINARU et al., 2000; gb|AF228366); *Pseudomonas fluorescens* SK1 (diese Arbeit); *Pseudomonas* sp. MG61 (diese Arbeit). Die Sequenz des mit * gekennzeichneten Stammes ist zwei Nukleotide kürzer als die der anderen Stämme.

Bei der Identifizierung von Stamm 16-6A wurde folgendermaßen vorgegangen. Zunächst wurden die Isolate der ersten MAROC-Anreicherung auf King B-Agar für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zwar wuchsen die Reinkulturen gut auf dem Medium, jedoch kam es nicht zur Bildung von Pyoverdinen. KOH-Tests zeigten, dass es sich um Gram-negative Organismen handelte. Die Durchführung von API 20 NE-Tests ergab keine eindeutig klassifizierbaren Ergebnisse. Aus diesem Grund wurden mit den Isolaten 16-6A, 16-37A, 14-4A, 14-2B und 14-2EK 16S rDNA-Analysen durchgeführt. Die 16S rDNA-Analysen ergaben, dass es sich um identische Isolate handelte. Diese konnten als *Pseudomonas veronii* eingeordnet werden. Für die weiteren Arbeiten wurde ein Isolat ausgewählt. Der Stamm wurde als *Pseu-*

domonas veronii 16-6A bezeichnet. Das rekombinante Plasmid aus der 16S rDNA-Analyse trug die Bezeichnung pMGTAX16-6A. **Abb. 25** zeigt Stamm 16-6A im Vergleich zu seinen nächsten Verwandten. Die 16S rDNA aller abgebildeten Stämme war mit der aus Stamm 16-6A zu über 99% identisch.

Die Identifizierung von Stamm MG61 wurde nach folgender Vorgehensweise durchgeführt. Zunächst wurde kontrolliert, ob Stamm MG61 Enzyme des *meta*-Weges besitzt. Dazu wurden mit einem Rohextrakt einer Übernachtskultur von in flüssigem LB-Medium angezogenen Zellen Aktivitätstests auf eine Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase (**Kap. 2.18.2.1**) und 4-Oxalocrotonat-Isomerase (**Kap. 2.18.2.4**) durchgeführt. Im Fall der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase mit 3-Chlorocatechol als Substrat wurde ein Wert von 2.5 U/mg Protein ermittelt. Bei der 4-Oxalocrotonat-Isomerase ergab sich mit 4-Oxalocrotonat (Enol-Form) als Substrat ein Wert von 0.7 U/mg Protein.

Zur taxonomischen Einordnung von Stamm MG61 wurde dieser auf King-Agar B zwei Tage bei 30°C kultiviert. Zwar wuchs die Reinkultur gut auf dem Medium, jedoch kam es nicht zur Bildung von Pyoverdinen. Der KOH-Test zeigte, dass es sich um einen Gram-negativen Organismus handelte. Der Oxidase-Test war positiv. Die Durchführung von API 20 NE-Tests ergab kein eindeutig klassifizierbares Ergebnis. Eindeutiges Wachstum zeigte sich auf den Substraten Citrat, Malat, Caprat, Gluconat, Mannose, Mannitol und Glucose.

Aus diesem Grund wurde mit Zellen von MG61 eine 16S rDNA-Analyse durchgeführt und das daraus hervorgegangene rekombinante Plasmid mit pMG61TAX3 bezeichnet. Das Isolat MG61 konnte der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet werden. Eine weitere Spezifizierung war nicht möglich. Deshalb erhielt der Stamm die Bezeichnung *Pseudomonas* sp. MG61. **Abb. 25** zeigt die 16S rDNA aus Stamm MG61 im Vergleich zu den nächsten Verwandten.

3.2.3 RAPD-Analysen

3.2.3.1 RAPD-Analyse der Stämme GJ31, SK1 und 16-6A

Um nachzuweisen, dass es sich bei den in den vorangehenden Kapiteln beschriebenen Isolaten um verschiedene Stämme handelte, wurde die RAPD (Random amplified polymorphic DNA)-Analyse eingesetzt. Die RAPD ist eine Methode für die schnelle Detektion genomischer Polymorphismen, unter Nutzung einzelner kurzer Primer. Diese wurde unter wenig stringenten Bedingungen durchgeführt, um eine reproduzierbare Menge an Stammspezifischen Produkten zu generieren, die anschließend über Gelelektrophorese analysiert werden konnten. In dieser Arbeit wurde das Ready-To-Go™ RAPD Analysis Kit von

Amersham Pharmacia Biotech nach den Angaben des Herstellers verwendet. 5 μ L der PCR-Ansätze wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Gele sind in **Abb. 26** dargestellt. Sie zeigen, dass die Stämme unterschiedlich sind. Stamm GJ31 unterscheidet sich mit allen Primern deutlich von den beiden anderen Stämmen. Zur Unterscheidung zwischen SK1 und 16-6A eignen sich die RAPD Analysis Primer 3, 4 und 5.

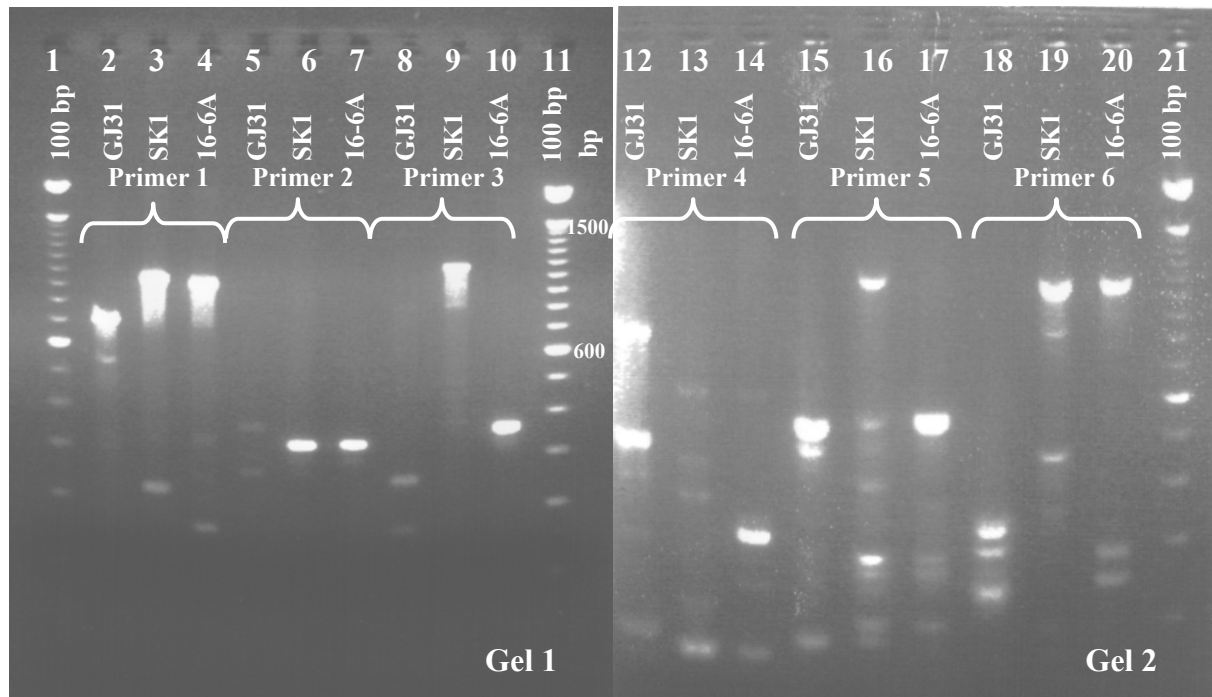


Abb. 26: RAPD-Analyse der Stämme GJ31, SK1 und 16-6A mit den RAPD Analysis Primern 1 bis 3 (Gel 1) und 4 bis 6 (Gel 2).

3.2.3.2 RAPD-Analyse der Stämme MG61 und 16-6A

Wegen der großen Ähnlichkeit der beiden Stämme MG61 und 16-6A wurde eine RAPD-Analyse mit dem Ready-To-Go RAPD Analysis Kit von Amersham und Gesamt-DNA der beiden Stämme durchgeführt. 5 μ L der PCR-Ansätze wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Gele sind in **Abb. 27** zu sehen.

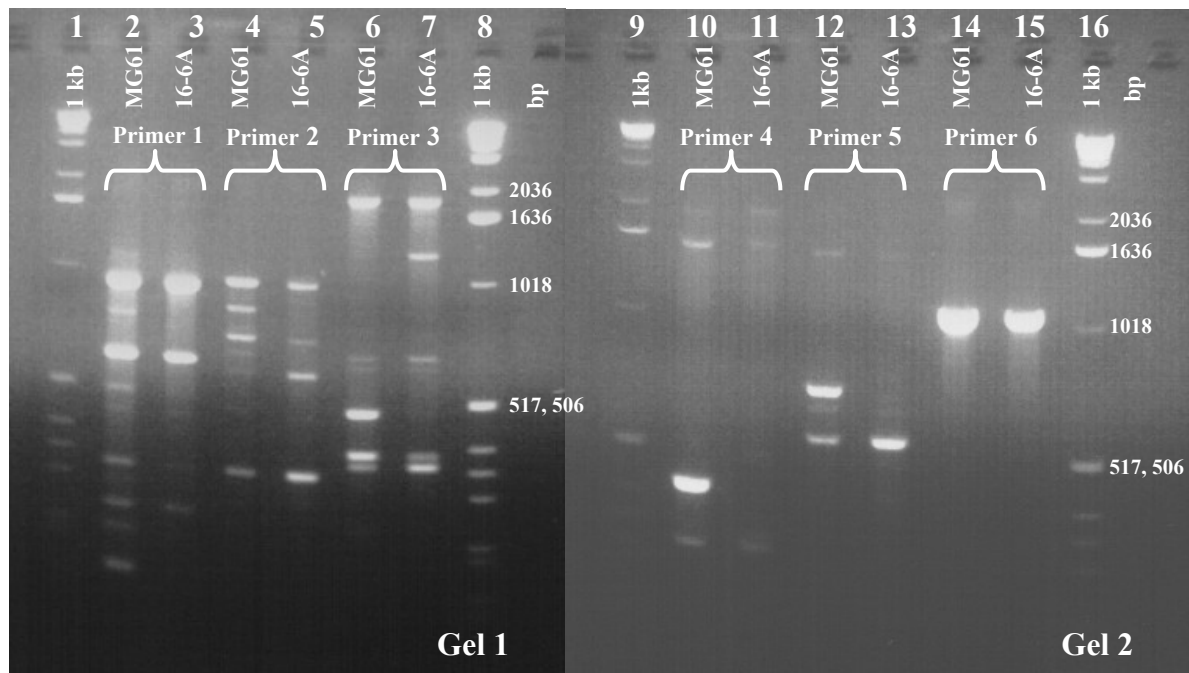


Abb. 27: RAPD-Analyse der Stämme MG61 und 16-6A mit den RAPD Analysis Primern 1 bis 3 (Gel 1) und 4 bis 6 (Gel 2).

Die RAPD-Analyse ergab, dass die beiden Stämme MG61 und 16-6A unterschiedlich sind und mit dieser Methode für weitere Untersuchungen gut unterscheidbar sind. Besonders eignen sich dafür die Primer 2, 3, 4 und 5.

3.2.4 Klonierung und Sequenzierung der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase aus den neuen Stämmen

Zur Amplifizierung der Gensequenz der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm SK1 wurden aus einem Sequenzvergleich verschiedener Dioxygenasen die Primer C23O-1 und C23O-2 generiert, die ein möglichst breites Spektrum an verschiedenen Catechol-2,3-Dioxygenasen aufgrund eingebauter Wobbles abdeckten. Primer, spezifisch für Catechol-2,3-Dioxygenasen, sind veröffentlicht (WIKSTRÖM et al., 1996; SEI et al., 1999; MESARCH et al., 2000), jedoch wurde die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* Stamm GJ31 nicht berücksichtigt. Die Sequenzvergleiche der relevanten Bereiche sind in **Abb. 28** dargestellt.

A

```

( 1)      125⇒ TCTACCTGAAG-GCCTGGACCGAGGT ⇐149
( 2)      131⇒ TCTACCTGAAG-GCCTGGACCGAGGT ⇐155
( 3)      125⇒ TCTATCTGAAG-GCCTGGAGCGAGGT ⇐149
( 4)      125⇒ TCTATCTGAAG-GCCTGGAGCGAGGT ⇐149
( 5)      125⇒ TCTATCTGAAG-GCTTGGACCGAAGT ⇐149
( 6)      125⇒ TCTATCTCAAG-GCTTGGACCGAAGT ⇐149
( 7)      125⇒ TCTATCTGAAG-GCCTGGACTGAGGT ⇐149
( 8)      119⇒ TGTACCTGAAATG-TTGGGACGA-GT ⇐142
( 9)      119⇒ TATATTTGAAGTG-TTGGGATGA-AT ⇐142
(10)     119⇒ TCTACCTGAAATG-CTGGGACGA-GT ⇐142
          * * * * * * * * * *

```

B

```

( 1)      740⇒ GCCTGACTCACGGCAAGACCATCTA ⇐764
( 2)      743⇒ GCCTGACCCATGGCAAGACCATCTA ⇐767
( 3)      740⇒ GCCTGACTCACGGCAAGACCATCTA ⇐764
( 4)      740⇒ GTCTGACCCACGGCAAGACCATCTA ⇐764
( 5)      740⇒ GCCTCACTCACGGCAAGACCATCTA ⇐764
( 6)      740⇒ GCCTGACCCACGGCAAGACCATCTA ⇐764
( 7)      740⇒ GCCTGACTCAGGGCAAGACCATTTA ⇐764
( 8)      758⇒ GCTTCACGCGCGGCCAGACGATCTA ⇐782
( 9)      758⇒ GCATTACACGAGGTGAGACCGTCTA ⇐782
(10)     758⇒ GCATCACACGAGGTGAGACCGTCTA ⇐782
          * * * * * * * * * *

```

Abb. 28: Sequenzvergleich verschiedener Extradiole-Dioxygenasen zur Generierung der Primer C23O-1 (A) und C23O-2 (B). Die Zahlen geben die Positionen in der jeweiligen Dioxygenase-Sequenz an. (1) gb|M33263: Plasmid pV1150 aus *P. putida* CF600, Catechol-2,3-Dioxygenase (*dmpB*) (BARTILSON und SHINGLER, 1989); (2) gb|S77084: *Alcaligenes* sp. KF711, Catechol-2,3-Dioxygenase (MOON et al., 1995); (3) emb|X77856: *P. putida* P35X, Catechol-2,3-Dioxygenase (*phh B*) (NG et al., 1994); (4) gb|M65205: Plasmid pDK1, Catechol-2,3-Dioxygenase, (*xylE*) (BENJAMIN et al., 1991); (5) emb|V01161: *P. putida* mt-2, Catechol-2,3-Dioxygenase, (*xylE*) (NAKAI et al., 1983; ZUKOWSKI et al., 1983); (6) emb|X60740: *P. aeruginosa* J1104, Catechol-2,3-Dioxygenase (*xylEJ1104-1*) (KITAYAMA et al., 1996); (7) gb|M17159: Plasmid NAH7 aus *P. putida*, Catechol-2,3-Dioxygenase (*nahH*) (Ghosal et al., 1987); (8) gb|AF109307: *P. putida* GJ31, Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase (*cbzE*) (MARS et al., 1999); (9) gb|U01826: *P. putida* MT15, Catechol-2,3-Dioxygenase II (*cdo*) (KEIL et al., 1985); (10) emb|X59790: *P. putida* UCC2, 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase (*tdnC*) (MCCLURE, 1991).

Bei einer PCR mit den Primern C23O-1/C23O-2 und Gesamt-DNA aus *P. fluorescens* SK1 wurde ein PCR-Produkt von 640 bp erhalten, was als Hinweis auf eine 2,3-Dioxygenase gewertet wurde. Um die gesamte Nukleotidsequenz der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm SK1 zu erhalten, wurden Primer aus der Sequenz von Stamm GJ31 (MARS et al., 1999) generiert, die einige Nukleotide stromaufwärts des Startkodons und stromabwärts des Stoppkodons angelegt wurden. Die Generierung ergab das Primerpaar C23O-3/C23O-4. PCR-Experimente mit diesen Primern erlaubten die Klonierung der vollständigen Dioxygenase-Sequenz. Für *cbzE* aus Stamm SK1 wurde das rekombinante Plasmid pMGC23O4 hergestellt.

Abb. 29 zeigt, dass die abgeleitete Aminosäuresequenz von CbzE aus Stamm SK1 mit der N-terminalen Sequenz des isolierten Enzyms übereinstimmt (KASCHABEK, pers. Mitteilung).

Abgeleitete Sequenz:	SIMR	VGHVSINVMDMAAAVK
Gereinigtes Enzym:	SIMR (oder Y)	VGHVSINVMDMAA?VK
	****	***** **

Abb. 29: Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der N-terminalen Sequenz der gereinigten Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm SK1. Das Fragezeichen (?) gibt eine unbestimmte Aminosäure, Sterne (*) identische Aminosäuren wieder.

Für Stamm 16-6A ergab die Klonierung des vollständigen *cbzE*-Gens unter Einsatz der Primer CC23O-3/CC23O-4 das rekombinante Plasmid pMG16-6A, für Stamm MG61 pMG61CC23O und für die BASF-Anreicherungskultur pMGBCC23O.

Bei einem Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der in dieser Arbeit ermittelten Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen mit Sequenzen anderer Dioxygenasen konnte festgestellt werden, dass sie alle eine hohe Anzahl identischer Aminosäuren von mehr als 97% mit der Sequenz aus *P. putida* GJ31 aufwiesen (**Abb. 30**). Die Sequenzen von CbzE der Stämme 16-6A und MG61 waren identisch, was darauf zurückzuführen war, dass die Proben aus denen beide Stämme isoliert wurden, von demselben Ort und nur aus unterschiedlichen Brunnen stammten. Insgesamt wiesen die neuen CbzE-Proteine untereinander die höchste Zahl mit mehr als 99% identischer Aminosäuren auf. Die nächsten Verwandten der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen waren die Catechol-2,3-Dioxygenase aus *Comamonas* sp. JS765 und die 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase aus *P. putida* UCC2 mit jeweils über 73% identischer Aminosäuren.

Die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen, die in dieser Arbeit sequenziert wurden, besaßen wie CbzE aus Stamm GJ31 eine Länge von 314 Aminosäuren.

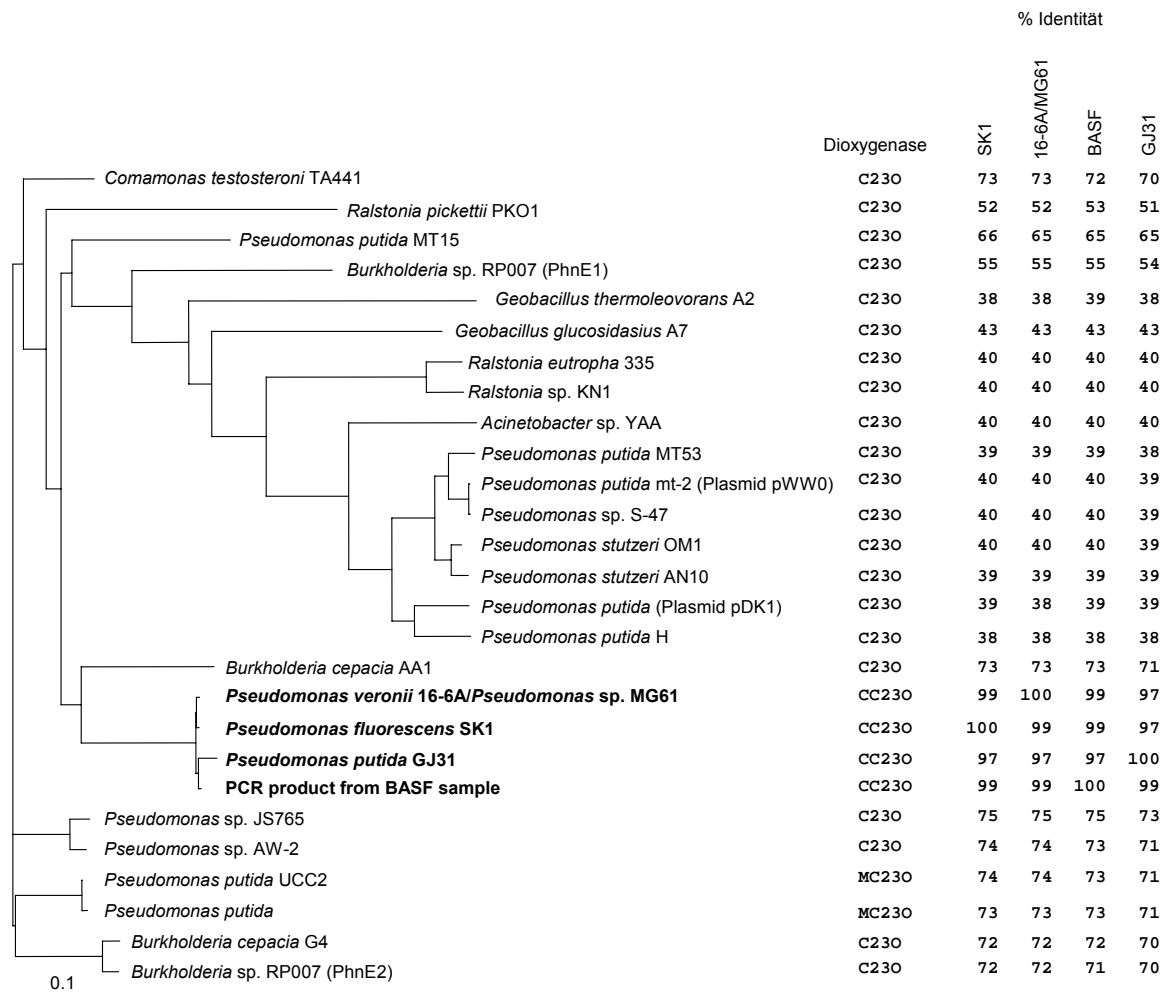


Abb. 30: Unbewurzelter Stammbaum aus den abgeleiteten Aminosäuren der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenasen aus *P. fluorescens* SK1, *P. veronii* 16-6A, der BASF-Anreicherungskultur und *Pseudomonas* sp. MG61 mit ihren nächsten Verwandten. Abkürzungen: C230 = Catechol-2,3-Dioxygenase; CC230 = Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase; MC230 = 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase. Die Tabelle rechts gibt die identischen Aminosäuren der jeweiligen Sequenz im Vergleich zu den Chlorocatechol-2,3-Dioxygenasen in Prozent an. Der Maßstab zeigt die Menge an genetischen Veränderungen, gemessen als die Zahl an Aminosäure-Austauschen pro Position an. *Comamonas testosteroni* TA441 (ARAI et al., 1998; dbj|BAA34176); *Ralstonia pickettii* PKO1 (KUKOR und OLSEN, 1996; gb|AAC13787); *P. putida* MT15 (KEIL et al., 1985; gb|AAC43033); *Burkholderia cepacia* RP007 (PhnE1) (LAURIE und LLOYD-JONES, 1999; gb|AAF02426); *Geobacillus thermoleovorans* A2 (DUFFNER und MÜLLER, 1998; gb|AAC38323); *Geobacillus glucosidasius* A7 (DUFFNER et al., 2000; gb|AAF66550); *Ralstonia eutropha* 335 (KANG et al., 1998; pir||JE0112); *Ralstonia* sp. KN1 (NAKAMURA et al., 2000; dbj|AB031996); *Acinetobacter* sp. YAA (TAKEO et al., 1998; FUJII et al., 1997; dbj|BAA23555); *P. putida* MT53 (KOK et al., 1999; gb|AAC78337); *P. putida* mt-2 (Plasmid pWW0) (THOMAS, 2001; emb|CAC86806); *Pseudomonas* sp. S-47 (NOH et al., 2000; gb|AAF36683); *P. stutzeri* OM1 (OUCHIYAMA et al., 1998; dbj|BAA31264); *P. stutzeri* AN10 (BOSCH et al., 2000; gb|AAD02148); *P. putida* (Plasmid pDK1) (BENJAMIN et al., 1991; sp|Q04285); *P. putida* H (HERRMANN et al., 1995; pir||S47421); *Burkholderia cepacia* AA1 (MA und HERSON, 1996; gb|AAB88079); *P. veronii* 16-6A (diese Arbeit); *Pseudomonas* sp. MG61 (diese Arbeit); *P. fluorescens* SK1 (diese Arbeit); *P. putida* GJ31 (MARS et al., 1999; gb|AAD05250); PCR-Produkt aus einer Anreicherungskultur (diese Arbeit); *Comamonas* sp. JS765 (PARALES et al., 1997; gb|AAC79918); *Pseudomonas* sp. AW-2 (MURAKAMI et al., 1998; pir||JE0127); *P. putida* UCC2 (MCCLURE, 1991; emb|CAA42452); *P. putida* (MCCLURE et al., 1991; pir||S31402); *Burkholderia cepacia* G4 (OH et al., 1997; pir||JC5534); *Burkholderia* sp. RP007 (PhnE2) (LAURIE und LLOYD-JONES, 1999; gb|AAF02430).

