Konstruktion und Durchmusterung von Metagenombanken: Identifizierung und Charakterisierung von Genen und Genprodukten von am Polyol-Stoffwechsel beteiligten Oxidoreduktasen und Coenzym B_{12}-abhängigen Dehydratasen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Anja Knietsch

aus Salzgitter

Göttingen, 2002

Diese Arbeit wurde in Teilen zur Veröffentlichung eingereicht:

Knietsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., Henne, A., Daniel, R. (2002). The metagenomes of complex micribial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. (Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology; im Druck)

Knietsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., Henne, A., Daniel, R. (2002). Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli.* (Applied and Environmental Microbiology, akzeptiert)

D7

Referent:	Prof. Dr. G. Gottschalk
Korreferent:	Prof. Dr. B. Bowien
Tag der mündlichen Prüfung:	28.01.2003

Meiner Mutter, Beate, Michael

und dem Andenken

an meinen Vater gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis VII

1 EINLEITUNG 1

2 MATERIAL UND METHODEN 8

2.1 Verwendete Organismen, Plasmide und Oligonukleotide 8

2.2 Nährmedien 11
2.2.1 LB-Medium 11
2.2.2 DYT-Medium 11
2.2.3 SOB-Medium 11
2.2.4 M9-Mineralmedium 12
2.2.5 Carbonyl-Indikator-Medium 12
2.2.6 *Citrobacter*-Mineralmedium mit Hefeextraktzusatz 13
2.2.7 Spurenelementelösung SL-4 13
2.2.8 Spurenelementelösung SL-9 14
2.2.9 Vitaminlösung 14
2.2.10 Antibiotika und andere Medienzusätze 15

2.3 Zellanzucht 15
2.3.1 Aerobe Anzucht 15
2.3.2 Anaerobe Anzucht 15
2.3.3 Stammhaltung 16
2.3.4 Anzucht von rekombinanten *E. coli*-Stämmen zur heterologen Genexpression 16
2.3.4.1 Expression mit dem „pET Directional TOPO-Expression“-Kit 16

2.4 Bestimmung von Wachstumsparametern 19
2.4.1 Bestimmung der optischen Dichte 19
2.4.2 Bestimmung des pH-Wertes 19

2.5 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren 19
2.5.1 Behandlung von Geräten und Lösungen 19
2.5.2 Puffer und Lösungen 20
2.5.3 Fällung, Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren 20
2.5.3.1 Fällung von Nukleinsäuren 20
2.5.3.2 DNA-Fällung nach Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation 21
2.5.3.3 Mikrodialyse von DNA 21
2.5.3.4 Dialyse von Umwelt-DNA 21
2.5.3.5 Gelfiltration von DNA-Lösungen 22
2.5.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 22

2.5.3.7	Isolierung von DNA-Fragmenten mittels „QIAquick Gel Extraction“-Kit	22
2.5.3.8	Reinigung von DNA-Fragmenten mittels „QIAquick PCR Purification“-Kit	23
2.6	**Isolierung von Nukleinsäuren**	**23**
2.6.1	Isolierung von DNA aus Umweltproben	23
2.6.2	Reinigung von Umwelt-DNA	24
2.6.3	Isolierung von RNA aus Umweltproben	25
2.6.4	Reinigung von Poly(A)-RNA aus Gesamt-RNA	26
2.6.5	Isolierung von chromosomaler DNA	27
2.6.6	Isolierung von Plasmid-DNA	28
2.6.6.1	„Cracking“ von Plasmiden	28
2.6.6.2	Plasmidschnellpräparation	28
2.6.6.3	Minipräparation von Plasmiden mittels „Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System“	29
2.6.6.4	Minipräparation von Plasmiden mittels „QIAprep Spin Miniprep“-Kit	30
2.6.6.5	Präparative Plasmidisolierung über Anionenaustauschchromato-graphie	30
2.7	**Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**	**31**
2.7.1	Standard-Agarose-Gelelektrophorese	31
2.7.2	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.8	**Enzymatische Modifikation von DNA**	**32**
2.8.1	Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen	32
2.8.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	32
2.8.3	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.8.3.1	Ligation mit T4-DNA-Ligase	33
2.8.3.2	Ligation mit dem „TOPO-TA-Cloning“-Kit	33
2.8.4	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	34
2.9	**Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation**	**35**
2.10	**Übertragung von DNA in *E. coli* und Selektion rekombinanter Klone**	**36**
2.10.1	Hocheffiziente Transformation in *E. coli*	37
2.10.2	Transformation in *E. coli* durch Elektroporation	37
2.10.3	Transduktion	37
2.10.3.1	Transduktion mit dem „Gigapack II Gold Packaging Extract“	37
2.10.4	Der X-Gal-Test zur Selektion rekombinanter Klone	38
2.10.5	Screening auf die Verwertung von C2-C4-Polyolen	39
2.11	**DNA-DNA-Hybridisierung**	**40**
2.11.1	Vorbereitung von Nylonmembranen für Koloniehybridisierungen	40
2.11.2	Southern-Blot	41
2.11.3	Dot-Blot	41
2.11.4	Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Sonden	42
2.12	**Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**	**43**
2.12.1	Reaktionsbedingungen der „Megaprime“-PCR	44