3.2.5 Expression der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen und Aktivitätstests

Für die Expression der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen wurden PCRs mit den Primern 16C23O1/16C23O2 und Gesamt-DNA aus den Stämmen SK1 und 16-6A bzw. dem 1043 bp-PCR-Produkt der BASF-Probe durchgeführt (**Kap.** 2.17). Die PCR-Produkte von 968 bp Länge wurden in den Vektor pCR[®]T7/CT-TOPO[®] mit dem pCR[®]T7/CT-TOPO[®] TA Expression Kit von Invitrogen ligiert. Die resultierenden rekombinanten Plasmide pMGSK1ExprCC23O für Stamm SK1 und pMG16ExprCC23O für Stamm 16-6A wurden in TOP10F'-Zellen transformiert. Die Plasmide wurden anschließend für die Durchführung der Aktivitätstests in One Shot[®] BL21(DE3)pLysS-Zellen retransformiert. Die Zellen wurden in LB-Medium mit Ampicillin und Choramphenicol über Nacht angezogen. Mit dem frisch hergestellten Rohextrakt wurden die Aktivitätstests mit 3-Chlorcatechol als Substrat vorgenommen (**Kap.** 2.18.2.1). Die Messungen ergaben einen Wert von 1.5 U/mg Protein für Stamm SK1 und 29.6 U/mg Protein für Stamm 16-6A. Für CbzE aus der BASF-Anreicherungskultur wurde mit dem rekombinanten Plasmid pD3403 (SCHMIDT, pers. Mitteilung) ein Wert von 1.6 U/mg Protein ermittelt (KRANZ, pers. Mitteilung).

Da die Aminosäuresequenzen der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen aus Stamm 16-6A und MG61 identisch waren, konnte hier auf eine Expression verzichtet werden.

3.2.6 Design *cbzE*-spezifischer Primer

Mit Hilfe der Sequenzen der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen aus *P. putida* GJ31 (MARS et al., 1999; gb|AF109307) und *P. fluorescens* SK1 (diese Arbeit), sowie der Sequenz der 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase (*tdnC*) aus *P. putida* UCC2 (emb|X59790) wurde ein Primerpaar entwickelt, das spezifisch für die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen vom Typ GJ31 war. Für die Generierung der Primer wurde zunächst ein Sequenzvergleich mit den verschiedenen oben genannten Dioxygenasen durchgeführt (**Abb.** 31). Die resultierenden Primer CC23O-1 und CC23O-2 waren 16 bzw. 19 Nukleotide lang. CC23O-1 hatte einen G+C-Gehalt von 68.8%, CC23O-2 von 63.2%. Das erwartete Amplifikat hatte bei Verwendung dieser Primer eine Länge von 262 bp.

Die Primer wurden mit Gesamt-DNA der Stämme GJ31 und SK1, sowie plasmidischer DNA eines *E. coli*-Klons mit *tdnC* aus Stamm UCC2 (Plasmid pTDN1-1018) getestet (**Kap.** 2.17). Als Kontrollen wurden zu den Ansätzen jedes Stammes nur CC23O-1, nur CC23O-2 oder CC23O-1 und CC23O-2 gegeben. Bei keinem der Ansätze mit nur einem Primer

resultierte ein Produkt in der zu erwartenden Größe (**Abb. 32**). Dabei ergab die PCR mit plasmidischer DNA mit *tdnC* und beiden Primern wie erwartet kein Amplifikat. Nur die beiden Ansätze von GJ31 und SK1 mit beiden Primern ergaben das Produkt von 262 bp. Zum Nachweis, dass die verwendete DNA von pTDN1-1018 auch PCR-fähig war, wurde diese mit den gegen die Sequenz von Stamm UCC2 generierten Primern UCC2-1/UCC2-2 in weiteren Ansätzen als Kontrolle eingesetzt und das erwartete Amplifikat von 925 bp erhalten (**Kap. 2.17**). Das Programm für die PCR mit den *cbzE*-spezifischen Primern wurde anschließend optimiert (**Kap. 2.17**).

A**CC230-1**

```
(1) 601⇒ TGCTCGAGCAAGCCGCATGACATTGCGTTTGCTGATGCGCCGACTCCCGGCCTGCACCAT ⇐660
(2) 601⇒ TGCTCGAGCAAGCCGCATGACATTGCGTTTGTGGTGCGCCGACTCCCGGCCTGCACCAT ⇐660
(3) 601⇒ CGCACGTCCACGCCACACGACATCGCCTTTGTGGGCGGCCCGTCAGCGGCCTGCACCAC ⇐660
      ** **  *  ***  *  *****  *  ***  *  *  *  *****
```

B**CC230-2**

```
(1) 841⇒ CAGCGGGACCGCCCGGTGACGACTTGGACCGAAGATCAAGCGGGTCGCGCAGTTTCTTC ⇐900
(2) 841⇒ CAGCGGGACCGCCCGGTGACGACTTGGACCGAAGATCAAGCGGGTCGCGCAGTTTCTTC ⇐900
(3) 841⇒ CAGCCCGACCGCCAGTGACCACCTGGAGCGAGGACAAGATGGGCAGAGGGATCTTCTAT ⇐900
      ****  *****  *****  **  ****  ***  **  *  ***  *  *  *  ****
```

Abb. 31: Sequenzvergleich dreier Extradial-Dioxygenasen zur Generierung der *cbzE*-spezifischen Primer CC230-1 (A) und CC230-2 (B). Die Zahlen geben die Positionen in der jeweiligen Dioxygenase-Sequenz an. (1) *P. putida* GJ31, Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase, *cbzE* (MARS et al., 1999; gb|AF109307); (2) *P. fluorescens* SK1, Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase, *cbzE* (diese Arbeit); (3) *P. putida* UCC2, 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase, *tdnC* (MCCLURE, 1991; emb|X59790). Die Nukleotide, die für die Generierung der Primer herangezogen wurden, sind unterstrichen.

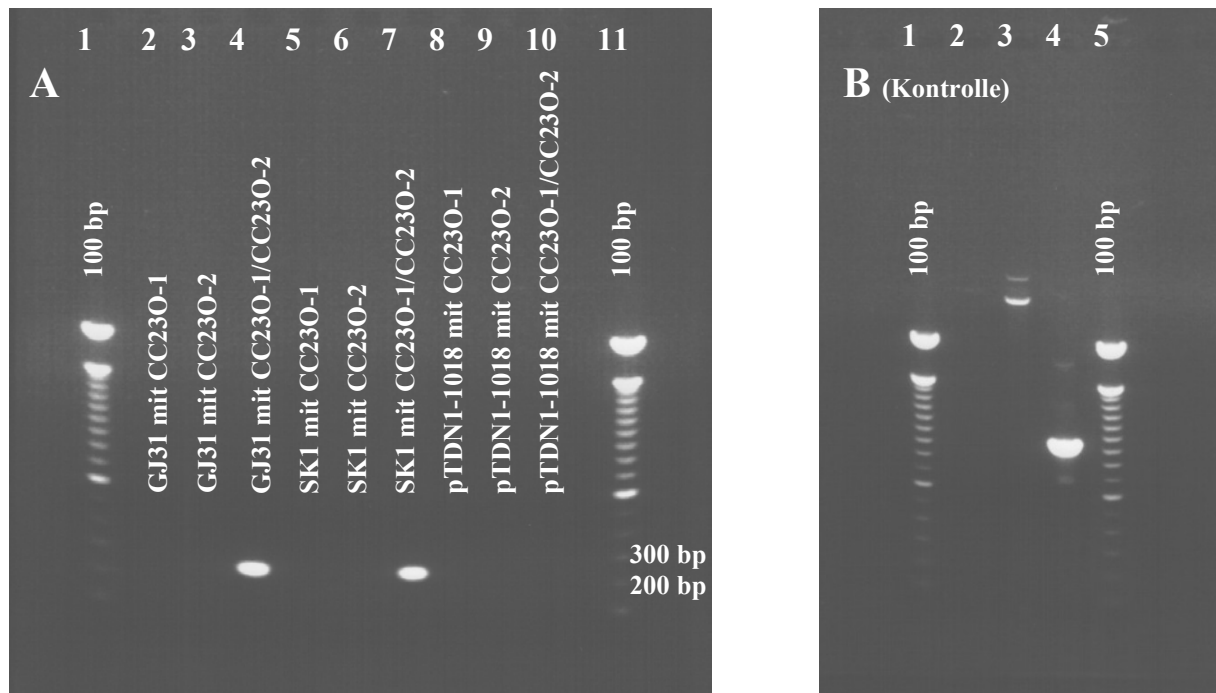


Abb. 32: Test der spezifischen Primer CC230-1 und CC230-2. A: Gelbild der verschiedenen Ansätze von GJ31, SK1 und UCC2 (pTDN1-1018) mit nur einem Primer oder beiden. B: Kontrolle der PCR-Fähigkeit der eingesetzten plasmidischen DNA von pTDN1-1018. Spur 2 zeigt den Ansatz nur mit Primer UCC2-1, Spur 3 nur mit Primer UCC2-2 und Spur 4 mit beiden Primern.

3.2.7 Klonierung der Nukleotidsequenzen stromauf- und stromabwärts des *cbzE*-Gens aus den Stämmen SK1 und 16-6A

MARS et al. (1999) sequenzierten eine 3103 bp große Nukleotidsequenz aus *P. putida* GJ31, auf der sich die Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase befand. Es wurde nun untersucht, ob die Umgebung von *cbzE* der Stämme SK1 und 16-6A ähnlich der aus Stamm GJ31 ist. Daher wurden zwei neue Primerpaare gegen die Sequenz von Stamm GJ31 generiert. Die Primer SUR9/SUR10 deckten dabei den Bereich stromaufwärts der CC230 ab, während die Primer SUR11/SUR12 den Bereich stromabwärts der CC230 beinhalteten. Diese Primer wurden in PCR-Experimenten zusammen mit Gesamt-DNA der Stämme SK1 und 16-6A eingesetzt (**Kap. 2.17**).

Die Klonierungen der Produkte von 1352 bp bzw. 987 bp Länge erbrachten die rekombinanten Plasmide pMGSK1SURU1 und pMGSK1SURD1 für Stamm SK1 und pMG16SURU1 und pMG16SURD1 für 16-6A. **Abb. 33** zeigt die überlappenden Sequenzen der verschiedenen Klone.

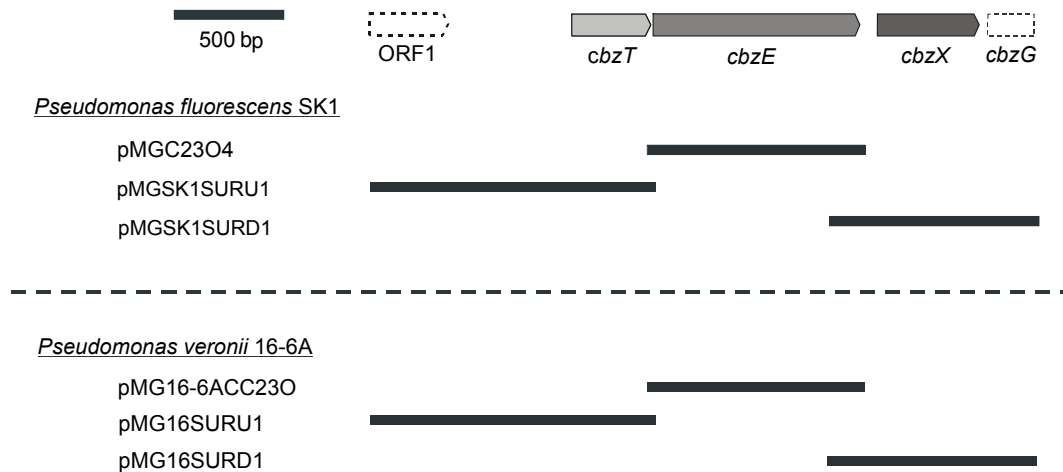


Abb. 33: Schematische Darstellung der Genorganisation der ORFs auf den sequenzierten Bereichen von 3037 bp aus den Stämmen SK1 und 16-6A und die Positionen der klonierten Sequenzen. Bezeichnungen: *cbzT* = Ferredoxin, *cbzE* = Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase, *cbzX* = Protein mit unbekannter Funktion, *cbzG* = 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase.

Die Sequenzen zeigten über den gesamten Bereich der 3037 bp, die von den Primern eingeschlossen wurden, eine hohe Zahl identischer Basenpaare. Wurde Stamm SK1 mit GJ31 verglichen, so waren 9 bp von 3037 bp unterschiedlich, während bei einem Vergleich der Sequenz aus Stamm 16-6A mit der aus GJ31 11 bp unterschiedlich waren. SK1 und 16-6A besaßen in dieser etwa 3 kb großen Sequenz nur sechs unterschiedliche Nukleotide.

Das Ferredoxin CbzT aus den Stämmen SK1 und 16-6A bestand wie das Analogon aus Stamm GJ31 aus 119 Aminosäuren. Das Ferredoxin aus Stamm SK1 und GJ31 war sowohl in der Nukleotid- als auch in der Aminosäuresequenz identisch. Das Ferredoxin aus Stamm 16-6A unterschied sich von diesen beiden in einem Nukleotid bzw. einer Aminosäure. Der nächste Verwandte dieser Proteine war das Pflanzen-typische Ferredoxin (CdoT) aus *Comamonas* sp. JS765 (PARALES et al., 1997; gb|U93090) mit 66% identischer Aminosäuren für die Stämme SK1 und GJ31 bzw. 65% für Stamm 16-6A.

CbzX war ein Protein mit unbekannter Funktion. Es war bei den Stämmen SK1, 16-6A und GJ31 mit 154 Aminosäuren gleich lang. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen waren identisch.

Der *cbzX* stromabwärts folgende offene Leserahmen *cbzG* war unvollständig, konnte aber wie für Stamm GJ31 (MARS et al., 1999) auch für die beiden Stämme SK1 und 16-6A einer 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase zugeordnet werden. Die Nukleotidsequenzen waren über den klonierten Bereich identisch. Eine Base konnte in der Sequenz von *cbzG* aus Stamm GJ31 nicht eindeutig identifiziert werden (S = Cytosin oder Guanin). Der

nächste Verwandte war eine 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase (TdnE) aus *Pseudomonas putida* UCC22 (FUKUMORI, 1996; dbj|BAB62502) mit 65% identischer Aminosäuren für die Stämme SK1 und 16-6A über den klonierten Bereich von 72 Aminosäuren.

Die wahrscheinlichen Ribosomenbindestellen AAGG vor *cbzT*, AGGAG vor *cbzE*, GAGAG vor *cbzG* und die Shine-Dalgarno-ähnliche Sequenz GGA vor *cbzX* fanden sich wie für Stamm GJ31 (MARS et al., 1999) unverändert auch für die Stämme SK1 und 16-6A.

3.2.8 Die Hydratase, Aldolase und Dehydrogenase des unteren *meta*-Weges aus den Stämmen SK1 und 16-6A

Weitere Untersuchungen wurden zu den Genen durchgeführt, die die Enzyme des unteren *meta*-Weges in *P. fluorescens* SK1 und *P. veronii* 16-6A kodierten. Unterschiedliche Primer wurden gegen die Nukleotidsequenzen verschiedener Stämme generiert. Mit den Primern MG-HOA-1/MG-HOA-2, die gegen die Aldolase aus *Pseudomonas putida* CF600 (SHINGLER et al., 1992; emb|CAA43227) und *Pseudomonas putida* KKS102 (KIKUCHI et al., 1994; dbj|03893) generiert wurden, konnten Amplifikate von 932 bp für SK1 und 16-6A erhalten werden (**Kap.** 2.17). Aus den Klonierungen der Amplifikate gingen die Plasmide pMGSK1HOA932 bzw. pMG16HOA932 hervor.

Sequenzierungen der Plasmide pMGSK1HOA932 und pMG16HOA932 ergaben, dass es sich bei beiden Amplifikaten tatsächlich um Teile der Gene von 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolasen handelte. Um die vollständige Sequenz der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase-Gene aus SK1 und 16-6A zu klonieren, wurden weitere Primer generiert. Die Primer UNAB-5/UNAB-6, die gegen die Sequenz von *P. putida* CF600 entwickelt worden waren, ergaben die erwarteten Amplifikate von 2849 bp Länge (**Kap.** 2.17). Die PCR-Produkte wurden kloniert. Dies ergab die Klone pMGSK1UNAB2849 und pMG16UNAB2849. Die Inserts wurden so weit wie möglich ansequenziert.

Für die Bereiche in der Mitte der fast 3 kb großen Sequenzen wurden nochmals Primer generiert. Dies geschah wiederum gegen die entsprechenden Sequenzen von Stamm CF600. Die resultierenden Primer UNAB-1 und UNAB-2 bzw. UNAB-3 und UNAB-4 wurden in PCRs eingesetzt (**Kap.** 2.17). Im Agarosegel konnten PCR-Produkte von 1137 bp bzw. 1150 bp Länge für Stamm SK1 und Stamm 16-6A beobachtet werden, die nach Klonierung die Plasmide pMGSK1UNAB1137 und pMGSK1UNAB1150 für Stamm SK1 bzw. pMG16UNAB1137 und pMG16UNAB1150 zur Stamm 16-6A ergaben.

Für Stamm 16-6A wurden zur Vervollständigung der Sequenzierung des 2849 bp-Stückes weitere Primer gegen die Sequenz von Stamm CF600 entwickelt. Das resultierende Primerpaar 16UNAB7/16UNAB8 wurde in einer PCR eingesetzt (**Kap.** 2.17) und das Amplifikat von 546 bp kloniert. Es wurde das Plasmid pMG16UNAB546 isoliert.

Es wurde insgesamt ein Bereich von 2801 kb aus den beiden Stämme SK1 und 16-6A sequenziert. **Abb.** 34 zeigt die Anordnung der sequenzierten Fragmente. Auf den 2801 kb lagen drei offene Leserahmen, die den jeweiligen 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratasen, Acetaldehyd-Dehydrogenasen (acylierend) und 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolasen zuzuordnen waren. Die Gene der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratasen, der Acetaldehyd-Dehydrogenasen (acylierend) und der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolasen erhielten die Bezeichnungen *cbzJ*, *cbzQ* bzw. *cbzK*.

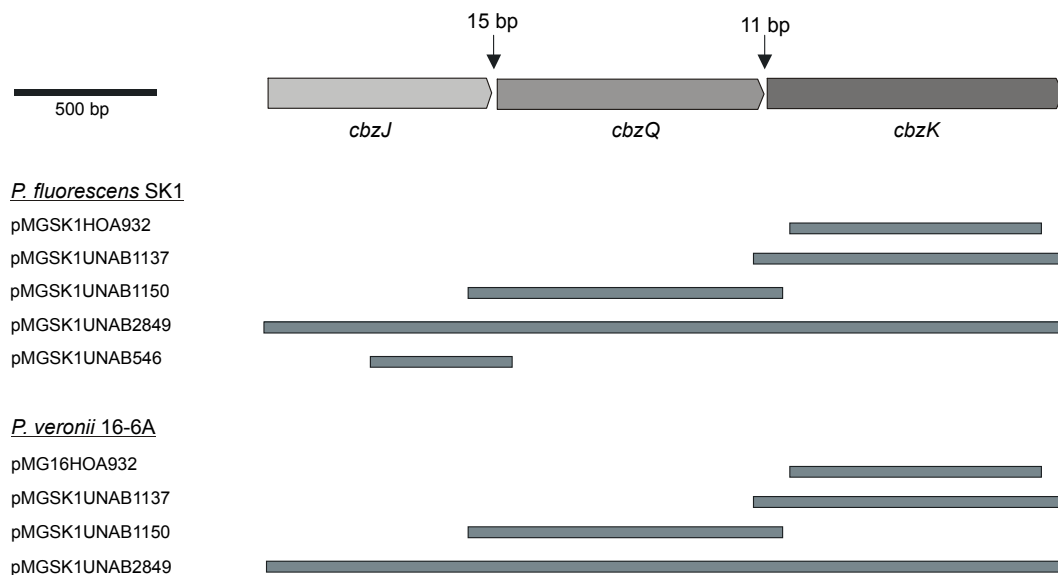


Abb. 34: Schematische Darstellung der Genorganisation der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase und Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) aus den Stämmen SK1 und 16-6A und die Positionen der klonierten Sequenzen. Bezeichnungen: *cbzJ* = 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, *cbzQ* = Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), *cbzK* = 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase. Die Zahlen oberhalb der Pfeile geben die Anzahl der Basenpaare zwischen den einzelnen Genen an.

Die Gene der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratasen (*cbzJ*) aus SK1 und 16-6A sind beide 786 bp lang und zeigten untereinander eine hohe Identität von 99% Nukleotiden. Die Nukleotidsequenzen der Hydratase-Gene beider Stämme zeigten eine hohe Anzahl identischer Basenpaare mit *P. putida* CF600. Im Falle der *cbzJ*-Gene haben SK1 und 16-6A 93% bzw. 94% ihrer Nukleotide mit CF600 gemeinsam. Der G+C-Gehalt ist demnach in der gleichen

Größenordnung: 65.3% für SK1 und 65.0% für 16-6A im Vergleich zu 64.0% für CF600. Für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergaben sich für SK1 und 16-6A jeweils 94% identische Aminosäuren. Mit 40% identischer Aminosäuren war die Ähnlichkeit der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase aus den Stämmen SK1 und 16-6A mit der 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase aus *P. putida* GJ31 (KUNZE, 2002) deutlich geringer. **Abb. 35** zeigt ein Dendrogramm mit Hydratase verschiedener Stämme. Die abgeleiteten Proteine hatten demnach Molekulargewichte von 27797 Da für SK1 und 16-6A im Vergleich zu 27870 Da für CF600.

Stromabwärts der *cbzJ*-Gene folgten im Genom von SK1, 16-6A und CF600 die Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend)-Gene, obwohl die Enzyme im Abbauweg erst nach der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase folgen. Die Dehydrogenase-Gene aus den Stämmen SK1, 16-6A und CF600 waren durch 15 bp von den 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase-Genen getrennt (**Abb. 34**).

Auch im Falle des Gens der Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) (*cbzQ*), das bei allen drei Stämmen 939 bp lang war, waren die Nukleotidsequenzen aus SK1 und 16-6A mit 99% nahezu identisch, und ebenso im Vergleich mit der Sequenz aus Stamm CF600 wurde von beiden Stämmen ein Wert von 99% erreicht. Die G+C-Gehalte waren ebenfalls sehr ähnlich: 65.7% für SK1, 65.6% für 16-6A und 65.3% für CF600. Die Enzyme in den Stämmen SK1 und 16-6A hatten 99% identische Aminosäuren gemeinsam, während das Enzym aus CF600 98% identische Aminosäuren mit dem aus SK1 und dem aus 16-6A aufwies. CbzQ aus Stamm SK1 und CbzQ aus Stamm 16-6A besaßen mit der Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) aus *P. putida* GJ31 83% identische Aminosäuren. Die Stämme SK1, 16-6A und CF600 kommen bei ihrer Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) auf sehr ähnliche berechnete Werte von 32615 Da für SK1, 32687 Da für 16-6A und 32689 für CF600.

Die in den Genomen der Stämme SK1, 16-6A und CF600 den *cbzQ*-Genen folgenden 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase-Gene (*cbzK*) waren von den Genen der Acetaldehyd-Dehydrogenasen (acylierend) in diesen drei Stämmen durch 11 bp getrennt. Sie hatten bei allen drei Stämmen eine Länge von 1038 bp. Die *cbzK*-Gene aus den Stämmen SK1, 16-6A und CF600 hatten untereinander verglichen jeweils 99% identische Nukleotide. Die G+C-Gehalte waren für die *cbzK*-Gene aus den drei Stämmen fast gleich: 62.0% für SK1 und 16-6A, 61.9% für CF600. Die CbzK-Proteinsequenzen aus SK1 und 16-6A waren identisch, während CF600 mit SK1 und 16-6A 94% identische Aminosäuren hatte. Mit der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase aus *P. putida* GJ31 hatten sie 77% identische Aminosäuren gemeinsam (**Abb. 37**).

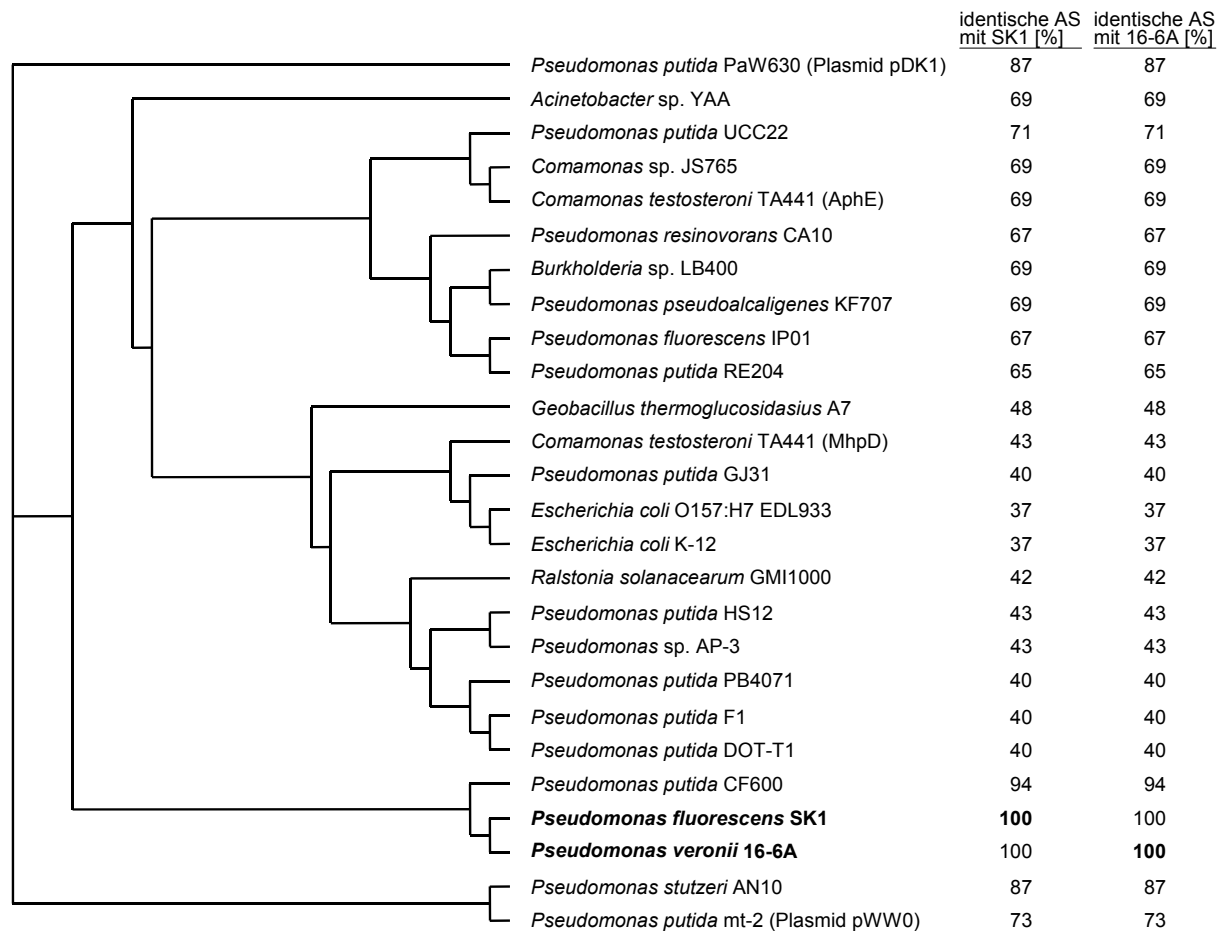


Abb. 35: Unbewurzelter Stammbaum der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase aus Stamm SK1 und 16-6A mit ihren nächsten Verwandten. Die Tabelle rechts gibt den Anteil der identischen Aminosäuren der jeweiligen Sequenz im Vergleich zu den Hydratase aus Stamm SK1 und 16-6A in Prozent an. *P. putida* PaW630 (Plasmid pDK1): 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, XylJ (BENJAMIN et al., 1999; gb|AAL83663); *Acinetobacter* sp. YAA: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, AtdE (TAKEO et al., 1998; FUJII et al., 1997; dbj|BAA23558); *P. putida* UCC22 (Plasmid pTDN1): 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, TdnG (FUKUMORI, 1996; dbj|BAB62054); *Comamonas* sp. JS765: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, CdoH (HE et al. 1999; gb|AAG17135); *Comamonas testosteroni* TA441: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, AphE (ARAI et al., 2000; dbj|BAA88502); *P. resinovorans* CA10: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, CarD (SATO et al., 1997a; SATO et al., 1997b; NOJIRI et al., 2001; dbj|BAB32773); *Burkholderia* sp. LB400: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, BphH (HOFER et al., 1994; emb|CAA54034); *P. pseudoalcaligenes* KF707: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, BphX1 (KIMURA et al., 1997; WATANABE et al., 2000; dbj|BAA12884); *P. fluorescens* IP01: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, CumE (HABE et al., 1996; dbj|BAA09692); *P. putida* RE204 (Plasmid pRE4): 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, IpbE (EATON und TIMMIS, 1986; gb|AAC03442); *Geobacillus thermoglucosidasius* A7: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, PheD (DUFFNER et al., 2000; gb|AAF66552); *Comamonas testosteroni* TA441: 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase, MhpD (ARAI et al., 1999; dbj|AB02335); *P. putida* GJ31: 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase, CbzJ(2) (KUNZE, 2002); *E. coli* O157:H7 EDL933: 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase, MhpD (PERNA et al., 2001; ref|NP_286093); *E. coli* K-12: 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase, MhpD (FERRANDEZ et al., 1997a; emb|CAA70750); *Ralstonia solanacearum* GMI1000: wahrscheinliches Hydratase-Protein (SALANOUBAT et al., 2002; ref|NP_522452); *P. putida* HS12: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, NbzG (PARK und KIM, 2000; gb|AAK26522); *Pseudomonas* sp. AP-3: Hydratase für 2-Oxopent-4-enoat, AmnF (TAKENAKA et al., 2000; dbj|BAB03534); *P. putida* PB4071: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, TobG (LI und TAN, 1999; gb|AAG09414); *P. putida* F1: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, TobG (LAU et al., 1994; gb|AAA61942); *P. putida* DOT-T1: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, TobG (MOSQUEDA et al., 1999; emb|CAB43732); *P. putida* CF600: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, DmpE (SHINGLER et al., 1992; emb|CAA43225); *P. fluorescens* SK1: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, CbzJ (diese Arbeit); *P. veronii* 16-6A: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, CbzJ (diese Arbeit); *P. stutzeri* AN10: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, NahL (BOSCH et al., 2000; gb|AAD02151); *P. putida* mt-2 (Plasmid pWW0): XylJ (THOMAS, 2001; emb|CAC86803).

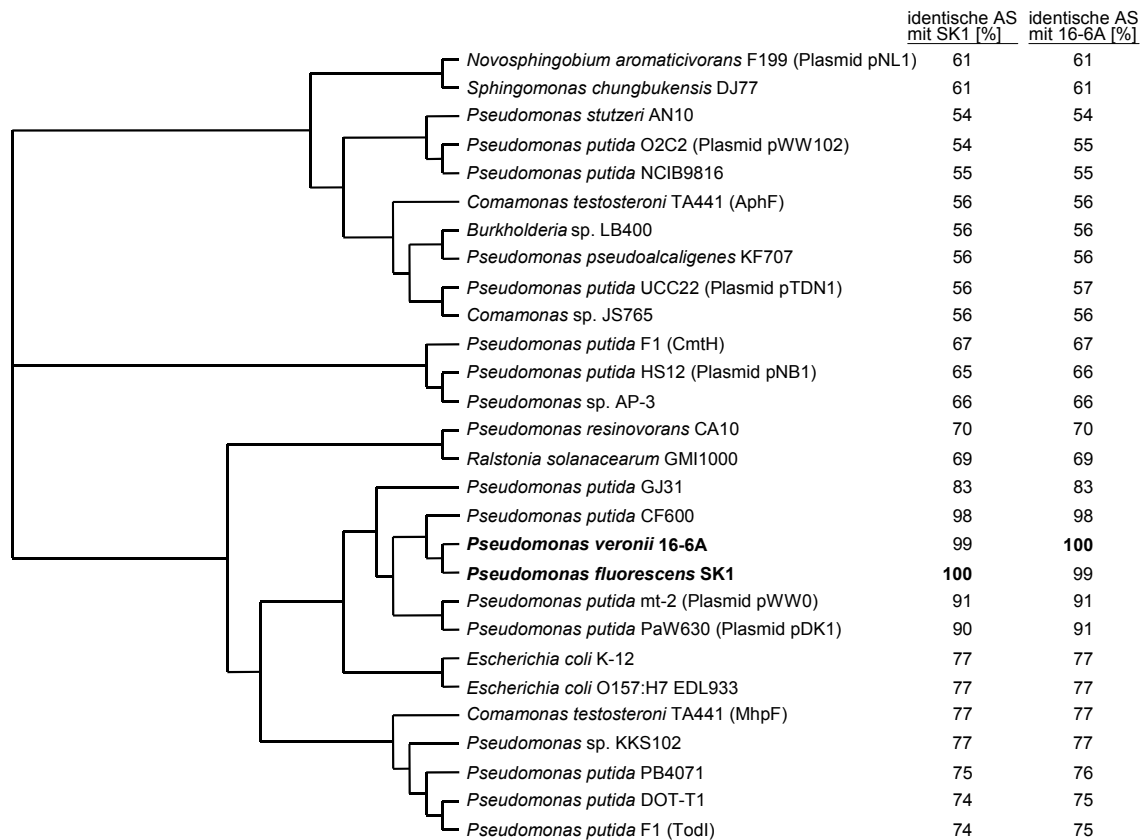


Abb. 36: Unbewurzelter Stammbaum der Acetaldehyd-Dehydrogenasen (acylierend) auf Stamm SK1 und 16-6A mit ihren nächsten Verwandten. Die Tabelle rechts gibt den Anteil der identischen Aminosäuren der jeweiligen Sequenz im Vergleich zu den Dehydrogenasen aus Stamm SK1 und 16-6A in Prozent an. *Novosphingobium aromaticivorans* F199 (Plasmid pNL1): Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), XylQ (ROMINE et al., 1999; ref|NP_049198); *Sphingomonas chungbukensis* DJ77: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), PhnI (HWANG et al., 1999; gb|AAC95294); *P. stutzeri* AN10: Acetaldehyd-Dehydrogenase, NahO (BOSCH et al., 2000; gb|AAD02152); *P. putida* O2C2 (Plasmid pWW102): Acetaldehyd-Dehydrogenase, XylQ (AEMPRAPA und WILLIAMS, 1998; gb|AAC38581); *P. putida* NCIB9816: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), NahO (PLATT et al., 1995; gb|BAA12885); *Comamonas testosteroni* TA441: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), AphF (ARAI et al., 2000; dbj|BAA88503); *Burkholderia* sp. LB400: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), BphJ (HOFER et al., 1994; emb|CAA54035); *P. pseudoalcaligenes* KF707: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), BphX2 (KIMURA et al., 1997; WATANABE et al., 2000; dbj|BAA12885); *P. putida* UCC22 (Plasmid pTDN1): Acetaldehyd-Dehydrogenase, TdnI (FUKUMORI et al., 1996; dbj|BAB62056); *Comamonas* sp. JS765: Acetaldehyd-Dehydrogenase, CdoI (HE et al., 1999; gb|AAG17136); *P. putida* F1: Acetaldehyd-Dehydrogenase, CmtH (EATON, 1996; EATON, 1997; gb|AAB62294); *P. putida* HS12 (Plasmid pNB1): Acetaldehyd-Dehydrogenase, NbzI (PARK und KIM, 2000; gb|AAK26525); *Pseudomonas* sp. AP-3: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), AmnH (TAKENAKA et al., 1997; TAKENAKA et al., 2000; dbj|BAB03537); *P. resinovorans* CA10: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), CarF (SATO et al., 1997a; SATO et al., 1997b; NOJIRI et al., 2001; dbj|BAB32776); *Ralstonia solanacearum* GMI1000: wahrscheinliche Acetaldehyd-Dehydrogenase (SALANOUBAT et al., 2002; ref|NP_522455); *P. putida* GJ31: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), CbzQ (KUNZE, pers. Mitteilung); *P. putida* CF600: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), DmpF (SHINGLER et al., 1992; emb|CAA43226); *P. veronii* 16-6A: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), CbzQ (diese Arbeit); *P. fluorescens* SK1: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), CbzQ (diese Arbeit); *P. putida* mt-2 (Plasmid pWW0): Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), XylQ (THOMAS, 2001; emb|CAC86802); *P. putida* PaW630 (Plasmid pDK1): Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), XylQ (BENJAMIN et al., 1999; gb|AAL83664); *E. coli* K-12: Acetaldehyd-Dehydrogenase, MhpF (BLATTNER et al., 1997; ref|NP_414885); *E. coli* O157:H7 EDL933: Acetaldehyd-Dehydrogenase, MhpF (PERNA et al., 2001; ref|NP_286094); *Comamonas testosteroni* TA441: Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend), MhpF (ARAI et al., 1999; dbj|BAA82883); *Pseudomonas* sp. KKS102: Acetaldehyd-Dehydrogenase, BphG (KIKUCHI et al., 1994; dbj|BAA03892); *P. putida* PB4071: acylierende Aldehyd-Dehydrogenase, TobI (LI und TAN, 1999; gb|AAG09415); *P. putida* DOT-T1: acylierende Aldehyd-Dehydrogenase, TodI (MOSQUEDA et al., 1999; emb|CAB43733); *P. putida* F1: acylierende Aldehyd-Dehydrogenase, TodI (LAU et al., 1994; gb|AAA61943).

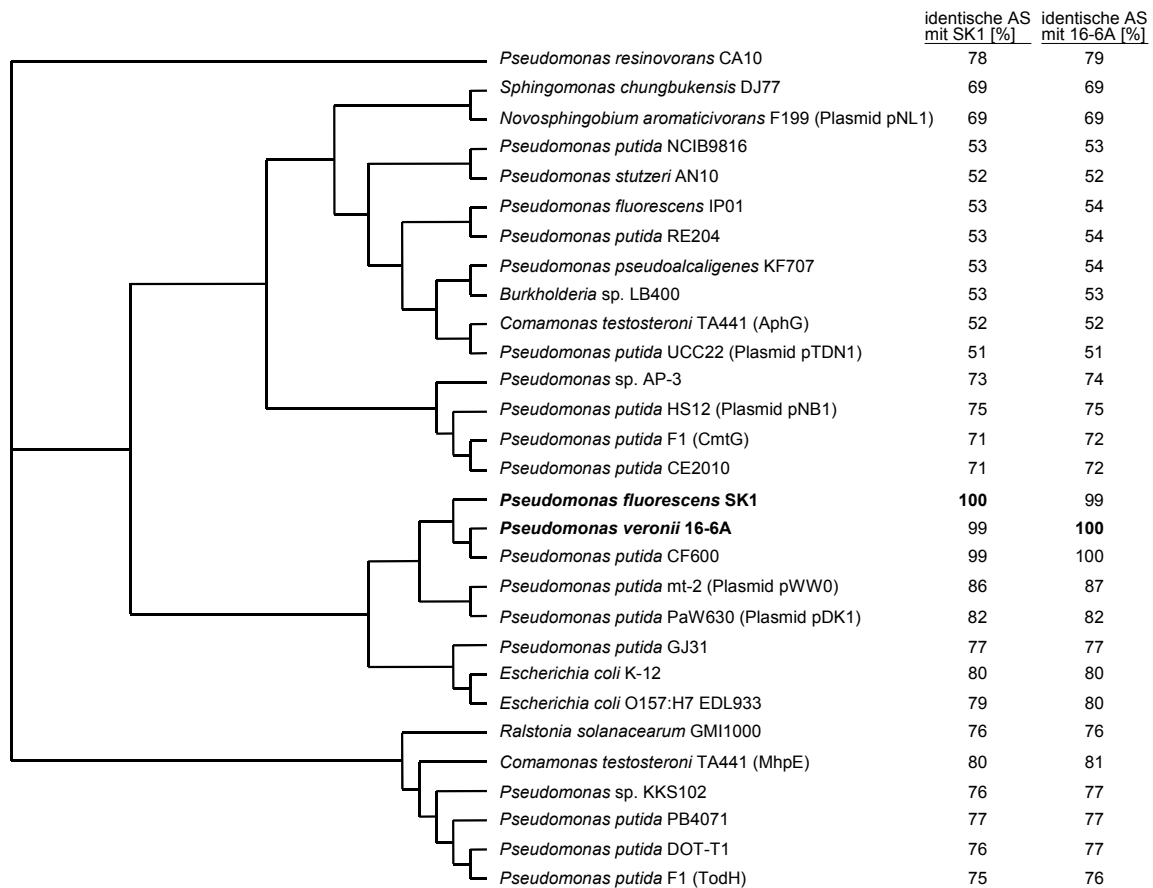


Abb. 37: Unbewurzelter Stammbaum der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolasen aus Stamm SK1 und 16-6A mit ihren nächsten Verwandten. Die Tabelle rechts gibt den Anteil der identischen Aminosäuren der jeweiligen Sequenz im Vergleich zu den Aldolasen aus Stamm SK1 und 16-6A in Prozent an. *P. resinovorans* CA10: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, CarE (SATO et al., 1997a; SATO et al., 1997b; NOJIRI et al., 2001; dbj|BAB32777); *Sphingomonas chungbukensis* DJ77: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, PhnJ (HWANG et al., 1999; gb|AAC95295); *Novosphingobium aromaticivorans* F199 (Plasmid pNL1): 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, XylK (ROMINE et al., 1999; ref|NP_04197); *P. putida* NCIB9816: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, NahM (PLATT et al., 1995; gb|AAA89107); *P. stutzeri* AN10: 2-Oxo-4-hydroxy-pentenoat-Aldolase, NahM (BOSCH et al., 2000; gb|AAD02153); *P. fluorescens* IP01: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, CumF (HABE et al., 1996; dbj|BAA09694); *P. putida* RE204: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, IpbF (EATON und TIMMIS, 1986; gb|AAC03444); *P. pseudoalcaligenes* KF707: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, BphX3 (KIMURA et al., 1997; dbj|BAA12886); *Burkholderia* sp. LB400: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, BphI (HOFER et al., 1994; emb|CAA54036); *Comamonas testosteroni* TA441: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, AphG (ARAI et al., 2000; dbj|BAA88504); *P. putida* UCC22 (Plasmid pTDN1): 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, TdnJ (FUKUMORI et al., 1996; dbj|BAB62057); *Pseudomonas* sp. AP-3: Aldolase für 4-Hydroxy-2-oxovalerat, AmnG (TAKENAKA et al., 1997; TAKENAKA et al., 2000; dbj|BAB03528); *P. putida* HS12 (Plasmid pNB1): 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, NbzH (PARK und KIM, 2000; gb|AAK26526); *P. putida* F1: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, CmtG (EATON, 1996; EATON, 1997; gb|AAB62295); *P. putida* CE2010: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase; CmtG (OHTA et al., 2001; dbj|BAB17781); *P. fluorescens* SK1: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, CbzK (diese Arbeit); *P. veronii* 16-6A: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, CbzK (diese Arbeit); *P. putida* CF600: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, DmpG (SHINGLER et al., 1992; emb|CAA43227); *P. putida* mt-2 (Plasmid pWW0): XylK (THOMAS, 2001; emb|CAC86801); *P. putida* PaW630 (Plasmid pDK1): 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, XylK (BENJAMIN et al., 1999; gb|AAL83665); *P. putida* GJ31: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, CbzK (KUNZE, pers. Mitteilung); *E. coli* K-12: 4-Hydroxy-2-ketovalerat-Aldolase, MhpE (BLATTNER et al., 1997; ref|NP_414886); *E. coli* O157:H7 EDL933: 4-Hydroxy-2-ketovalerat-Aldolase, MhpE (PERNA et al., 2001; ref|NP_286095); *Ralstonia solanacearum* GMI1000: wahrscheinliche 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase (SALANOUBAT et al., 2002; ref|NP_522456); *Comamonas testosteroni* TA441: 4-Hydroxy-2-ketovalerat-Aldolase, MhpE (ARAI et al., 1999; dbj|BAA82884); *Pseudomonas* sp. KKS102: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, BphF (KIKUCHI et al., 1994; dbj|BAA03893); *P. putida* 4071: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, TobH (LI und TAN, 1999; gb|AAG09416); *P. putida* DOT-T1: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, TodH (MOSQUEDA et al., 1999; emb|CAB43734); *P. putida* F1: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, TodH (LAU et al., 1994; gb|AAA61944).

Abb. 46 im Anhang zeigt ein Alignment der 2.9 kb-Nukleotidsequenzen aus SK1 und 16-6A mit der entsprechenden Sequenz aus *P. putida* CF600.

Die 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratasen und Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) aus Stamm SK1 und 16-6A wurden exprimiert. Für die Expression der *cbzJ*-Gene wurden bei Stamm SK1 das Primerpaar SK1-OEH-1/SK1-OEH-2 und bei 16-6A das Primerpaar SK1-OEH-1/16-OEH-2 eingesetzt. Aus den PCR-Produkten folgten durch Klonierung die rekombinanten Plasmide pMGSK1ExprOEH bzw. pMG16ExprOEH bei den *cbzJ*-Genen und pMGSK1ExprADA bzw. pMG16ExprADA bei den *cbzQ*-Genen.

Zur Durchführung der Aktivitätstests wurden die Zellen in LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol über Nacht angezogen. Die Aktivitätstests wurden mit frisch hergestellten Rohextrakten der Expressionsstämme durchgeführt.

Die Messungen auf 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase-Aktivität (**Kap. 2.18.2.2**) ergaben mit Vinylpyruvat als Substrat einen Wert von 34.3 U/mg Protein für *P. fluorescens* SK1 und von 11.7 U/mg Protein für *P. veronii* 16-6A.

Durch Sequenzierungen wurde festgestellt, dass das exprimierte Hydratase-Gen aus Stamm SK1 gegenüber dem ursprünglich sequenzierten Gen an Position 598 einen Fehler enthielt, der vermutlich auf einen Amplifizierungsfehler in der PCR zurückzuführen ist. Im Expressionsplasmid pMGSK1ExprOEH fand sich an Position 598 ein Thyminrest statt eines Cytosinrestes des Templates. Dies hatte aber keinerlei Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und damit das Protein.

Die Messungen der Aktivität auf Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) (**Kap. 2.18.2.3**) ergaben mit Acetaldehyd als Substrat einen Wert von 19.6 mU/mg Protein für *P. fluorescens* SK1 und von 2.1 mU/mg Protein für *P. veronii* 16-6A.

Durch Sequenzierungen des Expressionsplasmids pMGSK1ExprADA wurde festgestellt, dass sich an Position 833 ein Thyminrest befand statt eines Guaninrestes des Templates. Dieser Austausch führte zu einer Änderung der Aminosäure von Glutaminsäure im Expressionsplasmid gegen Glycin des Templates an Position 278. Durch Sequenzierungen des Expressionsplasmids pMG16ExprADA wurde nachgewiesen, dass sich an Position 668 im Expressionsplasmid ein Cytosinrest statt eines Thyminrestes des Templates befand, was zu einer Änderung der Aminosäure von Alanin im Expressionsplasmid gegen Valin des Templates an Position 223 in der Proteinsequenz führte. Diese Fehler sind ebenfalls, durch Amplifizierungsfehler in den PCRs zu erklären.

4 Diskussion

4.1 Gene des unteren *ortho*-Weges in *Pseudomonas* sp. B13

Nachdem KASCHABEK et al. (2002) die Transferase und Thiolase des unteren *ortho*-Weges in *Pseudomonas* sp. B13 untersucht hatten, sollten in der vorliegenden Arbeit die Gene dieser Enzyme nachgewiesen werden. Wie im experimentellen Teil beschrieben, wurde in dieser Arbeit ein DNA-Bereich von 5.9 kb aus Stamm B13 isoliert und sequenziert, der die Gene für die Enzyme der 3-Oxadipat: Succinyl-CoA-Transferase, 3-Oxadipyl-CoA-Thiolase, 3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolase und einen Teil eines Gens mit einem AMP-bindenden Motiv enthält. Alle identifizierten ORFs, außer ORF6, besitzen dieselbe Orientierung. Die Gesamtorganisation der Gene *catI*, *catJ* und *catF*, die den unteren Abbauweg in *Pseudomonas* sp. Stamm B13 kodieren, ist identisch mit *pca*- und *cat*-Clustern aus *A. calcoaceticus* und dem *pca*-Cluster aus *P. aeruginosa* PAO1, aber unterschiedlich zur Organisation der Gene in *P. putida* (Abb. 38).

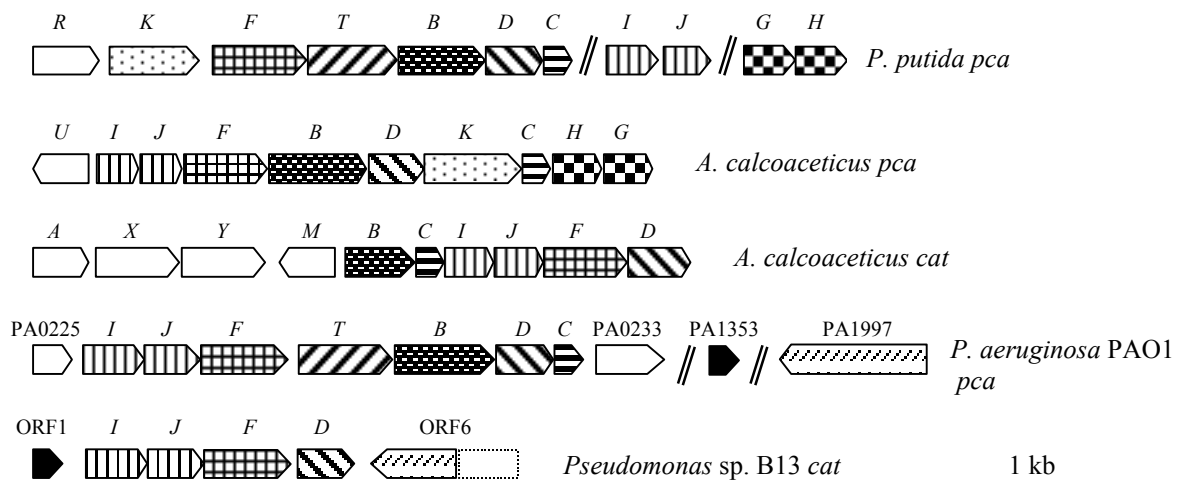


Abb. 38: Organisation der Gencluster für den Protocatechuat- (*pca*) und (Chlor-)Catechol- (*cat*)-Metabolismus in ausgewählten Bakterienstämmen. Die Pfeile zeigen die Richtung der Transkription an. Doppelte Schrägstriche geben Zwischenräume von mehr als 10 kbp an. Die Informationen wurden zusammengestellt aus folgenden Quellen: *A. calcoaceticus* (HARTNETT et al., 1990; HARTNETT und ORNSTON, 1994; HARWOOD und PARALES, 1996; KOWALCHUK et al., 1994; SHANLEY et al., 1994), *P. putida* (HARWOOD et al., 1994; HARWOOD und PARALES, 1996; PARALES und HARWOOD, 1992), *P. aeruginosa* PAO1 (STOVER et al., 2000) und Stamm B13 (diese Arbeit). Genbezeichnungen: *catA*, Catechol-1,2-Dioxygenase; *catB*, Muconat-Cycloisomerase; *pcaB*, Carboxymuconat-Cycloisomerase; *catC*, Muconolacton-Isomerase; *pcaC*, Carboxymuconolacton-Decarboxylase; *catD* und *pcaD*, 3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolase; *catF* und *pcaF*, Thiolase; *pcaHG*, Protocatechuat-3,4-Dioxygenase; *pcaJ* und *catJ*, Transferase; *pcaK* und *pcaT*, Transportproteine; *pcaR*, *pcaU* und *catM*, Regulatoren; *catX* und *catY*, unbekannte Funktion.