2.13 Sequenzierung und Analyse von Sequenzdaten 45

2.14 Herstellung von Rohextrakten 46
2.14.1 Zellaufschluß mit der Frenchpresse 46
2.14.2 Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung 47

2.15 Proteinbestimmung 47

2.16 Bestimmung von Enzymaktivitäten 48
2.16.1 Glycerin-Dehydratase 49
2.16.1.1 Nach TORAYA et al. 49
2.16.1.2 Nach CHASE 49
2.16.2 Alkohol-Dehydrogenase 50

2.17 Methoden zur Proteinanreicherung 51
2.17.1 Metall-Chelat-Affinitätschromatographie 51
2.17.1.1 Vorbereitung der Säule 51
2.17.1.2 Reinigung löslicher Proteine unter nativen Bedingungen 52
2.17.1.3 Regeneration der Säule 52
2.17.2 Entsalzen von Proteinlösungen 53

2.18 Inaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen 53

2.19 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 53
2.19.1 SDS-PAGE 53
2.19.2 Native Gradienten-PAGE 55

2.20 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen 56
2.20.1 Coomassie-Färbung 56
2.20.2 Aktivitätsfärbung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen 57

2.21 Molekularmassenbestimmung 58
2.21.1 Molekularmassenbestimmung durch SDS-PAGE 58
2.21.2 Molekularmassenbestimmung durch Gradienten-PAGE 58

2.22 Chemikalien, Enzyme und Gase 59

3 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE 61

3.1 Konstruktion von Metagenombanken in *Escherichia coli* 62
3.1.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus verschiedenen Umweltproben 62
3.1.2 Klonierung der Umwelt-DNA 64
3.1.3 Charakterisierung der konstruierten Metagenombanken 67

3.2 Isolierung von RNA aus Umweltproben 68

3.3 Durchmusterung der Metagenombanken auf Gene für Glycerin- und Diol-Dehydratasen 71
3.3.1 Durchmusterung mittels eines auf Enzymaktivität basierenden Verfahrens 72
3.3.1.1 Stand der Vorarbeiten 72