In Stamm B13 folgt dem Thiolase-Gen, wie im Falle des *cat*-Clusters in *A. calcoaceticus*, das Hydrolase-Gen. Bei einem Vergleich des Clusters aus B13 mit *cat*-Genen, findet sich ein viel breiterer Zwischenraum zwischen *catF* und *catD* in B13 im Vergleich zu *catF* und *catD* in *A. calcoaceticus*. Darüber hinaus wurde ein Promotor vor *catD* aus B13 gefunden, der zwischen *catF* und *catD* in *A. calcoaceticus* nicht vorhanden ist. Genzwischenräume von 12 bp wurden zwischen dem Transferase- und Thiolase-Gen der *pca*- und *cat*-Cluster in *A. calcoaceticus* gefunden (HARWOOD und PARALES, 1996), während eine Überlappung in *Pseudomonas* sp. B13 zwischen *catJ* und *catF* vorhanden ist. Ein Zwischenraum von 8 bzw. 10 bp trennt die Gene der Untereinheiten der Transferase in *A. calcoaceticus* bzw. *P. putida*. Die Gene aus Stamm B13 überlappen mit 1 bp. Die Daten lassen vermuten, dass *catI*, *catJ* und *catF* ein Operon in *Pseudomonas* sp. B13 bilden.

Da in *A. calcoaceticus* das Muconolacton-Isomerase-Gen (*catC*) stromabwärts des Transferase-Gens (*catIJ*) lokalisiert ist und eine Länge von 291 bp besitzt (SHANLEY et al., 1994), wurde vermutet, dass ORF1, ebenfalls eine kurze Sequenz, möglicherweise analog zu *catC* sein könnte. Der Sequenzvergleich zeigte jedoch keine Ähnlichkeit.

Nach Analyse der in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen können im Vergleich mit Sequenzen von CoA-Transferasen, Thiolasen und Hydrolasen anderer Stämme einige wichtige Bemerkungen gemacht werden.

Die Ähnlichkeit der Thiolase-Sequenzen in α -, β -, γ - und ϵ -Proteobakterien, wie auch Gram-positiven mit niedrigem und hohem G+C-Gehalt ist nicht nur signifikant für die Enzyme, die in den Abbau von aromatischen Verbindungen involviert sind, sondern auch für andere Thiolasen, die anderen Zwecken dienen, wie der β -Oxidation (**Abb. 18**). Dasselbe stimmt auch für die Hydrolasen, welche hohe Identitäten zeigen (**Abb. 23**). Im Gegensatz dazu zeigen die CoA-Transferasen ein unterschiedliches Bild (**Abb. 21**). Die Untereinheiten der Transferase aus B13 teilen nur niedrige Sequenzähnlichkeit mit den 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferasen von *A. calcoaceticus* und *P. putida* wie auch mit anderen CoA-Transferasen. Einige Bereiche sind mit der Glutaconat-CoA-Transferase des strikt anaeroben Bakteriums *A. fermentans* identisch. Eine hohe Sequenzidentität besteht zu zwei Proteinen aus *P. aeruginosa* (PA0226 und PA0227), so dass diese nun als die Untereinheiten der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase bezeichnet werden können. Im Allgemeinen befinden sich die Enzyme aus Stamm B13 in phylogenetischen Stammbäumen in direkter Nachbarschaft mit den entsprechenden Enzyme aus *P. aeruginosa* PAO1, mit einer Identität von 91% für Untereinheit B und 87% für Untereinheit A der Transferase, 85% für die Thiolase und 74% für die Hydrolase. Beide CoA-Transferase-Untereinheiten, wie auch die Thiolase aus

Mesorhizobium loti zeigen eine große Nähe zu den entsprechenden Enzymen im jeweiligen phylogenetischen Stammbaum, während die Sequenzähnlichkeit zwischen den Hydrolasen mit 42% weniger hoch ist.

PARALES und HARWOOD (1992) beschreiben einen Glycin-Cluster in der N-terminalen Aminosäuresequenz von PcaI von *P. putida* mit starker Ähnlichkeit zur Konsensussequenz (Prosite PS01273: [DN]-[GN]-x(2)-[LIVMFA](3)-G-G-F-x(3)-G-x-P), die von WIERENGA et al. (1986) beschrieben wurde. Andere CoA-Transferasen diverser Organismen zeigen dieselbe Sequenz: *Helicobacter pylori* (CORTHÉSY-THEULAZ et al., 1997), Schweineherz-Mitochondrien (LIN und BRIDGER, 1992), *A. calcoaceticus* (KOWALCHUK et al., 1994) und *Clostridium acetobutylicum* (CARY et al., 1990). Während Glycin-Cluster ein Teil der ADP-bindenden $\beta\alpha\beta$ -Faltungen sind (WIERENGA et al., 1986), wird die Region der Untereinheit A für die Funktion von bindendem CoA als wichtig erachtet. In der Transferase Untereinheit A aus Stamm B13 ist der entsprechende Glycin-Cluster bzw. sein Mononukleotid-bindendes Motiv nur teilweise vorhanden (D-G-x-x-V-A-L-E-G-F-x-x-x-x-P). Ein wichtiges Glycin ist durch einen Glutamat-Rest substituiert, wie auch ein zusätzliches Glycin fehlt, eine Situation, die mit jener im Protein PA0226 aus *P. aeruginosa* PAO1 identisch ist.

Ein zweites Sequenzmuster für CoA-Transferasen (Prosite PS01274: [LF]-[HQ]-S-E-N-G-[LIVF](2)-[GA]) wurde von PARALES und HARWOOD (1992) postuliert. Dieses korrespondiert mit einer Region im N-Terminus der Untereinheit B und beinhaltet ein konserviertes Glutamat, das nach den Studien von JENCKS (1973) in den katalytischen Mechanismus involviert ist. Die kurze Konsensussequenz S-E-N-G wurde durch ROCHET und BRIDGER (1994) bestätigt. Eine Ausnahme von diesem Thema war die Glutaconat-CoA-Transferase aus *A. fermentans*, welche nur geringe Sequenzidentitäten mit den anderen CoA-Transferasen aufwies. Der Konsensus S-E-N-G wurde dort nicht nachgewiesen (MACK et al., 1994). Stattdessen wurde der wichtige Glutamyl-Rest in dem kurzen Motiv E-S-G im N-terminalen Teil des Enzyms gefunden (BUCKEL et al., 1981; MACK und BUCKEL, 1995). Das Konsensusmotiv S-E-N-G war ebenso in CatJ aus *Pseudomonas* sp. B13 nicht vorhanden. Hingegen wurden einige mit der Glutaconat-CoA-Transferase aus *A. fermentans* identische Bereiche gefunden, vor allem das E-S-G-Motiv mit Glutamat an Position 51. Dieses Motiv findet sich ebenfalls im Protein PA0227 aus *P. aeruginosa* PAO1.

Kennzeichen der Proteine, die zur Familie der Thiolasen gehören, sind drei Sequenzmuster, von denen zwei auf den Regionen um die biologisch wichtigen Cysteine basieren (Prosite PS00098: [LIVM]-[NST]-x(2)-C-[SAGLI]-[ST]-[SAG]-[LIVMFYNS]-x-[STAG]-[LIVM]-x(6)-[LIVM]; PS00099: [AG]-[LIVMA]-[STAGCLIVM]-[STAG]-[LIVMA]-C-x-

[AG]-x-[AG]-x-[AG]-x-[SAG]). Der erste konservierte Cystein-Rest, lokalisiert im N-terminalen Bereich der Enzyme, ist involviert in die Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediats. Der zweite, lokalisiert im C-terminalen Bereich, ist im aktiven Zentrum an der Kondensationsreaktion beteiligt. Das dritte Motiv (Prosite PS00737: N-x(2)-G-G-x-[LIVM]-[SA]-x-G-H-P-x-[GA]-x-[ST]-G) basiert auf einer hochkonservierten Region im C-terminalen Teil des Proteins.

Ein Sequenzvergleich zeigt, dass die drei konservierten Motive in CatF von Stamm B13 vorhanden sind. Der Vergleich lässt vermuten, dass Cys-91 des B13-Enzyms der Cystein-Rest des aktiven Zentrums ist und dass die Konsensussequenz des aktiven Zentrums L-N-x-x-C-A-S-G-M-x-A-V-x-x-x-x-x-I ist und zum PS00098-Motiv gehört. Der Konsensus von PcaF aus *P. aeruginosa* PAO1 zeigt ein Isoleucin statt eines Valins. Cys-387, das zweite wichtige Cystein im aktiven Zentrum von CatF in Stamm B13, ist Teil des Motivs G-L-C-T-M-C-x-G-x-G-x-G-x-A, was mit der obigen Konsensussequenz PS00099 übereinstimmt.

Im Konsensus aus Stamm PAO1 ist das erste Cystein durch ein Alanin ersetzt. Das Thiolase-Muster (PS00737) wurde an Position 347 in CatF von Stamm B13 gefunden: N-x-x-G-G-x-I-A-x-G-H-P-x-G-x-S-G.

Die Suche nach Konsensussequenzen von CatD mit anderen Enzymen ergab kein klar konserviertes Motiv.

Eine wahrscheinliche AMP-bindende Domäne (Prosite PS00455: [LIVMFY]-x(2)-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-x-[PASLIVM]-[KR]) wurde in der abgeleiteten Proteinsequenz von ORF6 bei den Aminosäuren 11 bis 22 gefunden: I-x-x-S-S-G-T-T-G-x-P-K. Deshalb könnte dieses Gen das ATP/CoA-abhängige 3-Oxoadipat-aktivierende Enzym in Stamm B13 kodieren.

Die in *Pseudomonas* sp. B13 vorhandenen und oben beschriebenen Konsensussequenzen sind in **Tab. 7** zusammengefasst.

Im Allgemeinen zeigen die hier präsentierten Daten, dass die Gene, die Enzyme kodieren, die in den unteren 3-Oxoadipat-Weg von B13 involviert sind, eine hohe Ähnlichkeit in den Proteinsequenzen zu den Gegenstücken von *P. aeruginosa* PAO1 aufweisen. Im Gegensatz dazu, konnten gravierende Unterschiede zwischen den Untereinheiten der CoA-Transferase von Stamm B13 auf der einen Seite und denen von anderen Aromaten-abbauenden Bakterien, wie *A. calcoaceticus* und *P. putida* auf der anderen Seite, gefunden werden. In Bezug auf die Organisation des *catIJFD*-Gen-Clusters ist die Anordnung in *A. calcoaceticus* und *Pseudomonas* sp. B13 identisch.

Tab. 7: In dieser Arbeit in *Pseudomonas* sp. B13 nachgewiesene Prosite-Konsensussequenzen.

Prosit-Konsensussequenz(en)	entsprechende Sequenz in Stamm B13
<u>für Transferasen:</u>	
<u>PS01273:</u> [DN]-[GN]-x(2)-[LIVMFA](3)-G-G-F-x(3)-G-x-P	<u>Transferase Untereinheit A:</u> D-G-x(2)-V-A-L-E-G-F-x(4)-P
<u>für Thiolasen:</u>	
<u>PS00098:</u> [LIVM]-[NST]-x(2)-C-[SAGLI]-[ST]-[SAG]-[LIVMFYNS]- x-[STAG]-[LIVM]-x(6)-[LIVM]	<u>Thiolase:</u> L-N-x-x-C-A-S-G-M-x-A-V-x(6)-I
<u>PS00099:</u> [AG]-[LIVMA]-[STAGCLIVM]-[STAG]-[LIVMA]-C-x- [AG]-x-[AG]-x-[AG]-x-[SAG]	G-L-C-T-M-C-x-G-x-G-x-G-x-A
<u>PS00737:</u> N-x(2)-G-G-x-[LIVM]-[SA]-x-G-H-P-x-[GA]-x-[ST]-G	N-x(2)-G-G-x-I-A-x-G-H-P-x-G-x-S-G
<u>für AMP-bindende Domänenstrukturen:</u>	
<u>PS00455:</u> [LIVMFY]-x(2)-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-x- [PASLIVM]-[KR]	<u>ORF6:</u> I-x-x-S-S-G-T-T-G-x-P-K

Die Bestimmung des Gesamt-G+C-Gehaltes von Stamm B13 ergab einen Wert von 67.3% (BUSSE et al., 1989). Die Gene *clcBDE*, die die Chlormuconat-Cycloisomerase, Dienlacton-Hydrolase und Maleylacetat-Reduktase des modifizierten *ortho*-Weges kodieren (**Abb. 4**), besitzen einen G+C-Gehalt im Bereich von 60%, welcher nicht mit dem Gesamt-G+C-Gehalt von *Pseudomonas* sp. B13 übereinstimmt: für *clcD* und *clcE* wurden Werte von 59.8% bzw. 60.7% ermittelt (KASBERG et al., 1997). Die *clcB*-Gene der Stämme B13 und pAC27 besitzen identische Werte von 61.3% (GHOSAL und YOU, 1989; VOLLMER et al., 1999). Im Gegensatz dazu reicht der G+C-Gehalt der Region, die in dieser Arbeit kloniert wurde, von 70.5% für *catF*, 67.3% für *catJ*, 67.1% für *catD*, 66.9% für *catI* bis 65.2% für ORF1. Diese Werte differieren signifikant zu jenen des Operons, das die Enzyme des modifizierten *ortho*-Weges kodiert.

Dies zeigt, dass die Gene, die das Operon des modifizierten *ortho*-Weges kodieren, wahrscheinlich von einem anderen Organismus stammen. Außerdem ist dieses Operon auf einem Element lokalisiert ist, dass über Konjugation transferierbar ist (RAVATN et al., 1998).

Der Kodongebrauch für *catI*, *catJ*, *catF* und *catD* ist typisch für *Pseudomonas* spp. (CRAWFORD und EBERLY, 1989; WEST und IGLEWSKI, 1988). Mit wenigen Ausnahmen, wird G oder C an der dritten Stelle für Aminosäuren mit multiplen Kodons bevorzugt. Das bevorzugte Stoppkodon in *P. aeruginosa*, TGA (WEST und IGLEWSKI, 1988), wurde von ORF6, *catJ*, *catF* und *catD* verwendet, während TAA bei *catI* und ORF1 als solches fungierte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind ein weiteres Beispiel für das Patchwork-Assembly von Abbauwegen in der Natur (REINEKE, 1998; COPLEY, 2000).

4.2 Chlorbenzol-verwertende Neuisolate und ihre Gene des *meta*-Weges

4.2.1 Isolierung von Stämmen mit Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase

Da zu Beginn der Arbeit *P. putida* GJ31 als einziger Stamm vorlag, der Chlorbenzol über den *meta*-Weg abbaut, wurde versucht, neue Stämme mit ähnlichen Fähigkeiten zu isolieren.

Die drei neuen Stämme SK1, 16-6A und MG61, die Chlorbenzol über den *meta*-Weg abbauen, sowie die Anreicherungskultur, erhalten aus der BASF-Belebtschlammprobe, wurden auf unterschiedliche Art und Weise isoliert.

Während die Stämme SK1 und 16-6A noch über Ausplattieren und Bebrütung mit Substrat über die Dampfphase erhalten wurden, war die eingeschlagene Strategie zur Isolierung von MG61 und zur Anreicherung der BASF-Probe anders. Diese Strategie umgeht, anders als die „klassische“ Art, die Gefahr, die Bakterienzellen durch Überdosierung abzutöten, denn es können nur kleine Mengen in den Anzuchtraum diffundieren und werden dort schnell verbraucht, worauf anschließend weiteres Substrat durch die Kunststoffwand nach innen diffundieren kann. Die Versuchsanordnung mit Wheaton-Flaschen gewährleistet zudem eine gute Dichtigkeit der Anzuchtgefäße. In Kombination mit der Kontrolle der Kultur über PCR mit den neu entwickelten spezifischen Primern CC23O-1 und CC23O-2 und ganzen Zellen, ist ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zur Anzucht und Isolierung von *meta*-Abbauern gefunden worden.

Die Durchführung von PCRs mit den spezifischen Primern hat gegenüber dem Übersprühen mit 4-Chlorcatechol den Vorteil, dass die Bakterien detektiert werden, die eine Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase zum Abbau von Chlorbenzol besitzen. Die Methode des Übersprühens mit 4-Chlorcatechol kann nur einen *meta*-Weg anzeigen, sagt aber nichts über den Typ der *meta*-Spaltung aus. **Abb. 39** zeigt die weitere Strategie bei der Klonierung von Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen. Wurde ein neuer Stamm mit Hilfe der spezifischen Primer

CC230-1/CC230-2 gefunden, so ist es mit Hilfe der Primer C230-3/C230-4 möglich, das ganze *cbzE*-Gen zu amplifizieren und anschließend zu klonieren.

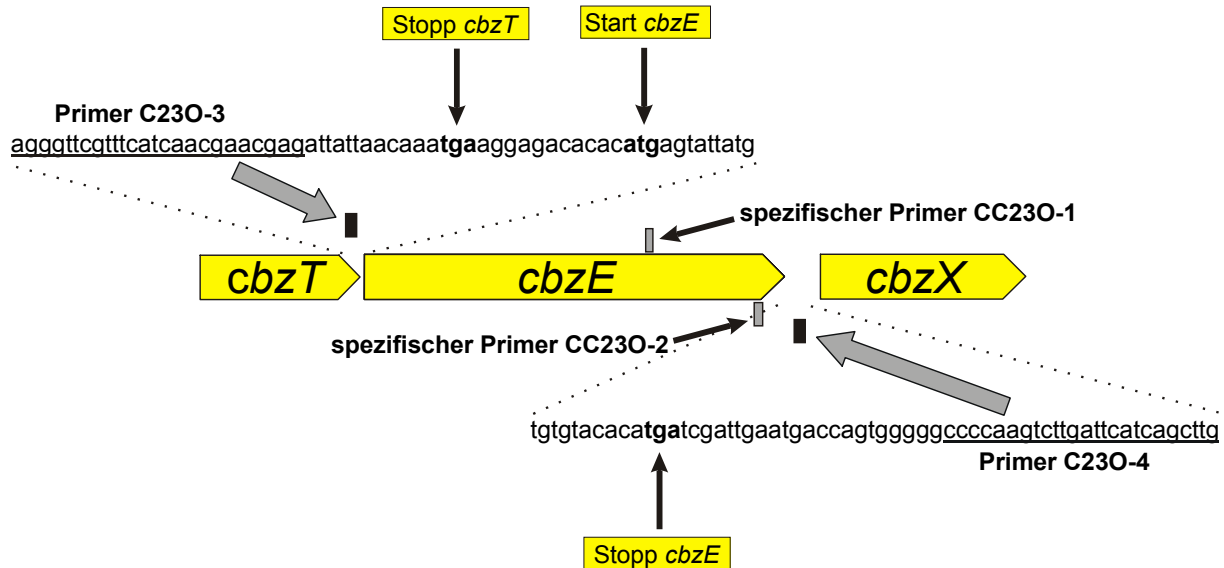


Abb. 39: Positionen der Primerpaare CC230-1/CC230-2 und C230-3/C230-4.

Die Tatsache, dass in dieser Arbeit nur Pseudomonaden isoliert wurden, deckt sich mit der Kenntnis, dass die in Kläranlagen und Oberflächengewässern lebenden autochthonen, Gram-negativen Pseudomonaden das breiteste Abbaupotenzial für Umweltgifte zeigen (NAUMANN, 1993).

4.2.2 Vergleich der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Isolierung neuer Stämme beschrieben, die Chlorbenzol über den *meta*-Weg abbauen. Aus diesen Stämmen und aus der BASF-Mischkultur, aus der keine Reinkultur isoliert werden konnte, wurden die Gene für die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen kloniert und sequenziert. Die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase-Gene aus *P. putida* GJ31, *P. fluorescens* SK1, *P. veronii* 16-6A, *Pseudomonas* sp. MG61 und der Anreicherungskultur der BASF-Probe zeigten eine hohe Zahl identischer Nukleotide (Abb. 40) von 99% und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen (Abb. 41) eine Übereinstimmung von über 97%. Die *cbzE*-Gene der Stämme 16-6A und MG61 sind sogar identisch.

Es ist wichtig anzumerken, dass die Aminosäuren, in denen sich die Sequenzen der neuen Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen von der CbzE-Sequenz aus Stamm GJ31 unterscheiden, identisch sind mit den entsprechenden Aminosäuren aus der TdnC-Sequenz aus *P. putida* UCC2.

In allen untersuchten CbzE-Enzymen sind die drei Aminosäuren (zwei Histidin- und ein Glutamatrest) gleich, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle in der Bindung von Eisen(II)-Ionen spielen (ELTIS und BOLIN, 1996). In den Proteinsequenzen der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen finden sich diese an Position 150 (Histidin), 220 (Histidin) und 271 (Glutamat). Ebenfalls unangetastet bleiben jene Aminosäuren, die am Konsensusmuster beteiligt sind, das damit im übrigen weitere Bestätigungen findet. Das Prosite Konsensusmuster PS00082 [GNTIV]-x-H-x(5,7)-[LIVMF]-Y-x(2)-[DENTA]-P-x-[GP]-x(2,3)-E für Ring-öffnende Dioxygenasen wurde ab Position 250 in der jeweiligen Aminosäuresequenz aller neuen Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen gefunden.

Abb. 42 mit Sekundärstrukturvorhersagen, erstellt mit dem Programm SSpro8, zeigt die Auswirkungen der Veränderungen in der Aminosäuresequenz auf die Sekundärstruktur der jeweiligen Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase. Demnach sind die CbzE-Strukturen aus den Stämmen SK1, 16-6A und MG61 sowie des BASF-PCR-Produktes identisch. Die CbzE-Struktur aus Stamm GJ31 enthält 14 Abweichungen. Diese Abweichungen sollten sich auf die Turnover-Kapazitäten der CbzE-Proteine auswirken.

Die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase aus Stamm GJ31 besitzt eine homotetramere Struktur. Die Molekulargewichte der Untereinheiten wurden zu 33.4 kDa über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Das native relative Molekulargewicht wurde unter nichtdenaturierenden Bedingungen über Gelfiltration mit einem Wert von 135 ± 10 kDa ermittelt (KASCHABEK et al., 1998). Aufgrund der hohen Übereinstimmungen in der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der anderen Stämme und des BASF-PCR-Produktes, sind identische homotetramere Strukturen zu erwarten. Die mit Prophet 6.0 berechnete Molekulargewichte der Untereinheiten der einzelnen Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen sind fast identisch: 34953 Da für GJ31, 34941 Da für das BASF-PCR-Produkt, 34912 Da für SK1 und 34956 Da für 16-6A und MG61.

GJ31	ATGAGTATTATGAGAGTTGGCCACGTCAGCATCAACGTGATGGACATGGCCGCAGCAGTG	
BASF	-----	
SK1	-----	60
16-6A/MG61	-----	
GJ31	AAGCACTACGAAAACGTGCTGGGCCTAAAGACGACCATGCAGGACAATGCCGGGAACGTG	
BASF	-----	
SK1	-----	120
16-6A/MG61	-----	
GJ31	TACCTGAAATGTTGGGACGAGTGGGATAAATATTCCTTATCCTCACCCCATCGGACAGG	
BASF	-----	
SK1	-----	180
16-6A/MG61	-----	
GJ31	GCTGGAATGAACCACGTCGCCTACAAGGTTACCAAAGACAGTGATCTGGACGCCTTCCAA	
BASF	-----	
SK1	-----	240
16-6A/MG61	-----	
GJ31	GCTAGGATTGAAGCCGCTGGCACCAGACCACCATGATGCCCGATGGCAGCTGCCATCC	
BASF	-----	
SK1	-----	300
16-6A/MG61	-----	
GJ31	ACGGGGCGCATGCTGGTGTAAATTGCCAAGCACGCACGAAATGCGTCTTTACGCCATG	
BASF	-----	
SK1	-----	360
16-6A/MG61	-----	
GJ31	AAAGAAAACGTCGGCACCGAGGTGGGTAGCATCAATCCCGATCCGTGGCCAGACAGCATC	
BASF	-----	
SK1	-----	420
16-6A/MG61	-----	
GJ31	AAGGGTGCCGGGGCGCACTGGTTGGATCACGTACTACTGACGTGTGAGTTCGATCCGGGC	
BASF	-----	
SK1	-----	480
16-6A/MG61	-----	
GJ31	ACTGGTGTCAATAGGGTGGCCGACAACACACGGTCTTCATTGATGTGCTGGATTTTTTC	
BASF	-----	
SK1	-----	540
16-6A/MG61	-----	
GJ31	CAGACCGAGCAATTGACCGTCGGCCCGATGGCTCATTCCAGTCGGTATCGTTCCTGTCTG	
BASF	-----	
SK1	-----	600
16-6A/MG61	-----	
GJ31	TGCTCGAGCAAGCCGCATGACATTGCGTTTGTGATGCGCCGACTCCCGCCTGCACCAT	
BASF	-----	
SK1	-----	660
16-6A/MG61	-----	
GJ31	ATTCGTAATTCCTGGACTCGTGGCAGCATTTCTCAAGCGGGCGATGTTCATGGCCAAG	
BASF	-----	
SK1	-----	720
16-6A/MG61	-----	
GJ31	AACAAGGTACGTATTGATGCGTCACCTACAGCCATGGCTTACGCGCGGCAGACGATC	
BASF	-----	
SK1	-----	780
16-6A/MG61	-----	
GJ31	TATTTCTTCGACCCTAGCGGCAACCGCAATGAGACCTTTGCAGGACTGGGGTACCAGGGC	
BASF	-----	
SK1	-----	840
16-6A/MG61	-----	
GJ31	CAGCGGGACCGCCGGTGACGACTTGACCAGGATCAAGCGGTGCGCAGTTTTCTTC	
BASF	-----	
SK1	-----	900
16-6A/MG61	-----	
GJ31	CACACCGCGGAGATGGTGTGTCGTCGTTCAAGATGTGTACACATGA	
BASF	-----	
SK1	-----	
16-6A/MG61	-----	

Abb. 40: Vergleich der Nukleotidsequenzen der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenasen aus: *P. putida* GJ31, BASF-Anreicherungskultur, *P. fluorescens* SK1, *P. veronii* 16-6A und *Pseudomonas* sp. MG61. Positionen mit Unterschieden sind unterlegt. Mit der Sequenz aus Stamm GJ31 identische Nukleotide sind mit einem Bindestrich (-) gekennzeichnet.

GJ31	MSIMRVGHVSINVMDMAAAVKHYENVLGLKTTMQDNAGNVYLKCWDEWDKYSLILTPSDR	
BASF	-----	
SK1	-----	
16-6A/MG61	-----	60
JS75	-GV--I--A-LK---D--R-----M---K-K-----V-----Q	
UCC2	-GVL-I--A-LR---I-----E-----V-K-S-----I-----	
GJ31	AGMNHVAYKVTKDSDDLDAFQARIEAAGTKTTMMPDGTLPSTGRMLVFKLPSTHEMRLYAM	
BASF	-----E-----	
SK1	-----E-----	
16-6A/MG61	-----E-----	120
JS765	-----L---E-EA--E-L-QK--W-V---LDE-----Q---G-----S	
UCC2	--L-----E--E--E-L-----W-I--LL-E-----Q-N--G-----	
GJ31	KENVGTEVGSINPDPWPDSIKGAGAHWLDHVLLTCEFDPGTGVNRVADNTRFFIDVLDFFF	
BASF	-----M-----	
SK1	-----M-----	
16-6A/MG61	-----M-----	180
JS765	--F--D--N-----GL-----C-V--MN-EA-I-T-----MTEA---	
UCC2	--Y--D--TV-----GVR-----L-M--MN-EA-I-T-Q-----MKEC---	
GJ31	QTEQLTVGPDGGSFQSVSFLSCSSKPHDIAFADAPTPLHHISYFLDSWHDILKAGDVMAK	
BASF	-----A-----VG-----Y-----	
SK1	-----A-----VG-----F-----	
16-6A/MG61	-----A-----VG-----Y-----	240
JS765	L---VL---E-NM-ATT-MARTT-----VGG-S-----AF-----V---A---G-	
UCC2	L---VL---Q-DM-AATWMART-T-----VGG-VS-----AF-----V---SA-----	
	<u>PS00082</u>	
GJ31	NKVRIDASPTRHGFTTRGQTIYFFDPSGNRNETFAGLGYQAQRDRPVTTWTEDQAGRAVFF	
BASF	-----A-----Q-----I-----	
SK1	-----A-----E-----V-----	
16-6A/MG61	-----V-----E-----V-----	300
JS765	-----VA---L---E-----L-----L-S-I-Y	
UCC2	K--K--VA---I---E-----L--P-----S--KM--GI-Y	
GJ31	HTGEMVSSFI DVYT	
BASF	-----T-----	
SK1	-----T-----	
16-6A/MG61	-----T-----	
JS765	---YL-P--T-----	
UCC2	---DL-P--T-----	

Abb. 41: Vergleich der Aminosäuren der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenasen aus: *P. putida* GJ31, BASF-Anreicherungskultur, *P. fluorescens* SK1, *P. veronii* 16-6A und *Pseudomonas* sp. MG61, sowie der Catechol-2,3-Dioxygenase aus *Comamonas* sp. JS765 und der 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase aus *P. putida* UCC2. Die Position der Prosite Konsensussequenz ist markiert. Mit der Sequenz aus Stamm GJ31 identische Aminosäuren sind mit einem Bindestrich (-) gekennzeichnet.

GJ31-AS	MSIMRVGHVSINVMDMAAAVKHYENVLGLKTTMQDNAGNVYLKCWDEWDKYSLILTPSDR	60
GJ31	CCCEEEEEEEEEESCHHHHHHHHHHHHTCEEECTTTTSEEEEEECSTCCTCEEEEECCCC	
BASF	CCCEEEEEEEEEESCHHHHHHHHHHHHTCEECCCTTSEEEEEECSTCCTEEEEEECCCC	
SK1	CCCEEEEEEEEEESCHHHHHHHHHHHHTCEECCCTTSEEEEEECSTCCTEEEEEECCCC	
16-6A/MG61	CCCEEEEEEEEEESCHHHHHHHHHHHHTCEECCCTTSEEEEEECSTCCTEEEEEECCCC	
JS765	CCCEEEEEEEEEESCHHHHHHHHHHHHTCEECCCTTSEEEEEECSTCCEEEEEEECCCC	
UCC2	CCCEEEEEEEEEESCHHHHHHHHHHHHTCEECCCTTSEEEEEECSTCCTEEEEEECCCC	
GJ31-AS	AGMNHVAYKVTKDSDLDAFQARIEAAGTKTTMMPDGTLPSTGRMLVFKLPSTHEMRLYAM	120
GJ31	TTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHTTCCCEEECCTHHCTTCEEEEEEECTTSCEEEEEEC	
BASF	TTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHTTCCCEEECCCTCCCTTCEEEEEEECTTSCEEEEEEC	
SK1	TTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHTTCCCEEECCCTCCCTTCEEEEEEECTTSCEEEEEEC	
16-6A/MG61	TTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHTTCCCEEECCCTCCCTTCEEEEEEECTTSCEEEEEEC	
JS765	TTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHTTCCCEEECCCTGCCTTCEEEEEEECTTSCEEEEEEC	
UCC2	TTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHTTCCCEEECCCTGCCTTCEEEEEEECTTSCEEEEEEC	
GJ31-AS	KENVGTEVGSINPDPWPSIKGAGAHWLDHVLLTCEFDPGTGVNRVADNTRFFIDVLDFF	180
GJ31	CGGCTCCCCCCCCCCCCCCCCCTTCCSEEEEEECTCTTCCCCCHHHHHHHHHHHHTCC	
BASF	CTCCTCCCCCCCCCCCCCCCCCTTCCSEEEEEESSCTTCCCCCHHHHHHHHHHHHTCE	
SK1	CTCCTCCCCCCCCCCCCCCCCCTTCCSEEEEEESSCTTCCCCCHHHHHHHHHHHHTCE	
16-6A/MG61	CTCCTCCCCCCCCCCCCCCCCCTTCCSEEEEEESSCTTCCCCCHHHHHHHHHHHHTCE	
JS765	CEECTCCCCCCCCCCCCCCCCCTTCCSEEEEECSCTTCCCCCHHHHHHHHHHHHTCE	
UCC2	CCCCCCCCCCCCCCCCCTTCCCTTCCSEEEEECSCTTCCCCCHHHHHHHHHHHHTCE	
GJ31-AS	QTEQLTVGPDGSFQSVSFLSCSSKPHDIAFADAPTGLHHISYFLDSWHDILKAGDVMAK	240
GJ31	EEEEEEECTTTTCEEEEEEEECTSCCEEEEECCCTTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHH	
BASF	EEEEEEECTTTTCEEEEEEEECTSCCEEEEECCCTTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHH	
SK1	EEEEEEECTTTTCEEEEEEEECTSCCEEEEECCCTTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHH	
16-6A/MG61	EEEEEEECTTTTCEEEEEEEECTSCCEEEEECCCTTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHH	
JS765	EEEEEEECTTTTCEEEEEEEECTSCCEEEEECCCTTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHH	
UCC2	EEEEEEECTTTTCEEEEEEEECTSCCEEEEECCCTTCEEEEEEECCCHHHHHHHHHHHHH	
GJ31-AS	NKVRIDASPTRHGFTRGQTIYFFDPSGNRNETFAGLGYQAQRDRPVTWTWEDQAGRAVFF	300
GJ31	TTCCBEEECCCCCSEEEEEEEECTTSCEEEEETTCBEECTTSCEEEEEHCTTCEEEEE	
BASF	TTCCBEEECCCCCSEEEEEEEECTTSCEEEEETTCBEECTTSCEEEEEHCTTCEEEEE	
SK1	TTCCBEEECCCCCSEEEEEEEECTTSCEEEEETTCBEECTTSCEEEEEHCTTCEEEEE	
16-6A/MG61	TTCCBEEECCCCCSEEEEEEEECTTSCEEEEETTCBEECTTSCEEEEEHCTTCEEEEE	
JS765	TTCCBEEECCCCCSEEEEEEEECTTSCEEEEETTCBEECTTSCEEEEEGTTTCEEEEE	
UCC2	TTCCBEEECCCCCSTEEEEEEECTTSCEEEEETTCBEECTTSCEEEECHHHHTTEEEEE	
GJ31-AS	HTGEMVSSFIIDVYT	
GJ31	ETTCCCHGHEEECC	
BASF	ETTCCCHGHEEECC	
SK1	ETTCCCHGHEEECC	
16-6A/MG61	ETTCCCHGHEEECC	
JS765	ETTCCCHGHEEECC	
UCC2	ETTCCCHGHEEECC	

Abb. 42: Vergleich der SSPro8-Sekundärstrukturvorhersagen der *cbzE*-Gene. In den obersten Zeilen über den durchgezogenen Linien ist zum Vergleich die Aminosäuresequenz aus Stamm GJ31 angegeben. Unterhalb der gestrichelten Linie sind die Sekundärstrukturvorhersagen für die Catechol-2,3-Dioxygenase aus *Comamonas* sp. JS765 und die 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase aus *P. putida* UCC2 gezeigt. Die Stellen an denen Unterschiede zu den anderen Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen auftreten sind fett markiert. Oberhalb der gestrichelten Linie finden sich die *cbzE*-Gene. Abkürzungen: H: α -Helix, G: 310-Helix, E: gestreckter Strang, B: β -Brücke, T: Wende, S: Biegung, C: Rest.

Trotz der mit SSPro8 berechneten ähnlichen Strukturen der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen, wirken sich die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen und den daraus resultierenden Aminosäuresequenzen aus. Die Auswirkungen der Änderungen in den Aminosäuresequenzen können unter anderem durch die Bestimmung der Turnover-Kapazitäten nachgewiesen werden. Einige Beispiele haben gezeigt, dass einzelne Punktmutationen die Substratspezifität eines Enzyms oder Effektors erhöhen können (VAN DER MEER et al., 1992). **Abb. 43** macht den großen Unterschied in den Turnover-Kapazitäten der exprimierten Chlorcatechol-2,3-Dioxygenasen aus den Stämmen GJ31, SK1 und 16-6A sowie dem BASF-PCR-Produkt deutlich. Zum Vergleich ist die exprimierte 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase aus *P. putida* UCC2 (Plasmid pTDN1-1018 in *E. coli*) gezeigt (KRANZ, pers. Mitteilung). CbzE aus Stamm GJ31 zeigt einen deutlich höheren Wert für den Umsatz von 3-Chlorcatechol als die anderen gemessenen Dioxygenasen: Faktor 3 gegenüber CbzE aus dem BASF-PCR-Produkt, Faktor 13 gegenüber CbzE aus Stamm SK1, Faktor 29 gegenüber CbzE aus Stamm 16-6A und Faktor 111 gegenüber TdnC aus Stamm UCC2.

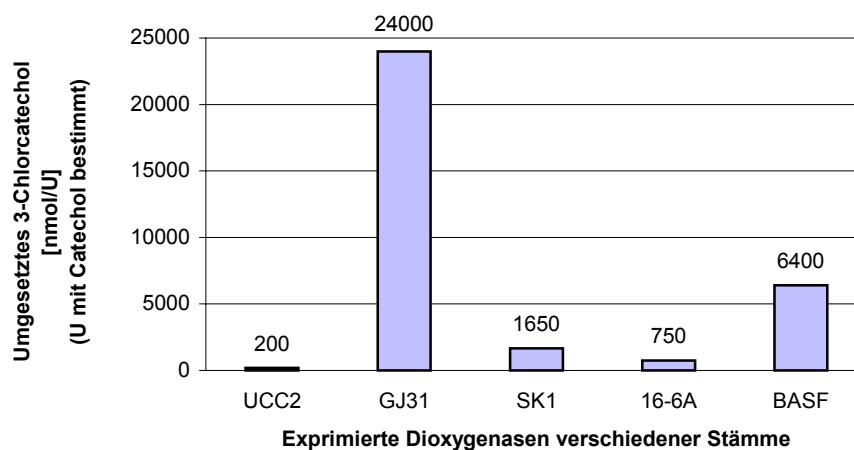


Abb. 43: Turnover-Kapazitäten verschiedener exprimierter Extradiol-Dioxygenasen aus unterschiedlichen Stämmen (KRANZ, pers. Mitteilung).

Weitere Untersuchungen haben nachgewiesen, dass *cbzE*, anders als bei Stamm GJ31, wo es auf einem Plasmid lokalisiert ist (MARS et al., 1999), bei Stamm 16-6A in die chromosomale DNA integriert ist (KRANZ, 2001). Die unterschiedlichen Orte auf denen die *cbzE*-Gene zu finden sind, lassen sich durch die Tatsache erklären, dass diese Gene auf einem Transposon liegen (MARS et al., 1999). Transposons sind DNA-Segmente, die in der Lage sind, sich frei von jeder genetischen Homologie von einem genetischen Ort (Donor) zu einem

anderen (Rezipient) zu bewegen. Viele katabolische Gene sind mit Insertionssequenzen assoziiert, was Anlass zu der Vermutung gibt, dass solche Gencluster schnell unter der Bakterienpopulation verbreitet werden können. Dieser Vorgang erhöht die Substratbandbreite von Mikroorganismen in der Umwelt drastisch (TAN, 1999). Genau dies scheint für alle Stämme mit Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase zuzutreffen. Die hohe Zahl identischer Nukleotide und nur die Präsenz einiger Punktmutationen geben dieser Annahme einen realistischen Hintergrund, zumal bei den Stämmen SK1 und 16-6A auch die Umgebung von *cbzE* mit der von GJ31 fast identisch ist. Über den gesamten Bereich von 3056 bp finden sich nur wenige Punktmutationen. **Abb. 45** im Anhang macht dies deutlich. Horizontaler Gentransfer macht vor allem die Präsenz der identischen *cbzE*-Gene in *P. veronii* 16-6A und *Pseudomonas* sp. MG61 nachvollziehbar.

4.2.3 Evolutionäre Aspekte

Es gibt zunehmend Beweise dafür, dass horizontaler Gentransfer eine wesentliche Rolle in der Evolution von Bakteriengenomen und in der Diversifikation und Spezialisierung von Bakterien spielt (OCHMAN et al., 2000). So sind 17.6% der Gene (755 von 4288 offenen Leserahmen) aus *E. coli* durch horizontalen Gentransfer in 234 Ereignissen mit einer Rate von 16 kb pro Millionen Jahren erworben worden (LAWRENCE und OCHMAN, 1998). Die Vererbung genetischer Informationen in Bakterien geschieht in erster Linie über vertikalen Transfer, d. h. Transfer von einer Elternzelle zu einer Tochterzelle durch Zellteilung. Reproduktions-unabhängiger Transfer zwischen Organismen ist aber auch möglich. Dieser Vorgang wird als horizontaler Transfer bezeichnet (LAWRENCE und ROTH, 1996). Drei Mechanismen des horizontalen Gentransfers sind bisher identifiziert worden. Die Transformation beinhaltet die Aufnahme und Eingliederung nackter DNA, die Konjugation ist ein Zellkontakt-abhängiger DNA-Transfermechanismus und bei der Transduktion, wird die DNA durch Bakteriophagen in den Rezipienten injiziert (OCHMAN et al., 2000). Die Präsenz von Genen, die in den Abbau von chlorierten aromatischen Xenobiotika in einigen Pseudomonaden involviert sind, kann entweder vorteilhaft oder nachteilig sein, abhängig davon ob das spezielle Xenobiotikum in der Umwelt vorhanden ist und ob das spezielle Bakterium die nötigen Gene für den kompletten Abbau von toxischen Intermediaten besitzt. Am Ende geben die eingeführten Gene nur dann einen selektiven Vorteil, wenn sie auch exprimiert werden. (DAVISON, 1999). Dies zeigt sich insbesondere an den Stämmen SK1 und 16-6A. Beide besitzen Gene, die für den weiteren Abbau von Intermediaten kodieren, die im *meta*-Weg ent-

stehen: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase und Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend). Für die Verwertung von 3-Chlorcatechol besitzen sie aber auch das auf dem Transposon lokalisierte *cbzE*-Gen. Es ist zu vermuten, dass die Stämme mit Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase diese über horizontalen Gentransfer erworben haben, da dieser einen ungewöhnlich hohen Ähnlichkeitsgrad zwischen Donor und Rezipienten bewirkt (OCHMAN et al., 2000). Dies trifft auf die Stämme mit *cbzE* zu.

4.2.4 Die *cbzJ*-, *cbzQ*- und *cbzK*-Gene der Stämme SK1 und 16-6A

Die Untersuchungen zu den Genen des unteren *meta*-Weges ergaben die Organisation der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase, 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase und Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) in den Stämmen SK1 und 16-6A als *cbzJQK*-Cluster. Eine identische Genorganisation findet sich auch in einer Vielzahl anderer Organismen: *Pseudomonas* sp. CF600 (*dmpEFG*; SHINGLER et al., 1992; POWLOWSKI und SHINGLER, 1994), *P. putida* NCIB9816 (*nahLOM*; PLATT et al., 1995), *P. stutzeri* AN10 (*nahLOM*; BOSCH et al., 1999), *P. putida* O₂C₂ (*xylJQK*; AEMPRAPA und WILLIAMS, 1998), *Pseudomonas* sp. LB400 (*bphHJI*; HOFER et al., 1994), *P. pseudoalcaligenes* KF707 (*bphHJI*; KIMURA et al., 1997), *P. fluorescens* IP01 (*cumEGF*; HABE et al., 1996), *P. putida* DOT-T1 (*todGIH*; MOSQUEDA et al., 1998), *P. putida* F1 (*todGIH*, Lau et al., 1994), *Pseudomonas* sp. DJ77 (*phnHIJ*; HWANG et al., 1999), *Comamonas testosteroni* TA441 (*aphEFG*; ARAI et al., 2000), *Pseudomonas* sp. KKS (*bphEGF*, KIKUCHI et al., 1994), *P. putida* PB4071 (*tobGIH*, LI und TAN, 1999). Hingegen findet sich diese Anordnung nicht auf dem Plasmid pKW1 von *P. putida* GJ31 (KUNZE, 2002).

Diese Genorganisation scheint für einen weiteren Abbau durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) (*dmpF*) und 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase (*dmpG*) unabdingbar zu sein, da Untersuchungen von SHINGLER et al. (1992) mit *Pseudomonas* sp. CF600 zeigten, dass eine Beziehung zwischen der Acetaldehyd-Dehydrogenase (acylierend) und der Präsenz von 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase-Aktivität besteht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die alleinige Expression von *dmpG* keine Aldolase-Aktivität ergab. Demgegenüber zeigten Stämme, die *dmpF* und *dmpG* koexprimierten, eine Aldolase-Aktivität. Daraus wurde abgeleitet, dass eine Abhängigkeit der Aldolase-Aktivität mit der Koexpression der Dehydrogenase und Aldolase besteht. Stämme aus denen *dmpF* aus dem vollständigen Abbauweg herausgeschnitten wurde, zeigten weder Aldolase- noch Dehydrogenase-Aktivität, wohingegen alle anderen Enzyme des unteren Abbauweges im wesentlichen dieselben Enzymniveaus zeigten.

4.3 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse im Zusammenhang mit den Genen des unteren *ortho*-Weges aus *Pseudomonas* sp. Stamm B13 haben die Existenz des Genclusters *catIJFD* nachgewiesen. Offen bleibt, welche der gezeigten möglichen Promotoren und Terminatoren tatsächlich wirksam werden. Ebenso ist die Lokalisation des Clusters auf dem Genom in Bezug auf seinen Abstand zu den anderen Genen des *ortho*-Weges von Interesse.

Die Arbeiten zum *meta*-Weg haben einige neue Fragen aufgeworfen. Zunächst stellt sich die Frage, welche Aminosäuren für die Aktivität der Dioxygenasen als Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase verantwortlich sind. Die Fragestellung ist bereits Inhalt weiterer Untersuchungen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Transposons der neuen Stämme, auf denen die *cbzE*-Gene lokalisiert sind, identisch sind mit denen aus *Pseudomonas putida* GJ31. Damit wäre ein weiterer Hinweis auf den gemeinsamen Ursprung der Abbaufähigkeiten dieser Stämme gegeben. Mit Hilfe der in dieser Arbeit ermittelten *cbzE*-spezifischen Primer sind Erkenntnisse zu der Verbreitung dieser *cbzE*-Gene möglich. Ebenso können sie in Verbindung mit der neuen Anreicherungs-methode über Diffusion dazu dienen, neue Stämme zu isolieren, die neue Eigenschaften aufweisen. Im Falle der Gene des unteren *meta*-Weges sollte gezeigt werden, in welcher Entfernung sie zu den anderen Genen des *meta*-Weges lokalisiert sind. Weiterhin sind die Promotoren und Terminatoren zu sequenzieren und es ist zu zeigen, wann sie wirksam werden. Die neuen Stämme müssen zudem hinreichend charakterisiert werden.

5 Literatur

- Aemprapa, S. und P. A. Williams. **1998**. Implications of the *xylQ* gene of TOL plasmid pWW102 for the evolution of aromatic catabolic pathways. *Microbiology* **144**:1387-1396.
- Alexander, M. **1981**. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* **211**:132-138.
- Alfreider, A. **2002a**. Direct Submission (21-AUG-2002).
- Alfreider, A. **2002b**. Direct Submission (27-AUG-2002).
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman. **1997**. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Arai, H., S. Akahira, T. Ohishi, M. Maeda und T. Kudo. **1998**. Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenoldegradation. *Microbiology* **144**:2895-2903.
- Arai, H., T. Yamamoto, T. Ohishi, T. Shimizu, T. Nakata und T. Kudo. **1999**. Genetic organization and characteristics of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid degradation pathway of *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiology* **145**:2813-2820.
- Arai, H., T. Ohishi, M. Y. Chang und T. Kudo. **2000**. Arrangement and regulation of the genes for *meta*-pathway enzymes required for degradation of phenol in *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiology* **146**:1707-1715.
- Armengaud, J., B. Happe und K. N. Timmis. **1998**. Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome. *J. Bacteriol.* **180**:3954-3966.
- Armengaud, J., K. N. Timmis und R. M. Wittich. **1999**. A functional 4-hydroxysalicylate/hydroxyquinol degradative pathway gene cluster is linked to the initial dibenzo-*p*-dioxin pathway genes in *Sphingomonas* sp. strain RW1. *J. Bacteriol.* **181**:3452-3461.
- Bairoch, A., P. Bucher und K. Hofmann. **1997**. The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res.* **25**:217-221.
- Baldi, P., S. Brunak, P. Frasconi, G. Pollastri und G. Soda. **1999**. Exploiting the past and the future in protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* **15**:937-946.
- Bartels, I., H.-J. Knackmuss und W. Reineke. **1984**. Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:500-505.
- Bartilson, M. und V. Shingler. **1989**. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phenol-catabolizing *Pseudomonas* CF600. *Gene* **85**:233-238.
- Bast, E. **1999**. Mikrobiologische Methoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, S. 150-151.
- Benjamin, R. C., J. A. Voss und D. A. Kunz. **1991**. Nucleotide sequence of *xylE* from the TOL pDK1 plasmid and structural comparison with isofunctional catechol 2,3-dioxygenase genes from TOL, pWW0 and NAH7. *J. Bacteriol.* **173**:2724-2728.
- Benjamin, R. C., D. R. Hares und H. S. Khedairy. **1999**. Direct Submission (11-MAR-1999).
- Blattner, F. R., G. Plunkett III, 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 und Y. Shao. **1997**. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
- Bosch, R., E. Garcia-Valdes und E. R. Moore. **2000**. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene* **245**:65-74.

- Buckel, W., U. Dorn und R. Semmler. **1981**. Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*. *Eur. J. Biochem.* **118**:315-321.
- Busby, S. und R. H. Ebright. **1994**. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**:743-746.
- Busse, H., T. El-Banna und G. Auling. **1989**. Evaluation of different approaches for identification of xenobiotic-degrading pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1578-1583.
- Cai, G.-Q., B. T. Driscoll und T. C. Charles. **2000**. Requirement for the enzymes acetoacetyl coenzyme A synthetase and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) synthase for growth of *Sinorhizobium meliloti* on PHB cycle intermediates. *J. Bacteriol.* **182**:2113-2118.
- Cary, J. W., D. J. Petersen, E. T. Papoutsakis und G. N. Bennett. **1990**. Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 acetoacetyl-coenzyme A: acetate/butyrate:coenzyme A-transferase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1576-1583.
- Chen, C. M., Q. Z. Ye, Z. M. Zhu, B. L. Wanner und C. T. Walsh. **1990**. Molecular biology of carbon-phosphorus bond cleavage. Cloning and sequencing of the *phn* (*psiD*) genes involved in alkylphosphonate uptake and C-P lyase activity in *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **265**:4461-4471.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, S. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, S. Skelton, S. Squares, R. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead und B. G. Barrell. **1998**. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537-544.
- Collier, L. S., N. N. Nichols und E. L. Neidle. **1997**. *BenK* encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* **179**:5943-5946.
- Collier, L. S., G. L. Gaines III und E. L. Neidle. **1998**. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J. Bacteriol.* **180**:2493-2501.
- Collinsworth W. L., P. J. Chapman und S. Dagley. **1973**. Stereospecific enzymes in the degradation of aromatic compounds by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **113**:922-931.
- Copley, S. D. **2000**. Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach. *TIBS* **25**:261-265.
- Corthésy-Theulaz, I. E. **1997**. Direct Submission (26-AUG-1997).
- Corthésy-Theulaz, I. E., G. E. Bergonzelli, H. Henry, D. Bachmann, D. D. Schorderet, A. L. Blum und L. N. Ornston. **1997**. Cloning and characterization of *Helicobacter pylori* succinyl CoA:acetoacetate CoA-transferase, a novel prokaryotic member of the CoA-transferase family. *J. Biol. Chem.* **272**:25659-25667.
- Costanzi, C. und D. Gillespie. **1987**. Fast blots: immobilization of DNA and RNA from cells. *Methods Enzymol.* **152**:582-587.
- Crawford, I. P. und L. Eberly. **1989**. DNA sequence of the tryptophan synthase genes of *Pseudomonas putida*. *Biochimie* **71**:521-531.
- Davison, J. **1999**. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**:73-91.
- Dorn, E. und H.-J. Knackmuss. **1978**. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad. *Biochem. J.* **174**:73-84.
- Dorn, E., M. Hellwig, W. Reineke und H.-J. Knackmuss. **1974**. Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. *Arch. Microbiol.* **99**:61-70.

- Duffner, F. M. und R. Müller. **1998**. A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**:37-45.
- Duffner, F. M., U. Kirchner, M. P. Bauer und R. Müller. **2000**. Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene* **256**:215-221.
- Eaton, R. W. und K. N. Timmis. **1986**. Characterization of a plasmid-specified pathway for catabolism of isopropylbenzene in *Pseudomonas putida* RE204. *J. Bacteriol.* **168**:123-131.
- Eaton, R. W. **1996**. *p*-Cumate catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA carrying the *cmt* operon. *J. Bacteriol.* **178**:1351-1362.
- Eaton, R. W. **1997**. *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate. *J. Bacteriol.* **179**: 3171-3180.
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde und E. C. Böttger. **1989**. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **17**:7843-7853.
- Elomari, M., L. Coroler, B. Hoste, M. Gillis, D. Izard und H. Leclerc. **1996**. DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:1138-1144.
- Eltis, L. D. und J. T. Bolin. **1996**. Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.* **178**: 5930-5937.
- Elvidge, J. A., R. P. Linstead, B. A. Orkin, P. Sims, H. Baer und D. B. Pattison. **1950a**. Unsaturated lactones and related substances. Part IV. Lactonic products derived from muconic acid. *J. Chem. Soc.* **1950**:2228-2235.
- Elvidge, J. A., R. P. Linstead, P. Sims und B. A. Orkin. **1950b**. The third isomeric (*cis,trans*-)muconic acid. Part IV. Lactonic products derived from muconic acid. *J. Chem. Soc.* **1950**:2235-2241.
- Eriksson, M. und B. Pettersson. **1999a**. Direct Submission (18-OCT-1999).
- Eriksson, M. und B. Pettersson. **1999b**. Direct Submission (19-OCT-1999).
- Eulberg, D., S. Lakner, L. A. Golovleva und M. Schlömann. **1998**. Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster from *Rhodococcus opacus* 1CP: evidence for a merged enzyme with 4-carboxymuconolactone-decarboxylating and 3-oxoadipate enol-lactone-hydrolyzing activity. *J. Bacteriol.* **180**:1072-1081.
- Farabaugh, P. J. **1996**. Programmed translational frameshifting. *Microbiol. Rev.* **60**:103-134.
- Ferrandez, A., J. L. Garcia und E. Diaz. **1997a**. Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170**:2573-2581.
- Ferrandez, A., M. A. Prieto, J. L. Garcia und E. Diaz. **1997b**. Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **406**:23-27.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, K. McKenney, G. G. Sutton, W. FitzHugh, C. A. Fields, J. D. Gocayne, J. D. Scott, R. Shirley, L.-I. Liu, A. Glodek, J. M. Kelley, J. F. Weidman, C. A. Phillips, T. Spriggs, E. Hedblom, M. D. Cotton, T. Utterback, M. C. Hanna, D. T. Nguyen, D. M. Saudek, R. C. Brandon, L. D. Fine, J. L. Fritchman, J. L. Fuhrmann, N. S. Geoghagen, C. L. Gnehm, L. A. McDonald, K. V. Small, C. M. Fraser, H. O. Smith und J. C. Venter. **1995**. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**:496-512.
- Frantz, B. und A. M. Chakrabarty. **1989**. Organization and nucleotide sequence determination of a gene cluster involved in 3-chlorobenzoate degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:4460-4464.

- Frazer, R. W., D. M. Livingston, D. C. LaPorte und J. D. Lipscomb. **1993**. Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas putida* protocatechuate 3,4- dioxygenase genes. *J. Bacteriol.* **175**:6194-6202.
- Fujii, T., M. Takeo und Y. Maeda. **1997**. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA. *Microbiology* **143**:93-99.
- Fukumori, F. **1996**. Direct Submission (16-MAY-1996).
- Ghosal, D., I. S. You und I. C. Gunsalus. **1987**. Nucleotide sequence and expression of gene *nahH* of plasmid NAH7 and homology with gene *xylE* of TOL pWW0. *Gene* **55**:19-28.
- Ghosal, D. und I-S. You. **1989**. Operon structure and nucleotide homology of the chlorocatechol oxidation genes of plasmids pJP4 and pAC27. *Gene* **83**:225-232.
- Göbel, M. **1999**. Untersuchungen zum unteren Chloraromatenabbauweg: 3-Oxoacetyl-Coenzym A-Thiolase und -Transferase in *Pseudomonas* sp. Stamm B13. Diplomarbeit, Chemische Mikrobiologie, Bergische Universität Wuppertal.
- Godfrey, S. A. C., S. A. Harrow., J. W. Marshall und J. D. Klena. **2000**. Direct Submission (28-NOV-2000).
- Godfrey, S. A. C. und J. W. Marshall. **2002**. Identification of cold-tolerant *Pseudomonas viridiflava* and *P. marginalis* causing severe carrot postharvest bacterial soft rot during refrigerated export from New Zealand. *Plant Pathol.* **51**:155-162.
- Grunstein, M. und D. S. Hogness. **1975**. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:3961-3965.
- Habe, H., T. Kimura, H. Nojiri, H. Yamane und T. Omori. **1996**. Cloning and nucleotide sequences of the genes involved in the *meta*-cleavage pathway of cumene degradation in *Pseudomonas fluorescens* IP01. *J. Ferment. Bioeng.* **81**:247-254.
- Hall, T. A. **1999**. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- Hanahan, D. **1983**. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Hanahan, D. **1985**. Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover, D. M. (Hrsg.): DNA cloning: A practical approach. IRL Press, Oxford, S. 109-135.
- Happe, B., L. D. Eltis, H. Poth, R. Hedderich und K. N. Timmis. **1993**. Characterization of 2,2',3-trihydroxybiphenyl dioxygenase, an extradiol dioxygenase from the dibenzofuran- and dibenzo-*p*-dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain RW1. *J. Bacteriol.* **175**:7313-7320.
- Harayama S., M. Reikik, K.-L. Ngai und L. N. Ornston. **1989**. Physically associated enzymes produce and metabolize 2-hydroxypent-2,4-dienoate, a chemically unstable intermediate formed in catechol metabolism via *meta* cleavage in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **171**:6251-6258.
- Harley, C. B. und R. P. Reynolds. **1987**. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **15**:2343-2361.
- Hartmann, J., W. Reineke und H.-J. Knackmuss. **1979**. Metabolism of 3-chloro-, 4-chloro-, and 3,5-dichlorobenzoate by a pseudomonad. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:421-428.
- Hartnett, C., E. L. Neidle, K. L. Ngai und L. N. Ornston. **1990**. DNA sequences of genes encoding *Acinetobacter calcoaceticus* protocatechuate 3,4-dioxygenase: evidence indicating shuffling of genes and of DNA sequences within genes during their evolutionary divergence. *J. Bacteriol.* **172**:956-966.
- Hartnett, G. B. und L. N. Ornston. **1994**. Acquisition of apparent DNA slippage structures during extensive evolutionary divergence of *pcaD* and *catD* genes encoding identical catalytic activities in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Gene* **142**:23-29.

- Harwood, C. S., N. N. Nichols, M. K. Kim, J. L. Ditty und R. E. Parales. **1994**. Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* **176**:6479-6488.
- Harwood, C. S. und R. E. Parales. **1996**. The β -keto adipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:553-590.
- Hawley, D. K. und W. R. McClure. **1983**. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**:2237-2255.
- He, Z., G. R. Johnson, R. E. Parales, D. T. Gibson und J. C. Spain. **1999**. Direct Submission (27-SEP-1999).
- Heinaru, E., J. Truu, U. Stottmeister und A. Heinaru. **2000**. Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol- and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:195-205.
- Herrmann, H., C. Müller, I. Schmidt, J. Mahnke, L. Petruschka und K. Hahnke. **1995**. Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas putida* strain H. *Mol. Gen. Genet.* **247**:240-246.
- Hinner, I.-S., M. Lohmann und M. Schloemann. **1998a**. Direct Submission (11-JAN-1998).
- Hinner, I.-S., S. Buerger und M. Schloemann. **1998b**. Direct Submission (11-JAN-1998).
- Hofer, B., S. Backhaus und K. N. Timmis. **1994**. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (*bph*) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene* **144**:9-16.
- Horinouchi, M., T. Yamamoto, K. Taguchi, H. Arai und T. Kudo. **2000**. Direct Submission (28-MAR-2000).
- Hughes, E. J., M. K. Shapiro, J. E. Houghton und L. N. Ornston. **1988**. Cloning and expression of *pca* genes from *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2877-87.
- Hwang, S., S. J. Kim, C. K. Kim, Y. Kim, S. J. Kim und Y. C. Kim. **1999**. The *phnIJ* genes encoding acetaldehyde dehydrogenase (acylating) and 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase in *Pseudomonas* sp. DJ77 and their evolutionary implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**:469-473.
- Iriye, R. **2001**. Direct Submission (22-FEB-2001).
- Jencks, W. P. **1973**. Coenzyme A transferases. *In: The Enzymes* (Boyer, P. D., Hrsg.) S. 483-496, Academic Press, New York.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada und S. Tabata. **2000**. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**:331-338.
- Kang, B. S., J. Y. Ha, J. C. Lim, J. Lee, C. K. Kim, K. R. Min und Y. Kim. **1998**. Structure of catechol 2,3-dioxygenase gene from *Alcaligenes eutrophus* 335. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**:791-796.
- Kasberg, T., V. Seibert, M. Schlömann und W. Reineke. **1997**. Cloning, characterization, and sequence analysis of the *clcE* gene encoding the maleylacetate reductase of *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* **179**:3801-3803.
- Kaschabek S. R., T. Kasberg, D. Müller, A. E. Mars, D. B. Janssen und W. Reineke. **1998**. Degradation of chloroaromatics: Purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. *J. Bacteriol.* **180**:296-302.
- Kaschabek, S. R., B. Kuhn, D. Müller, E. Schmidt und W. Reineke. **2002**. Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13: purification and characterization of 3-oxoadipate:succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase. *J. Bacteriol.* **184**:207-215.

- Kassel-Çati, K. **1999**. Entwicklung einer Gensondentechnik für die Mineralisation von DMSO sowie Untersuchungen an den Genen des β -Ketoacidweges in *Pseudomonas* sp. B13. Dissertation, Chemische Mikrobiologie, Bergische Universität Wuppertal.
- Katagiri, M. und O. Hayaishi. **1957**. Enzymatic degradation of β -ketoacidic acid. *J. Biol. Chem.* **226**:439-449.
- Keil, H., M. R. Lebens und P. A. Williams. **1985**. TOL plasmid pWW15 contains two nonhomologous, independently regulated catechol 2,3-oxygenase genes. *J. Bacteriol.* **163**:248-255.
- Kikuchi, Y., Y. Yasukochi, Y. Nagata, M. Fukuda und M. Takagi. **1994**. Nucleotide sequence and functional analysis of the *meta*-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* **176**:4269-4276.
- Kimura, N., A. Nishi, M. Goto und K. Furukawa. **1997**. Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally. *J. Bacteriol.* **179**:3936-3943.
- King, E. O., M. K. Ward und D. E. Raney. **1954**. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**:301-307.
- Kitayama, A., T. Achioku, T. Yanagawa, K. Kanou, M. Kikuchi, H. Ueda, E. Suzuki, H. Nishimura, T. Nagamune und Y. Kawakami. **1996**. Cloning and characterization of extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas aeruginosa* JI104. *J. Ferment. Bioeng.* **82**: 217-223.
- Klečka, G. M. und D. T. Gibson. **1981**. Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:1159-1165.
- Klenk, H. P., R. A. Clayton, J. Tomb, O. White, K. E. Nelson, K. A. Ketchum, R. J. Dodson, M. Gwinn, E. K. Hickey, J. D. Peterson, D. L. Richardson, A. R. Kerlavage, D. E. Graham, N. C. Kyrpides, R. D. Fleischmann, J. Quackenbush, N. H. Lee, G. G. Sutton, S. Gill, E. F. Kirkness, B. A. Dougherty, K. McKenney, M. D. Adams, B. Loftus, S. Peterson, C. I. Reich, L. K. McNeil, J. H. Badger, A. Glodek, L. Zhou, R. Overbeek, J. D. Gocayne, J. F. Weidman, L. McDonald, T. Utterback, M. D. Cotton, T. Spriggs, P. Artiach, B. P. Kaine, S. M. Sykes, P. W. Sadow, K. P. D'Andrea, C. Bowman, C. Fujii, S. A. Garland, T. M. Mason, G. J. Olsen, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese und J. C. Venter. **1997**. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**:364-370.
- Kok, R. G., D. M. Young und L. N. Ornston. **1999**. Phenotypic expression of PCR-generated random mutations in a *Pseudomonas putida* gene after its introduction into an *Acinetobacter* chromosome by natural transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1675-1680.
- Kowalchuk, G. A., G. B. Hartnett, A. Benson, J. E. Houghton, K. L. Ngai und N. L. Ornston. **1994**. Contrasting patterns of evolutionary divergence within the *Acinetobacter calcoaceticus* *pca* operon. *Gene* **146**:23-30.
- Kranz, O. **2001**. Vergleich zwischen den Stämmen *Pseudomonas putida* GJ31* und *Pseudomonas veronii* 16-6A sowie deren Catechol-2,3-Dioxygenasen. Diplomarbeit, Chemische Mikrobiologie, Bergische Universität Wuppertal.
- Kukor, J. J. und R. H. Olsen. **1996**. Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1728-1740.
- Kunze, M. **2002**. Abbau von Chloraromaten in *Pseudomonas putida* GJ31: das Plasmid pKW1. Dissertation, Chemische Mikrobiologie, Bergische Universität Wuppertal.
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin und N. R. Pace. **1985**. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:6955-6959.
- Lau, P. C. K. und V. de Lorenzo. **1999**. Genetic Engineering: The Frontier of bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **33**:124 A-128 A.
- Lau, P. C., H. Bergeron, D. Labbe, Y. Wang, R. Brousseau und D. T. Gibson. **1994**. Sequence and expression of the *todGIH* genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Gene* **146**:7-13.

- Laurie, A. D. und G. Lloyd-Jones. **1999**. Conserved and hybrid *meta*-cleavage operons from PAH-degrading *Burkholderia* RP007. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**:308-314.
- Lawrence, J. G. und J. R. Roth. **1996**. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* **143**: 1843-1860.
- Lawrence, J. G. und H. Ochman. **1998**. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:9413-9417.
- Li, W. und H. M. Tan. **1999**. Direct Submission (24-AUG-1999).
- Lin, T. W. und W. A. Bridger. **1992**. Sequence of cDNA clone encoding pig heart mitochondrial CoA transferase. *J. Biol. Chem.* **267**:975-978.
- Lorite, M. J., J. Sanjuan, L. Velasco, J. Olivares und E. J. Bedmar. **1998**. Characterization of *Bradyrhizobium japonicum* *pcaBDC* genes involved in 4-hydroxybenzoate degradation. *Biochim. Biophys. Acta* **1397**:257-261.
- Ma, Y. und D. S. Herson. **1996**. Direct Submission (24-JAN-1996).
- Mack, M., K. Bendrat, O. Zelder, E. Eckel, D. Linder und W. Buckel. **1994**. Location of the two genes encoding glutaconate coenzyme A-transferase at the beginning of the hydroxyglutarate operon in *Acidaminococcus fermentans*. *Eur. J. Biochem.* **226**:41-51.
- Mack, M. und W. Buckel. **1995**. Identification of glutamate β 54 as the covalent-catalytic residue in the active site of glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*. *FEBS Lett.* **357**:145-148.
- Mandel, M. und A. Higa. **1970**. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**:159-162.
- Mars, A. E., T. Kasberg, S. R. Kaschabek, M. H. van Agteren, D. B. Janssen und W. Reineke. **1997**. Microbial degradation of chloroaromatics: use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J. Bacteriol.* **179**:4530-4537.
- Mars, A. E., J. Kingma, S. R. Kaschabek, W. Reineke und D. B. Janssen. **1999**. Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31. *J. Bacteriol.* **181**:1309-1318.
- McClure, N. C. **1991**. Direct Submission (13-MAY-1991).
- McClure, N. C., C. P. Saint und A. S. Weightman. **1991**. Direct Submission (~MAY-1991).
- Meijer, W. G. und K. E. O'Connor. **2002**. Direct Submission (04-MAR-2002).
- Mesarch, M. B., C. H. Nakatsu und L. Nies. **2000**. Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:678-683.
- Miller, J. H. **1972**. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Moon, J., H. Chang, K. R. Min und Y. Kim. **1995**. Cloning and sequencing of the catechol 2,3-dioxygenase gene of *Alcaligenes* sp. KF711. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**:943-949.
- Mosqueda, G., M. I. Ramos-Gonzalez und J. L. Ramos. **1999**. Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene* **232**:69-76.
- Murakami, S., Y. Nakanishi, N. Kodama, S. Takenaka, R. Shinke und K. Aoki. **1998**. Purification, characterization, and gene analysis of catechol 2,3-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Pseudomonas* species AW-2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**:747-752.
- Murakami, S., A. Takashima, J. Takemoto, S. Takenaka, R. Shinke und K. Aoki. **1999**. Cloning and sequence analysis of two catechol-degrading gene clusters from the aniline-assimilating bacterium *Frateuria* species ANA-18. *Gene* **226**:189-198.

- Murphy, L., M. Quail, D. Harris, M. Rajandream, A. Ivens, B. Barrell und K. Oliver. **2000**. Direct Submission (08-AUG-2000).
- Nakai, C., H. Kagamiyama, M. Nozaki, T. Nakazawa, S. Inouye, Y. Ebina und A. Nakazawa. **1983**. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Biol. Chem.* **258**:2923-2928.
- Nakamura, K., H. Ishida und T. Iizumi. **2000**. Constitutive trichloroethylene degradation led by *tac* promoter chromosomally integrated upstream of phenol hydroxylase genes of *Ralstonia* sp. KN1 and its nucleotide sequence analysis. *J. Biosci. Bioeng.* **89**:47-54.
- Naumann, K. **1993**. Chlorchemie der Natur. *Chemie in unserer Zeit* **1**:33-41.
- Ng, L. C., V. Shingler, C. C. Sze und C. L. Poh. **1994**. Cloning and sequences of the first eight genes of the chromosomally encoded (methyl) phenol degradation pathway from *Pseudomonas putida* P35X. *Gene* **151**:29-36.
- Nicholas, K. B. und H. B. Nicholas Jr. **1997**. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Vertrieb durch den Autor.
- Nichols, N. N. und C. S. Harwood. **1995**. Repression of 4-hydroxybenzoate transport and degradation by benzoate: a new layer of regulatory control in the *Pseudomonas putida* β -keto adipate pathway. *J. Bacteriol.* **177**:7033-7040.
- Nierman, W. C., T. V. Feldblyum, M. T. Laub, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, J. Eisen, J. F. Heidelberg, M. R. K. Alley, N. Ohta, J. R. Maddock, I. Potocka, W. C. Nelson, A. Newton, C. Stephens, N. D. Phadke, B. Ely, R. T. DeBoy, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. L. Gwinn, D. H. Haft, J. F. Kolonay, J. Smit, M. Craven, H. Khouri, J. Shetty, K. Berry, T. Utterback, K. Tran, A. Wolf, J. Vamathevan, M. Ermolaeva, O. White, S. L. Salzberg, J. C. Venter, L. Shapiro und C. M. Fraser. **2001**. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:4136-4141.
- Noh, S. J., Y. Kim, K. H. Min, T. B. Karegoudar und C. K. Kim. **2000**. Cloning and nucleotide sequence analysis of *xylE* gene responsible for *meta*-cleavage of 4-chlorocatechol from *Pseudomonas* sp. S-47. *Molec. Cells* **10**:475-479.
- Nojiri, H., H. Sekiguchi, K. Maeda, M. Urata, S. Nakai, T. Yoshida, H. Habe und T. Omori. **2001**. Genetic characterization and evolutionary implications of a *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* **183**:3663-3679.
- Nozaki, M. **1970**. Metapyrocatechase (*Pseudomonas*). *Methods Enzymol.* **17A**:522-525.
- Ochman, H., J. G. Lawrence und E. A. Groisman. **2000**. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Oh, J. M., E. Kang, K. R. Min, C. K. Kim, Y. C. Kim, J. Y. Lim, K. S. Lee, K. H. Min und Y. Kim. **1997**. Structure of catechol 2,3-dioxygenase gene encoded in TOM plasmid of *Pseudomonas cepacia* G4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**:578-581.
- Ohta, Y., M. Maeda und T. Kudo. **2001**. *Pseudomonas putida* CE2010 can degrade biphenyl by a mosaic pathway encoded by the *tod* operon and *cmtE*, which are identical to those of *P. putida* F1 except for a single base difference in the operator-promoter region of the *cmt* operon. *Microbiology* **147**:31-41.
- Oldenhuis, R., L. Kuijk, A. Lammers, D. B. Janssen und B. Witholt. **1989**. Degradation of chlorinated and non-chlorinated aromatic solvents in soil suspensions by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**:211-217.
- Olivera, E. R., B. Minambres, B. Garcia, C. Muniz, M. A. Moreno, A. Ferrandez, E. Diaz, J. L. Garcia und J. M. Luengo. **1998**. Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6419-6424.
- Ornston, L. N. **1966a**. The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. II. Enzymes of the protocatechuate pathway. *J. Biol. Chem.* **241**:3787-3794.

- Ornston, L. N. **1966b**. The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. III. Enzymes of the catechol pathway. *J. Biol. Chem.* **241**:3795-3799.
- Ouchiyama, N., S. Miyachi und T. Omori. **1998**. Cloning and nucleotide sequence of carbazole catabolic genes from *Pseudomonas stutzeri* strain OM1, isolated from activated sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**:57-63.
- Page, R. D. M. **1996**. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358.
- Parales, R. E. und C. S. Harwood. **1992**. Characterization of the genes encoding β -keto adipate:succinyl-coenzyme A transferase in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **174**:4657-4666.
- Parales, R. E und C. S. Harwood. **1993**. Regulation of the *pcaIJ* genes for aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **175**:5829-5838.
- Parales, R. E., T. A. Ontl und D. T. Gibson. **1997**. Cloning and sequence analysis of a catechol 2,3-dioxygenase gene from the nitrobenzene-degrading strain *Comamonas* sp. JS765. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**:385-391.
- Park, H. S. und H. S. Kim. **2000**. Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12. *J. Bacteriol.* **182**:573-580.
- Parke, D. **1997**. Acquisition, reorganization, and merger of genes: novel management of the β -keto adipate pathway in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**:3-12.
- Perna, N. T., G. Plunkett III, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. Dimalanta, K. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch und F. R. Blattner. **2001**. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**:529-533.
- Pfennig, N. und K. D. Lippert. **1966**. Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Mikrobiol.* **55**:245-256.
- Pieper, D. H. und K. N. Timmis. **1996**. Vom Xenobiotikum zum Antibiotikum: Ein grundlegendes ökotoxikologisches Problem beim Abbau von Chloraromaten und dessen Lösung durch genetisches Design. Ergebnisbericht GBF (http://bib.gbf.de/ergebnisbericht/1996/deutsch/sektion_b/b3deutsch.html).
- Platt, A., V. Shingler, S. C. Taylor und P. A. Williams. **1995**. The 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase and acetaldehyde dehydrogenase (acylating) encoded by the *nahM* and *nahO* genes of the naphthalene catabolic plasmid pWW60-22 provide further evidence of conservation of *meta*-cleavage pathway gene sequences. *Microbiology* **141**:2223-2233.
- Platt, T. **1986**. Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **55**:339-372.
- Pollastri, G., P. Baldi, P. Fariselli und R. Casadio. **2001**. Improved prediction of the number of residue contacts in proteins by recurrent neural networks. *Bioinformatics* **17**:234-242.
- Powlowski, J. und V. Shingler. **1994**. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation* **5**:219-236.
- Prucha, M., A. Peterseim, K. N. Timmis und D. H. Pieper. **1996**. Muconolactone isomerase of the 3-oxoadipate pathway catalyzes dechlorination of 5-chloro-substituted muconolactones. *Eur. J. Biochem.* **237**:350-356.
- Ramos, J. L., E. Duque, P. Godoy und A. Segura. **1998**. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **180**:3323-3329.
- Ravatn, R., A. J. B. Zehnder und J. R. van der Meer. **1998**. Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2126-2132.

- Redenbach, M., H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi und D. A. Hopwood. **1996**. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**:77-96.
- Reese, M. G., N. L. Harris und F. H. Eeckman. **1996**. Large scale sequencing specific neural networks for promoter and splice site recognition. Proc. 1996 Pacific Symposium, Biocomputing. L. Hunter und T. E. Klein (Hrsg.), World Scientific Publishers, Singapore.
- Reineke, W. und M. Schlömann. **1997**. Grundlegende Aspekte des bakteriellen Abbaus von Chloraromaten. In: C. Knorr und T. von Schell (Hrsg.): Mikrobieller Schadstoffabbau - Ein interdisziplinärer Ansatz.- Vieweg & Sohn, Braunschweig, S. 91-117.
- Reineke, W. **1998**. Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:287-331.
- Reineke, W. **2001**. Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms. In: The Handbook of Environmental Chemistry (O. Hutzinger, Hrsg.) Vol. 2K, The Natural Environment and Biogeochemical Cycles (Volume editor: B. Beek), Springer Verlag, Berlin, S. 1-161.
- Rochet, J.-C. und W. A. Bridger. **1994**. Identification of glutamate 344 as the catalytic residue in the active site of pig heart CoA transferase. *Protein Sci.* **3**:975-981.
- Romero-Steiner, S., R. E. Parales, C. S. Harwood und J. E. Houghton. **1994**. Characterization of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of *p*-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* **176**:5771-5779.
- Romine, M. F., L. C. Stillwell, K. K. Wong, S. J. Thurston, E. C. Sisk, C. Sensen, T. Gaasterland, J. K. Fredrickson und J. D. Saffer. **1999**. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* **181**:1585-1602.
- Rost, B. **1996**. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.* **266**:525-539.
- Rost, B. und C. Sander. **1993**. Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:7558-7562.
- Saeki, Y., M. Nozaki und S. Senoh. **1980**. Cleavage of pyrogallol by non-heme iron-containing dioxygenases. *J. Biol. Chem.* **255**:8465-8471.
- Saint, C. P., N. C. McClure und W. A. Venables. **1990**. Physical map of the aromatic amine and *m*-toluate catabolic plasmid pTDN1 in *Pseudomonas putida*: localization of a unique *meta*-cleavage pathway. *J. Gen. Microbiol.* **136**:615-625.
- Salanoubat, M., S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Mangenot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J. C. Camus, L. Cattolico, M. Chandler, N. Choisine, C. Claudel-Renard, S. Cunnac, N. Demange, C. Gaspin, M. Lavie, A. Moisan, C. Robert, W. Saurin, T. Schiex, P. Siguier, P. Thebault, M. Whalen, P. Wincker, M. Levy, J. Weissenbach und C. A. Boucher. **2002**. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**:497-502.
- Sala-Trepat, J. M. und W. C. Evans. **1971**. The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species (4-oxalocrotonate pathway). *Eur. J. Biochem.* **20**:400-413.
- Sato, S. I., J. W. Nam, K. Kasuga, H. Nojiri, H. Yamane und T. Omori. **1997b**. Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* **179**:4850-4858.
- Sato, S. I., N. Ouchiyama, T. Kimura, H. Nojiri, H. Yamane und T. Omori. **1997a**. Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: nucleotide sequences of genes and characterization of *meta*-cleavage enzymes and hydrolase. *J. Bacteriol.* **179**:4841-4849.

- Schmidt, E. und H.-J. Knackmuss. **1980**. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid. *Biochem. J.* **192**:339-347.
- Schmidt, T. **2000**. Chlortoluole – Schlüsselintermediate der Feinchemie. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **5**: 639-639.
- Seeger, S., D. Harris, K. D. James, J. Parkhill und B. G. Barrell. **1999**. Direct Submission (??-JUN-1999).
- Sei, K., K. Asano, N. Tateishi, K. Mori, M. Ike und M. Fujita. **1999**. Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *J. Biosci. Bioeng.* **88**:542-550.
- Sgamarella, V., J. H. van de Sande und H. G. Khorana. **1970**. Studies on polynucleotides. A novel joining reaction catalysed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**:1468-1475.
- Shanley, M. S., A. Harrison, R. E. Parales, G. Kowalchuk, D. J. Mitchell und L. N. Ornston. **1994**. Unusual G+C content and codon usage in *catIJF*, a segment of the *ben-cat* supra-operonic cluster in the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosome. *Gene* **138**:59-65.
- She, Q., R. K. Singh, F. Confalonieri, Y. Zivanovic, G. Allard, M. J. Awayez, C. C.-Y. Chan-Weiher, I. G. Clausen, B. A. Curtis, A. De Moors, G. Erauso, C. Fletcher, P. M. K. Gordon, I. Heikamp-de Jong, A. C. Jeffries, C. J. Kozera, N. Medina, X. Peng, H. P. Thi-Ngoc, P. Redder, M. E. Schenk, C. Theriault, N. Tolstrup, R. L. Charlebois, W. F. Doolittle, M. Duguet, T. Gaasterland, R. A. Garrett, M. A. Ragan, C. W. Sensen und J. Van der Oost. **2001**. Direct Submission (24-APR-2001).
- Shine, J. und L. Dalgarno. **1975**. Determination of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* **254**:34-38.
- Shingler, V., J. Powlowski und U. Marklund. **1992**. Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **174**:711-724.
- Smith, W. C., L. Xiang und B. Shen. **2000**. Genetic localization and molecular characterization of the *nonS* gene required for macrotetrolide biosynthesis in *Streptomyces griseus* DSM40695. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1809-1817.
- Southern, E. M. **1975**. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Stanier, R.Y. und L. N. Ornston. **1973**. The β -ketoacid pathway. *Adv. Microb. Physiol.* **9**:89-151.
- Steiner, B., R. Meyer, M. Bowen und W. Morrill. **2000**. Direct Submission (25-AUG-2000).
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. M. Lim, K. A. Smith, D. H. Spencer, G. K. S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory und M. V. Olson. **2000**. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-964.
- Takami, H., K. Nakasone, N. Ogasawara, C. Hirama, Y. Nakamura, N. Masui, F. Fuji, Y. Takaki, A. Inoue und K. Horikoshi. **1999**. Sequencing of three lambda clones from the genome of alkaliphilic *Bacillus* sp. strain C-125. *Extremophiles* **3**:29-34.
- Takami, H., K. Nakasone, Y. Takaki, G. Maeno, R. Sasaki, N. Masui, F. Fuji, C. Hirama, Y. Nakamura, N. Ogasawara, S. Kuhara und K. Horikoshi. **2000**. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **28**:4317-4331.
- Takenaka, S., S. Murakami, R. Shinke, K. Hatakeyama, H. Yukawa und K. Aoki. **1997**. Novel genes encoding 2-aminophenol 1,6-dioxygenase from *Pseudomonas* species AP-3 growing on 2-aminophenol and catalytic properties of the purified enzyme. *J. Biol. Chem.* **272**:14727-14732.
- Takenaka, S., S. Murakami, Y. J. Kim und K. Aoki. **2000**. Complete nucleotide sequence and functional analysis of the genes for 2-aminophenol metabolism from *Pseudomonas* sp. AP-3. *Arch. Microbiol.* **174**:265-272.

- Takeo, M., T. Fujii, K. Takenaka und Y. Maeda. **1998**. Cloning and sequencing of a gene cluster for the *meta*-cleavage pathway of aniline degradation in *Acinetobacter* sp. strain YAA. *J. Ferment. Bioeng.* **85**:514-517.
- Tan, H.-M. **1999**. Bacterial catabolic transposons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:1-12.
- Thomas, C. M. **2001**. Direct Submission (07-AUG-2001).
- Thompson, J. D., D. G. Higgins und T. J. Gibson. **1994**. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin und D. G. Higgins. **1997**. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**:4876-4882.
- Tomb, J.-F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser und J. C. Venter. **1997**. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-547. [veröffentlichtes Erratum in *Nature* (1997) 389:412].
- Tropel, D., C. Meyer, J. Armengaud und Y. Jouanneau. **2002**. Ferredoxin-mediated reactivation of chlorocatechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* GJ31. *Arch. Microbiol.* **177**:345-351.
- van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama und A. J. B. Zehnder. **1992**. Molecular mechanism of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* **56**:677-694.
- Vogeli, G. und P. S. Kaytes. **1987**. Amplification, storage, and replication of libraries. *Methods Enzymol.* **152**:407-415.
- Volff, J.-N., C. Eichenseer, P. Viell, W. Piendl und J. Altenbuchner. **1996**. Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Microbiol.* **21**:1037-1047.
- Vollmer, M. D., P. Fischer, H.-J. Knackmuss und M. Schlömann. **1994**. Inability of muconate cycloisomerases to cause dehalogenation during conversion of 2-chloro-*cis,cis*-muconate. *J. Bacteriol.* **176**:4366-4375.
- Vollmer, M. D., U. Schell, V. Seibert, S. Lakner und M. Schlömann. **1999**. Substrate specificities of the chloromuconate cycloisomerases from *Pseudomonas* sp. B13, *Ralstonia eutropha* JMP134 and *Pseudomonas* sp. P51. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:598-605.
- Watanabe, T., R. Inoue, N. Kimura und K. Furukawa. **2000**. Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* **275**:31016-31023.
- West, S. E. H. und B. H. Iglewski. **1988**. Codon usage in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* **16**:9323-9335.
- White, O., J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, E. K. Hickey, J. D. Peterson, R. J. Dodson, D. H. Haft, M. L. Gwinn, W. C. Nelson, D. L. Richardson, K. S. Moffat, H. Qin, L. Jiang, W. Pamphile, M. Crosby, M. Shen, J. J. Vamathevan, P. Lam, L. McDonald, T. Utterback, C. Zalewski, K. S. Makarova, L. Aravind, M. J. Daly, K. W. Minton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, K. E. Nelson, S. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter und C. M. Fraser. **1999**. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**:1571-1577.
- Wierenga, R. K., P. Terpstra und W. G. J. Hol. **1986**. Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**:101-107.
- Wikström, P., A. Wiklund, A. Andersson und M. Forsman. **1996**. DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types. *J. Biotechnol.* **52**:107-120.

Wiley, R. H. und A. J. Hart. **1954**. 2-Pyrones. IX. 2-Pyrone-6-carboxylic acid and its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **76**:1942-1944.

Williams, S. E., E. M. Woolridge, S. C. Ransom, J. A. Landro, P. C. Babbitt und J. W. Kozarich. **1992**. 3-Carboxy-*cis,cis*-muconate lactonizing enzyme from *Pseudomonas putida* is homologous to the class II fumarase family: a new reaction in the evolution of mechanistic motif. *Biochemistry* **31**:9768-9776.

Yang, K., S. Iwagami und J. E. Davies. **1999**. Direct Submission (??-MAY-1999).

Yanish-Perron, C., J. Vieira und J. Messing. **1985**. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.

Yoshida, K., K. Shindo, H. Sano, S. Seki, M. Fujimura, N. Yanai, Y. Miwa und Y. Fujita. **1996**. Sequencing of a 65 kb region of the *Bacillus subtilis* genome containing the *lic* and *cel* loci, and creation of a 177 kb contig covering the *gnt-sacXY* region. *Microbiology* **142**:3113-3123.

Zhang, S., S. Kolvek, R. W. Lenz und S. Goodwin. **2000**. Direct Submission (21-SEP-2000).

Zukowski, M. M., D. F. Gaffney, D. Speck, M. Kauffmann, A. Findeli, A. Wisecup und J. P. Lecocq. **1983**. Chromogenic identification of genetic regulatory signals in *Bacillus subtilis* based on expression of a cloned *Pseudomonas* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:1101-1105.

6 Anhang

AATTCACCCCCGAACCTGCGCGAACAGGAAGAACGCCTGCGCGCCCAACTGGCCGGCAAGG	60
Start ORF1	
CCTGAGCGGAAGGAGACCCCTC ATG AAGATCAACACCTACCTGATTTTCGACGGCAACTG	120
CGAAGAAGCCTTCAAGCGCTACGCCGAGGTGCTGCGCGGCAACATTCCCATGCTGATGCA	180
CTTCGGCGATGCGCCGGACCAGAGCCAGATGCCGCCGGTTCGAGCAATCTCGTGATGCA	240
CGTGCGCCTGGAAGTGGGGCACCAGGTGCTGATGGGCTCGGACAACCTGCCCGCCGATGCC	300
CTATGAAGGCACCAAGGGTGTGTCCGTCTCGCTGAACGTCGACAGCAAGGCCGAAGCCAA	360
GCGCATCTTCGACGCCCTGAGCGAAGGCGGCCAGGTTCGGCATGCCGCTGCAACAGACCTT	420
CTGGGCGGCGGCCTTCGGCATGTTACCGACCGCTTCGGGGTGCCGTGGATGGTGAACCTG	480
Stopp ORF1	
CGAGCAGGACCAT TAA GGAGCCCTGGTATTTCGAGGAACAACCTGTCTTTGGGCTCCCGCG	540
TTCGCGGGAGTGACGGGATTCAGGTTTCGTTTTACCTGCGTCATCCCCGCGAACGCGGGG	600
ACCCAGAAAACACGTAGGAGCGAGCTTGCTCGCGAACCGCTTCGCGGGGAGTTTGTTTCG	660
CGAGCAAGCTCGCTCCTACAGGTTTGGAAACCGTAGAAGTGTTTCGATAACCGCACCGATAG	720
TCGATAATCGCATTGTTTGACCGCCAGCCACGGCGCTACTGTCTCTCCATCGGCATCCCC	780
Start catI	
M A E L L T L R E A	
GGATGCCCTGAACGACAAGACGAGACCGAGCA ATG GCTGAACTCCTGACCCCTCCGCGAAG	840
V E R F V N D G D T V A L E G F T H L I	
CGGTGCGAGCGTTTCGTGAACGACGGCGATAACCGTCGCCCTCGAAGGCTTCACCCACCTGA	900
P T A A S H E I I R Q G K K D L H L V R	
TCCCCACCGCCGCCTCCACGAAATCATCCGCCAGGGCAAGAAAGACCTGCACCTGGTGC	960
M T P D L V Y D L L I G A G C A R K L T	
GCATGACCCCCGACCTGGTCTACGACCTGCTGATCGGCGCCGGCTGCGCGCGCAAGCTGA	1020
F S W G G N P G V G S L H R L R D A V E	
CCTTCTCCTGGGGCGGCAACCCCGGCGTGGGTTCGCTGCACCGCTGCGCGACGCAGTGG	1080
K G W P N A L E I D E H S H A D L A N S	
AGAAGGGCTGGCCGAACGCCCTGGAGATCGACGAGCACAGCCACGCGGACCTCGCCAACCT	1140
Y V A G A S G L P F A V L R A Y A G S D	
CCTACGTCGCCGGCGCCTCGGGCCTGCCGTTTCGCGGTGCTGCGTGCCTACGCCGGCTCCG	1200

Fortsetzung

Abb. 44: Nukleotidsequenz des 5.9 kb-Fragmentes aus *Pseudomonas* sp. B13. Oberhalb der Gene finden sich die abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

Fortsetzung Abb. 44

L P K V N P N I K F I N C P F T G E Q L ACCTGCCGAAGGTCAACCCGAACATCAAGTTCATCAACTGCCCGTTCACCGCGAGCAAC	1260
A A V P S V R P D V T V I H A Q K A D R TGGCTGCCGTGCCTTCGGTGCAGCCGACGTACCGTGATCCACGCGCAGAAGGCCGACC	1320
K G N V L L W G I L G V Q K E A A L A A GCAAGGGCAACGTCTGCTGTGGGGCATCCTCGGCGTGCAGAAGGAGGCCGCCCTGGCTG	1380
K R C I V T V E E I V D D L N A P M N S CCAAGCGCTGCATCGTCACCGTCGAAGAGATCGTCGACGACCTCAATGCGCCGATGAACT	1440
C V L P T W A L S A V C H V P G G S H P CCTGCGTGTGCCGACCTGGGCGCTGAGCGCGGTCTGCCACGTCCCCGGCGGTTCGCATC	1500
S Y A H G Y Y E R D N R F Y Q A W D P I CGTCCTACGCCACGGCTACTACGAGCGCACAACCGCTTCTACCAGGCCTGGGACCCGA	1560
A R D R E T F T A W I D E Y I R G T K D TCGCCCCGACCGTGAGACCTTACCGCCTGGATCGACGAGTACATCCGCGGGACCAAGG	1620
F S E F Q A K I A E G K * Stopp catI Start catJ M S A Y S T N ATTTTCAGCGAGTTCCAAGCCAAGATCGCGGAGGGCAAGTAATGAGCGCCTATAGCACCAA	1680
E M M T V A A A R R L K N G A V C F V G TGAAATGATGACCGTGGCCGCCGCCCGCCGCTGAAGAACGGCGCGGTCTGCTTCGTCGG	1740
I G L P S K A A N L A R L T S S P D V V CATCGGCCTGCCGTCCAAGGCCGGAACCTGGCGCGCCTGACTTCGTCCCCGGACGTGGT	1800
L I Y E S G P I G A K P T V L P L S I G CCTGATCTACGAATCCGGCCCCATCGGCGCCAAGCCGACCGTGCTGCCGCTGTCCATCGG	1860
D G E L A E T A D T V V P T G E I F R Y TGACGGCGAACTGGCCGAAACCGCCGACACCGTGGTGCCACCGGCGAGATCTTCCGCTA	1920
W L Q G G R I D V G F L G A A Q V D R F CTGGCTGCAGGGCGGCCGTATCGACGTGCGTTTCTGGGCGCGGCCAGGTGACCGCTT	1980
G N I N T T V I G D Y N K P K V R L P G CGGCAACATCAACACCACCGTCATCGGCGACTACAACAAGCCGAAAGTGCGCCTGCCCGG	2040
A G G A P E I A G S A K E V L I I L K Q CGCCGGCGGGCGCCCCGGAGATCGCCGGTTCGCCAAGGAAGTGCTGATCATCTCAAGCA	2100
S H R T F V D K L A F I T S V G H G E G GTCGCACCGTACCTTCGTGACAAGCTGGCCTTCATCACCTCGGTCCGCCACGGCGAAGG	2160
G D H R K Q L G L P G K G P V A I I T D CGGCGACCACCGCAAGCAGCTCGGCCTGCCGGGCAAGGGTCCGGTGGCGATCATCACCGA	2220
L C I M E P E A G S N E F I V T S L H P CCTCTGCATCATGGAGCCGGAAGCCGGCAGCAACGAATTCATCGTCACTTCGCTGCACCC	2280

Fortsetzung

Fortsetzung Abb. 44

G V T R E Q V I E N T G W A I R F A E Q GGGTGTAACCCGCGAGCAAGTGATCGAGAACACCGGCTGGGCGATCCGCTTCGCCGAGCA	2340
V K E T A A P T E V E L E A L R A L E A GGTCAAGGAAACCGCCGCGCCACCGAGGTCGAGCTGGAAGCCCTGCGCGCCCTGGAAGC	2400
R T A A A H G Q Q G G E E * Stopp catJ Start catF M S R E V Y I CCGCACCGCGGCCGCCACGGCCAGCAAGGGGTGAGGA ATGA GCCCGGAAGTCTACATC	2460
C D A V R T P I G R F G G S L A A V R A TGCGACGCCGTGCGCACGCCGATCGGCCGCTTCGGCGGTTTCGCTCGCGGCGGTGCGCGCC	2520
D D L A A V P V K A L V E R N P Q V D W GACGACCTGGCCGCGGTGCGGTCAGGCCCTGGTCGAGCGCAACCCGACGGTCGACTGG	2580
S Q L D E V Y L G C A N Q A G E D N R N AGCCAGCTGGACGAGGTCTACCTCGGCTGCGCCAACAGGCCGGCGAAGACAACCGCAAC	2640
V A R M A L L L A G L P D S V P G V T L GTCGCGCGCATGGCGCTGCTGCTGGCCGGCCTGCCGGACAGCGTGCCCGGCGTGACCCCTG	2700
N R L C A S G M D A V G T A F R A I A S AACCGCCTCTGTGCCTCGGGCATGGACGCCGTGGGCACGGCCTTCCGCGCCATCGCCAGC	2760
G E A E L V I A G G V E S M S R A P Y V GGCGAGGCCGAGCTGGTCATCGCCGGCGGCGTCGAGTCGATGTCCCGCGCGCCTTATGTC	2820
M G K A D S A F G R G Q K I E D T T I G ATGGGCAAGGCGGACAGCGCCTTCGGCCGTGGCCAGAAGATCGAGGACACCACCATCGGC	2880
W R F I N P L M K A Q Y G V D A M P E T TGGCGCTTCATCAACCCGCTGATGAAGGCCAGTACGGCGTGACCCATGCCGAAACC	2940
A D N V A D D Y K V S R A D Q D A F A L GCCGACAACGTCGCCGACGACTACAAGGTCAGCCGCGCCGACAGGACGCCTTCGCCCTG	3000
R S Q Q L A G R A Q A A G Y F A E E I V CGCAGCCAGCAGCTGGCCGGGCGCGCCAGGCCCGGCTACTTCGCCGAGGAAATCGTC	3060
P V V I K G K K G E T V V D A D E H L R CCGGTGGTGATCAAGGGCAAGAAGGGTGAAACCGTGGTGATGCCGACGAGCATCTGCGC	3120
P D T T L E A L A K L K P V N G P D K T CCGGACACCACCTCGAAGCCCTGGCCAAACTCAAACCGGTCAACGGCCCGGACAAGACC	3180
V T A G N A S G V N D G S V A L I L A S GTCACCGCCGGCAACGCCTCGGGTGTAACGACGGCTCGGTGGCGCTGATCCTGGCCCTCC	3240
A E A V K K H G L K A R A K V L G M A S GCCGAAGCGGTGAAAAAGCACGGCCTGAAAGCTCGCGGAAAGTGCTGGGCATGGCCAGC	3300
A G V A P R V M G I G P V P A V R K L L GCCGGCGTCGCGCCGCGGTGATGGGCATCGGCCCGGTGCCGGCCGTGCGCAAGCTGCTG	3360

Fortsetzung

Fortsetzung Abb. 44

E R L N L S V A D F D V I E L N E A F A GAAGCCTGAACCTGTCGGTTCGCCGACTTCGACGTCATCGAACTGAACGAAGCCTTCGCT	3420
A Q G L A V T R E L G I A D D D A R V N GCCCAGGGCCTGGCCGTGACCCGCGAACTGGGTATCGCCGACGACGACGCCCGGGTGAAC	3480
P N G G A I A L G H P L G A S G A R L V CCGAACGGCGGGCGCCATCGCCCTCGGCCACCCGCTGGGCGCCAGCGGCGCACGCTGGTC	3540
L T A V H Q L E K S G G Q R G L C T M C CTGACCGCCGTGCACCAGTTGGAGAAGAGCGGCGGCCAGCGCGCCTGTGCACCATGTGC	3600
V G V G Q G V A L A V E R V * Stopp catE GTGGGCGTGGGGCAGGGCGTGGCCCTGGCTGTGAGCGCGTT TGAGGCTGTTT GCTGGGT	3660
TCCGGTCCGAATGAGCGCCGATATTGAATGTGTCATCCCCGCGAACGCGGGGACCCAGAA	3720
AAAGCAATAATCCGGCGCCCGCCTTCGAGCGGGCGCCGTTTCATGATCAACGGGAGTTCC	3780
Start catD	
M P T V K L A D G E L N Y L L E G P A G GATG CCTACCGTCAAACCTCGCCGACGGCGAACTGAACTACCTCCTCGAAGGCCCCCGCG	3840
A P V L V L S N S L G T D L H M W D A Q CGCGCCTGTGCTGGTGTGTCCAACCTCGCTGGGCACCGACCTGCATATGTGGGACGCGCA	3900
V P A F T Q H F Q V L R Y D T R G H G A GGTTCCGGCCTTCACCCAACACTTCCAGGTGCTGCGCTACGACACCCGCGGCCACGGTGC	3960
S L V T E G P Y S I E Q N G R D V L A L CTCGCTGGTGACCGAAGGCCCTACAGCATCGAGCAGAATGGTCGCGACGTGCTGGCCTT	4020
L D A L D I A K A S F C G L S M G G L I GCTGGACGCGCTGGATATCGCCAAGGGCAGCTTCTGCGGCCTGTCCATGGGCGGCCTGAT	4080
G Q W L A I N A P E R I E R L V L C N T CGGCCAGTGGCTGGCGATCAACGCGCCCGAGCGCATCGAGCGTCTGGTGCTGTGCAACAC	4140
A K I G T P E V W N P R I D T V L A G G CGCCGCCAAGATCGGCACCCCGGAGGTCTGGAACCCGCGAATCGACACCGTGTGGCCGG	4200
L Q P M R D L R D A S I S R W F T P D F CGGTCTGCAGCCCATGCGCGACCTGCGCGACGCTCCATCTCGCGTTGGTTCACCCCCGA	4260
A A A E P G K V E P I V A M L A Q T S P TTTCGCCGCTGCCGAGCCGGGCAAGGTGCAACCCATCGTGGCCATGCTCGCGCAGACTTC	4320
Q G Y A A N C A A V R D A D F R E Q L G GCCGCAAGGTTACGCAGCCAACCTGCGCCCGCGTGCAGCGACGCCGACTTCCGCGAGCAACT	4380
A I L A P T L V V C G S G D P V T T T E GGGCGCCATTCTCGCGCCGACCCTGGTGGTCTGCGGCAGCGGCGACCCGGTGACCACCAC	4440
H G R F M Q E R I A G A E L V E F H A A CGAGCACGGCCGCTTCATGCAGGAACGCATCGCCGGCGCCGAGCTGGTGGAGTTCCACGC	4500

Fortsetzung

Fortsetzung Abb. 44

A H L S N V Q A G D A F S Q K V L G F L GGCGCACCTGTCTGAACGTGCAGGCGGGCGATGCGTTTCAGCCAGAAGGTGCTGGGCTTCCT	4560
R G * Stopp catD GCGCGGC TGA GACATCGGCTAGACGGCGTACTACCGGAACGGTTGTACGCCCCACGGCT	4620
ACAGGCTTTTTCGTAGGAGCGAGCTTGCTCGCGAACCGCTTCGGCACACAGCCCGTTTCGCG	4680
AGCAAGCTCGCTCCTACAGGTAGGG Stopp ORF6 TCA CGTCCGCAGCGCTTCCAAGTCCCGGTACAGCT	4740
CCAGCGCTTCTGGGTTGGCCAGCGCATCGGTGTTTCTTACCGGGCGGCCGTGGATCACGT	4800
TGCGCACCGCCAGTTCGACGATCTTGCCGCTGATGGTGC GCGGGATGTCGGCCACCGCGA	4860
GGATCTTCGCCGGGACGTGGCGCGGCGTGGTGTGCTGCGGATGGTCTGGCGGATGCGT	4920
CACACAGGGTCTCGTCCAGCGGATGCCTTCGCGCAGGCGCACGAACAGCACCACGCGCA	4980
CGTCGCCTTGCCAGTCTTGCCGATGGCGATGGACTCCAGCACCTCGTCGACTTTTTTCCA	5040
CCTGGCGGTAGATTTCCGCCGTGCCGATGCGCACGCCGCCGGGGTTGAGCACCGCGTCGG	5100
AGCGGCCGTGGATGATCAGCCCGCCGTGTTCCGGTTTCTCGGCGTAGTCGCCGTGGGCCC	5160
AGACGCCGGGAAGGTGGCGAAGTAGGCGTCTGGAATTTCTCGCCGCTGGCGTCATTCC	5220
AGAAGCCCACCGGCATCGACGGGAAGTGCTTCACGCAGACCAGCTCGCCTTTCTCGCCGT	5280
GCACCGGCTGGCCGGCGTTCGTTCCAGACCTCCACCGCCATGCCCAGGCCCTTGCACTGCA	5340
GTTCCGCCGCGCCATAACCGGGCGGCCGGGTCGCCGAGGGCGAAGCAGGAGACGATGTCGG	5400
TGCCGCCGGAGATCGACGACAGGCAGACCTCGGGTTTGAAGTCGCGGTAGACGTAATCGA	5460
AGCTCTCGTGGGCCAGCGGCGAGCCGGTTCGAGAGGATGGTCTTCAGGCGCTCCAGGTCGT	5520
GGGTATGGCGCGGGCGTACGTTGGCTTTTTTCCAGGGCCGCGATGTACTTGGCGCTGGTGC	5580
CGAAGACGCTGATGTTCTCGGCGTCGATCAGGTCGACCAGGCGCTCGGGGCCTGGGTGGA	5640
AGGGCGAGCCGTCTAGAGCACCAGGGTGGCGCCGACCAGCAGGCCGGAGACCAGCCAGT	5700
TCCACATCATCCAGCCGCAGGTGGTGTAGTAGAACAGCGTGTCTCGCGCCGAGGTCGG	5760
TGTGCAACGCGTGTTCCTTGTAGTGCTGCAGCAACAGCCCGCCGGCGCCGTGGACGATGC	5820
ACTTGGGCACGCCGTTGGTGCCGGAGGAGTAGAGGATGTACAGCGGATGGGCGAAGGGCA	5880
GCGGGGTG	

GJ31	AAGAAGCCCCTGCCAACCCAGACCCGAGCCCGCCAGCCGGTGCCACCCAAGCGCCCGGC	
SK1	-----	60
16-6A	-----	
GJ31	GCACTATTTGTGGGCGGTGCTGATGGCCCGTATCTACGAGGTGTTCCCGCTGCTGTGCC	
SK1	-----	120
16-6A	-----	
GJ31	CATCTGCGGGCGGGCAAATGCACATCATCGCCTTCATCACACACAGTGCCGATATCCGCCA	
SK1	-----G-----	180
16-6A	-----	
GJ31	AATACTGGAGCACATCGGGGTGGAGACGGAGCCCGCCGACATCACCCCGGCACGCGGGCC	
SK1	-----	240
16-6A	-----	
GJ31	GCCACTGTGGGACGAGTGCGACGCGCAAGCCGAGAGGGCGTGAGCCAGCCCCAGACTG	
SK1	-----	300
16-6A	-----	
GJ31	GGATGAAGCGACCCAACCGGCCCCGGAAGTTCGAGGTCGATCAGCGCGTCAGTTGGTAGGG	Stopp ORF1
SK1	-----	360
16-6A	-----	
GJ31	TGGCAACAGCGGTTAACAGTGGTTTTGCCAACGTTGCGAGGCAGCGCTGCGCCTGTCACC	
SK1	-----	420
16-6A	-----A-----	
GJ31	GCCAAAACGGGTCATACCGAAAAATCTCGGGCAACTGGCTTTGAGAAATCAACCCAGCA	
SK1	-----	480
16-6A	-----	
GJ31	GTCCCCTGTGTGCATGCCTGAGACGCCCCAAACGTGTGCTATACTTGTGCTCATGCGGTT	
SK1	-----	540
16-6A	-----	
GJ31	GGATTTCCCTATCCTCAGTTGTTTCGTGGATCTGATGTTGCCAAAACCTGCTTTTGACGATT	
SK1	-----	600
16-6A	-----	
GJ31	TTTGCCTCGAAACAGGTGCAGTTGTTGAGTGATTGAGTCCGTTTCGTCGTTTTTTTAAA	
SK1	-----	660
16-6A	-----	
GJ31	AAGGATATTTTCTATGTCAGTCGATCTTCATGCCCGTGAAATAAAGCCCCTGCGCAATAC	
SK1	-----	720
16-6A	-----	

Fortsetzung

Abb. 45: Sequenzvergleich der Chlorocatechol-2,3-Dioxygenasen und Umgebung aus *Pseudomonas putida* GJ31, *Pseudomonas fluorescens* SK1 und *Pseudomonas veronii* 16-6A. Ein Bindestrich (-) bedeutet identisch ein identisches Nukleotid mit der Sequenz aus Stamm GJ31.

Fortsetzung Abb. 45

GJ31	CTTTTCGCATACAGCGAGCGGCACCTTCGCCGGTCACCAGGCCTACCTCTGCGGCCCGCC	
SK1	-----	780
16-6A	-----	
GJ31	CGTGATGATCGAAGCCTGCATCGCCACCCTGATGCAGGGACGCTTGTTTCGAGCGGGACAT	
SK1	-----	840
16-6A	-----	
GJ31	CTACACCGAGAAGTTCCCTCTCCGCAGCCGACACCAACCAGCAGCGCAGTCCCTCTGTTCAA	
SK1	-----	900
16-6A	-----C-----	
	Start <i>cbzT</i>	
GJ31	GCGGGTTTGAAGGGGAATAAGCATGTTCTTCGACACCCGCCCAAGGTCAGCGTGCATGT	
SK1	-----	960
16-6A	-----	
GJ31	CATGCAAACCGGTGAAACCTTTCCTGCGCCACGGATGAGAGTCTGCTGCAAGGCATGCT	
SK1	-----	1020
16-6A	-----	
GJ31	GCGCCTGGGCCGCAAGGGCATCCCGGTGGGCTGCGTCAACGGCGGCTGTGGGGTCTGCAA	
SK1	-----	1080
16-6A	-----C-----	
GJ31	GGTCCATGTTATTGAGGGTCAATGCCGGCCTCTGGGTCTGTTAGCCGCGCATGTCAG	
SK1	-----	1140
16-6A	-----	
GJ31	TGCCGAGAGGAAGCACGCGGCTTACCCTGGCCTGCCGTGTGGCGCCGGTCACCCCGGT	
SK1	-----	1200
16-6A	-----	
GJ31	TCAACTGGAGGTGGTGGGCAAGTTTAAAAGGTTTTTTTCAAAGGGTTCGTTTCATCAAC	
SK1	-----	1260
16-6A	-----	
	Stopp <i>cbzT</i> Start <i>cbzE</i>	
GJ31	GAACGAGATTATTAACAAATGAGAGGAGACACACATGAGTATTATGAGAGTTGGCCACGTC	
SK1	-----	1320
16-6A	-----	
GJ31	AGCATCAACGTGATGGACATGGCCGAGCAGTGAAGCACTACGAAAACGTGCTGGGCCTA	
SK1	-----	1380
16-6A	-----	
16-6A	AAGACGACCATGCAGGACAATGCCGGGAACGTGTACCTGAAATGTTGGGACGAGTGGGAT	
SK1	-----	1440
GJ31	-----	
GJ31	AAATATTCCTTATCCTCACCCCATCGGACAGGGCTGGAATGAACCACGTGCCTACAAG	
SK1	-----	1500
16-6A	-----	

Fortsetzung

Fortsetzung Abb. 45

GJ31	GTTACCAAAGACAGTGATCTGGACGCCTTCCAAGCTAGGATTGAAGCCGCTGGCACCAAG	
SK1	-----	1560
16-6A	-----	
GJ31	ACCACCATGATGCCCCGATGGCACGCTGCCATCCACGGGGCGCATGCTGGTGTTTAAATTG	
SK1	-----G-----	1620
16-6A	-----G-----	
SK1	CCAAGCACGCACGAAATGCGTCTTTACGCCATGAAAGAAAACGTCGGCACCGAGGTGGGT	
GJ31	-----	1680
16-6A	-----	
GJ31	AGCATCAATCCCGATCCGTGGCCAGACAGCATCAAGGGTGCCGGGGCGCACTGGTTGGAT	
SK1	-----	1740
16-6A	-----	
GJ31	CACGTACTACTGACGTGTGAGTTCGATCCGGGCACTGGTGTCAATAGGGTGGCCGACAAC	
SK1	-----T-----	1800
16-6A	-----T-----	
GJ31	ACACGGTTCTTCATTGATGTGCTGGATTTTTTCCAGACCGAGCAATTGACCGTCGGCCCC	
SK1	-----	1860
16-6A	-----	
GJ31	GATGGCTCATTCCAGTCGGTATCGTTTCTGTCGTGCTCGAGCAAGCCGCATGACATTGCG	
SK1	-----C-----	1920
16-6A	-----C-----	
GJ31	TTTGCTGATGCGCCGACTCCCAGCCTGCACCATATTTTCGTATTTTCTGACTCGTGGCAC	
SK1	----T--G-----T-----	1980
16-6A	----T--G-----	
GJ31	GACATTCTCAAGGCGGGCGATGTCATGGCCAAGAACAAGGTACGTATTGATGCGTACCT	
SK1	-----	2040
16-6A	-----T-----	
GJ31	ACACGCCATGGCTTCACGCGCGGCCAGACGATCTATTTCTTCGACCCTAGCGGCAACCGC	
SK1	-----G-----	2100
16-6A	-----G-----	
GJ31	AATGAGACCTTTGCAGGACTGGGGTACCAGGCGCAGCGGGACCGCCCGGTGACGACTTGG	
SK1	-----	2160
16-6A	-----	
GJ31	ACCGAAGATCAAGCGGGTCGCGCAGTTTTCTTCCACACCGGCGAGATGGTGTGTCGTCTTC	
SK1	-----	2220
16-6A	-----	
GJ31	ATAGATGTGTACACA Stopp cbzE TGATCGATTGAATGACCAGTGGGGCCCCAAGTCTTGATTCA	
SK1	-C-----	2280
16-6A	-C-----	

Fortsetzung

Fortsetzung Abb. 45

		Start cbzX	
GJ31	GCTTGGGGCGCCTTTGTTTCAATAACGGATAACCACCCATGCAAAAAGACCATTTCACCGC		
SK1	-----		2340
16-6A	-----		
GJ31	AAGCCCCTAACCCGACTCACAGCATCGTTCGTGCCACGATTGACTGGCAGCCGCACACG		
SK1	-----		2400
16-6A	-----		
GJ31	AGGCAGTTGGTGCCGCAGTGCAGGCGGCGCAGGCCATGGGTATACGCGTCAACGTTCGCGG		
SK1	-----		2460
16-6A	-----		
GJ31	TGGTGGACGCTTCCGGTGTGCTGGCCGCCTTCTTGCGCATGCCGGGGCCCCGCTGCATT		
SK1	-----		2520
16-6A	-----		
GJ31	CGGTCGAAATCGCCATAGACAAAGCCTACACCGCAGTCAGTTTTGGCTTGGCGACCAGCC		
SK1	-----		2580
16-6A	-----		
GJ31	AGTGGCATGGGGCGTTGCAGCAGCATTTCAGTGGCCGTGCGCGAGGGCATTGTGTTGCGGC		
SK1	-----		2640
16-6A	-----		
GJ31	CCCCTTTGTGGCGTTTGGCGGCGGCTTGCCGGTGTGGAACCGACAGCGCATTGGCG		
SK1	-----		2700
16-6A	-----		
GJ31	GCATCGGCGTCTCCGGTGGCTCCGAGCAAGAGGATGAAAGCTGCGCCCGCGCCGGGTTGG		
SK1	-----		2760
16-6A	-----		
		Stopp cbzX	
GJ31	CCGCCCTGGGTTTGGCGGCATAACAGCACCCGCCCAATTACCACTTCAAGAGAGAGAAAA		
SK1	-----		2820
16-6A	-----		
		Start cbzG	
GJ31	ATGAAAGACATCAGGAACTTCATCAACGGTGAATACGTACCAATGTCAGCGGCAAGACC		
SK1	-----		2880
16-6A	-----		
GJ31	TACGAGAAGCGCAACCCGGTTGATAACAGCCTAATCGGCATGGTCCATGAAGCTGGTCAG		
SK1	-----		2940
16-6A	-----		
GJ31	CCCGAGGTGGATGCGGCGGTGGCCGCCGCGCGCGGCACTGAACGGGCCCTGGGGCAAG		
SK1	-----		3000
16-6A	-----		
GJ31	CTCTCGGTGGTTCGACCGSTGCGCCATGCTCGATGGTG		
SK1	-----C-----		
16-6A	-----C-----		

		Start <i>cbzJ</i>	
CF600	GACGAAA	ATG	GACAAGATTTTGGATCAACGAGCTCGGCGACGAGCTGTACCAGGCAATGGT
SK1	---	CG-C	-----C-----AA-----C-----C---C-
16-6A	---	CG-C	-----C-----AA-----C-----C---C-
CF600	CAATCGCGAGGCGGT	CAGCCC	CTGACCGAGCGTGGCCTGGATATTTCCGTCGACGATGC
SK1	---	C	-----A-----T-C--C--CAG-----C--
16-6A	---	C	-----A-----T-C--C--CAG-----C--
CF600	CTACCACATCTCCCT	TGCGCAT	GCTCGAACGCCGACTGGCCGCCGGCGAGAAGGTGATCGG
SK1	-----	G	-----C-----A--C-----G-----A-C-----
16-6A	-----	G	-----C-----A--C-----G-----A-C-----
CF600	CAAGAAGATCGGT	TGCACC	AGCAAGGCAGTGCAGAACATGCTCAACGTACACCAGCCGGA
SK1	T-----	T--C--G	-----G-----A-----GGG---G-----
16-6A	-----	T--C--G	-----G-----A-----GGG---G-----
CF600	CTTCGGTTACCT	GACCGAC	CGCATGGTGTTC AACAGCGGCGAGGCGATGCCGATCAGCCA
SK1	-----	GC	-----A---G-----
16-6A	-----	GC	-----A---G-----
CF600	GTTGCTGATGCAG	CCCAAG	GCCGAGGGCGAGGTTGCCTTCATCCTCAAGAAGGACCTGAT
SK1	-CGA-----	A-C	-----T-----
16-6A	-CGA-----	A-C	-----T-----
CF600	CGGCCCCGGCGT	GACCAAC	GCCGACGTACTGGCCGCCACCGAGTGCGTGATGCCCTGTTT
SK1	-----		-----
16-6A	-----		-----
CF600	CGAGATCGTCGAT	TTCGCG	CATCCGCGACTGGAAAATCAAGATCCAGGACACCGTGCCGGA
SK1	-----		-----
16-6A	-----		-----
CF600	CAACGCCTCCT	TGTGG	CTTGTTTCGTGCTCGGCGACCAGGCGGTATCGCCGCGCCAGGTCGA
SK1	-----	C--C	-----
16-6A	-----	C--C	-----
CF600	CCTGGTCACCT	TGCGGC	ATGGTGGTGGAAAAGAACGGCCACATCATCAGCACCGGGGCCGG
SK1	-----		-----T--
16-6A	-----		-----
CF600	CGCCGCGGCGCT	CGGTT	CGCCGGTCAACTGCGTGGCCTGGCTGGCCAACACCCTGGGCCC
SK1	---	T	-----
16-6A	---	T	-----
CF600	TTTCGGCATCG	CGCTG	AAAGCCGGCGAGGTGATCCTGTCCGGCTCGCTGGTGCCGTTGGA
SK1	-----	C	-----
16-6A	-----	C	-----
CF600	GCCGGTCAAGG	CCGGCG	ACGTGATGCGCGTGCACATCGGCGGTATCGGCAGCGCCTCCGT
SK1	-----	G	-----
16-6A	-----	G	-----

Fortsetzung

Abb. 46: Sequenzvergleich von 2.9 bp-Fragmenten aus *P. putida* CF600, *P. fluorescens* SK1 und *P. veronii* 16-6A mit den Genen der 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratasen, Acetaldehyd-Dehydrogenasen (acylierend) und 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolasen. Ein Bindestrich (-) bedeutet identisch ein identisches Nukleotid mit der Sequenz aus Stamm CF600.

Fortsetzung Abb. 46

	Stopp cbzJ	Start cbzQ	
CF600	GCGCTTCACCTAAATTGGAGGCTTGCAGATGAACCAGAAACTCAAAGTCGCGATCATCGG		
SK1	-----G-----		840
16-6A	-----G-----		
CF600	TTCGGGCAATATCGGCACCGACCTGATGATCAAGGTGCTGCGCAACGCCAAGTACCTGGA		
SK1	-C-----		900
16-6A	-C-----		
CF600	AATGGGCGCCATGGTCGGCATCGACCCGCTCCGACGGCTGGCCCCGCGCCAGCGCAT		
SK1	-----T-----T-----		960
16-6A	-----T-----T-----		
CF600	GGGCGTGACGACCACCTATGCCGGCGTGAAGGGCTGATCAAGCTGCCCCGAATTCGCCGA		
SK1	-----G-----C-----C-----		1020
16-6A	-----G-----C-----C-----		
CF600	CATCGATTTTCGTCTTCGACGCCACCTCGGCCAGTGCCACGTGCAGAACGAGGCGCTGCT		
SK1	-----		1080
16-6A	-----		
CF600	GCGCCAGGCCAAACCTGGCATCCGCCTGATCGACCTGACCCCGCGGCCATCGGCCCGTA		
SK1	-----G-----C--		1140
16-6A	-----G-----C--		
CF600	CTGCGTGCCGGTGGTCAATCTGGAGGAGCACCTCGGCAAGCTCAACGTCAACATGGTTAC		
SK1	T-----C-----A-----C--		1200
16-6A	T-----C-----A-----C--		
CF600	CTGCGGCGGCCAGGCGACCATCCCGATGGTCGCCGCGGTCTCCCGTGTGGCCAAGGTCCA		
SK1	-----T-----C-----		1260
16-6A	-----T-----C-----		
CF600	TTACGCCGAGATCGTCGCCTCGATCAGCAGCAAGTCGGCCGGACCCGGCACCCGCGCCAA		
SK1	-----T-----		1320
16-6A	-----T-----		
CF600	CATCGACGAGTTCACCGAGACCACCAGCAAAGCCATCGAAGTGATCGGTGGTGCGGCCAA		
SK1	-----C-----		1380
16-6A	-----C-----		
CF600	GGGCAAGGCGATCATCATCATGAACCCGGCTGAGCCGCCGCTGATCATGCGCGACACCGT		
SK1	-----		1440
16-6A	-----		
CF600	GTATGTGCTGTCCGCCGCCCGATCAGGCCCGCTCGCGGCCCTCGGTGGCGGAAATGGT		
SK1	-----A-----		1500
16-6A	-----A-----		
CF600	TCAGGCGGTGCAGGCCTACGTGCCCGGCTATCGCCTGAAGCAGCAGGTGCAGTTCGACGT		
SK1	-----		1560
16-6A	-----		

Fortsetzung

Fortsetzung Abb. 46

CF600	GATCCCCGAGTCCGCGCCGCTGAACATCCCCGGTCTCGGCCGGTTCAGCGGGTTGAAGAC	
SK1	-----C-----	1620
16-6A	-----C-----	
CF600	CTCGGTGTTCTCTGAAGTCGAAGGCGCCGCCATTACCTGCCGGCCTACGCCGGCAACCT	
SK1	-----G-----	1680
16-6A	-----A-----	
CF600	CGACATCATGACCTCCGCCGCGCTGGCTACCGCCGAGCGTATGGCGCAGTCGATGTTGAA	
SK1	-----	1740
16-6A	-----	
CF600	CGCCTGAGGAGCTGCACCATGACGTTCAATCCGAGCAAGAACTCTATATCTCCGACGTA	
SK1	-----G-----	1800
16-6A	-----A-----	
CF600	ACCCTGCGTGACGGCAGCCATGCCATTCGCCACCAGTACACCCTGGACGACGTACGTGCC	
SK1	-----	1860
16-6A	-----	
CF600	ATCGCCCGTGCGCTGGACAAGGCGAAAAGTCGACAGCATCGAAGTCGCTCACGGCGATGGT	
SK1	-----	1920
16-6A	-----C-----	
CF600	TTGCAGGGCTCGTCTTTCAACTATGGCTTCGGACGGCACACTGACCTGGAGTACATCGAG	
SK1	-----	1980
16-6A	-----	
CF600	GCGGTGGCCGGTGAGATCAGCCACGCCAAATTGCCACCTTGCTGCTGCCGGGGATCGGC	
SK1	-----A-----	2040
16-6A	-----	
CF600	AGCGTGCATGACCTGAAGAACGCCTATCAGGCTGGCGCCCGAGTGGTGCCTGTCGCCACC	
SK1	-----C-----	2100
16-6A	-----	
CF600	CATTGCACCGAAGCCGACGTCTCGAAGCAGCACATCGAGTACGCCCGCAACCTTGGCATG	
SK1	-----	2160
16-6A	-----	
CF600	GATACCGTCGGCTTCTGATGATGAGCCACATGATCCCGGCCGAGAACTGGCCGAGCAA	
SK1	-----	2220
16-6A	-----	
CF600	GGCAAGTTGATGGAGAGCTACGGCGCCACCTGCATCTACATGGCCGACTCCGGTGGGGCG	
SK1	-----	2280
16-6A	-----	
CF600	ATGAGCATGAACGACATTCGTGATCGCATGCGCGCGTTCAAGGCCGTGCTCAAGCCCGAA	
SK1	-----	2340
16-6A	-----	

Fortsetzung

Fortsetzung Abb. 46

CF600	ACGCAGGTCGGTATGCACGCGCACCAACCTCAGCCTTGGCGTAGCCAACCTCTATTGTT	
SK1	-----	2400
16-6A	-----	
CF600	GCCGTGGAAGAAGGCTGCGACCGTGTGACGCCAGCCTGGCCGGCATGGGCGCCGGTGCC	
SK1	-----	2460
16-6A	-----	
CF600	GGCAACGCACCCTGGAAGTGTTCATCGCCGTTGCAGAACGGTTGGGCTGGAACCATGGC	
SK1	-----	2520
16-6A	-----	
CF600	ACCGACCTCTACACCCTGATGGATGCCGCCGACGACATCGTCCGCCCGTTGCAGGATCGC	
SK1	-----	2580
16-6A	-----	
CF600	CCGGTGC GGTCGACCGCGAGACCCTCGGCCTCGGATATGCCGGTGTCTATTCCAGCTTC	
SK1	-----	2640
16-6A	-----	
CF600	CTGCGTCACGCCGAGATCGCGGCCGCAAATACAACCTGAAAACCCTCGACATTCTCGTC	
SK1	-----	2700
16-6A	-----	
CF600	GAACTGGGACACCGGCGCATGGTCGGCGGCCAGGAAGACATGATCGTGGACGTCGCCCTC	
SK1	-----	2760
16-6A	-----	
CF600	GACCTGTTGGCGGCCCAAGGAGAACCGCGCATGGAACCGC	
SK1	-----	
16-6A	-----	