3.3.1.2	Durchmusterung durch Komplementation des *E. coli*-Stammes ECL707/pAK1	73
3.3.2	Durchmusterung mittels auf Sequenzähnlichkeiten basierender Verfahren	75
3.3.3	Charakterisierung der identifizierten Glycerin- und Diol-Dehydratase-Gene und ihrer Genprodukte	80
3.3.3.1	Molekulare Analyse der Plasmide pAK2 bis pAK8	81
3.3.3.2	Komplementation der unvollständigen Dehydratase-Gene und Subklonierung in Expressionsvektoren	96
3.3.3.3	Heterologe Expression und Reinigung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen	99
3.3.3.4	Molekularmassenbestimmung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen durch Aktivitätsfärbung	102
3.3.3.5	Bestimmung der Substratspezifität der Glycerin- und Diol-Dehydratasen	103
3.3.3.6	Inaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen durch Glycerin	105
3.3.3.7	Reaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen durch den Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii*	108
3.3.3.8	Inaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen durch 1,3-Propandiol	112
3.4	**Durchmusterung der Metagenombanken auf Gene für Polyol-verwertende Oxidoreduktasen**	**114**
3.4.1	Prinzip der Durchmusterung auf Gene, die Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität vermitteln	115
3.4.2	Durchmusterung der Anreicherungsgenbanken SLA, GEA, ZRA und GIIA	117
3.4.2.1	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten *E. coli*-Stämme pAK101 bis 116	118
3.4.2.2	Molekulare Analyse der Plasmide pAK101 bis 116	121
3.4.3	Durchmusterung der nicht angereicherten Umweltgenbanken WN, FN und ZB	133
3.4.3.1	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten *E. coli*-Stämme pAK201 bis 215	135
3.4.3.2	Molekulare Analyse der Plasmide pAK201 bis 215	137
4.	**DISKUSSION**	**149**
4.1	**Konstruktion von Metagenombanken**	**149**
4.1.1	Isolierung und Reinigung von chromosomaler DNA aus Umweltproben	150
4.1.2	Klonierung der Umwelt-DNA	154
4.2	**Aktivitäts- und Sequenz-basierende Durchmusterungs-verfahren**	**158**
4.3	**Isolierung von RNA aus Bodenproben**	**164**

4.4 Identifizierung und Charakterisierung von Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen 166

4.5 Identifizierung und Charakterisierung von Alkohol-Oxidoreduktasen 177

4.6 Ausblick 184

5. ZUSAMMENFASSUNG 187

6. LITERATURVERZEICHNIS 190

7. ANHANG 206

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
Ap^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
β	Beta
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C.	*Citrobacter*
°C	Grad Celsius
Cl.	*Clostridium*
ca.	Circa
Ci	Curie
cm	Zentimeter
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CTAB	Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid
C-terminal	Carboxyterminal
Da	Dal ton
DDH	Diol-Dehydratase
dATP	Desoxyadenosin-5´-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5´-triphosphat
dest.	Destilliert
dGTP	Desoxyguanosin-5´-triphosphat
d.h.	das heisst
DH	Dehydrogenase
DHA	Dihydroxyaceton
Dht	Dehydratase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5´-triphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung
E.	*Escherichia*
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ed(s).	Herausgeber
et al.	et alteri (und andere)
Fa.	Firma
g	Gramm
xg	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
γ	Gamma
GDH	Glycerin-Dehydratase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GWDG	Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung Göttingen
h	Stunde
Hrsg.	Herausgeber
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
k	Kilo

K	Kalium
K.	*Klebsiella*
K_m	Michaelis-Menten Konstante
KP	Kaliumphosphat
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar (Mol pro Liter); Mega-
m	Meter
Mg	Magnesium
µ	Mikro-
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazon
min	Minute
N_2	Stickstoff
n	Nano-
NAD^+	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduziert
Nr.	Nummer
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-terminal	Aminoterminal
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
orf	offener Leserahmen
P.	*Pseudomonase*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
R_f	elektrophorethische Mobilität
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
s	Sekunde
s.	Siehe
SSC	Standard Saline-Citrat
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
sp.	*Species*
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Taq	*Thermus aquaticus*
TEMED	N, N, N´, N´-Trimethylethylendiamid
T_m	Schmelztemperatur
™	Trademark
Tricine	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxmethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivtät)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol.	Volumen

v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen
x g	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 EINLEITUNG

Die in unserer Umwelt vorkommenden Mikroorganismen zeigen eine erstaunliche Diversität an physiologischen, metabolischen und genetischen Eigenschaften. Ihr Substratspektrum entspricht dabei in seiner Gesamtheit der Vielfalt der natürlich vorkommenden Verbindungen und geht sehr wahrscheinlich noch darüber hinaus (GOTTSCHALK und KNACKMUSS, 1993). Verdeutlicht wird dies unter anderem dadurch, dass sich auf der Erdoberfläche oder in Gewässern keine natürliche organische Substanz auf Dauer anhäuft. Molekular-ökologische Studien an verschiedenen Ökosystemen belegten, dass mehr als 99 % der Mikroorganismen nicht bekannt sind (AMANN et al., 1995; PACE, 1997). Erst ca. 5000 prokaryotische Organismen wurden bisher beschrieben, Schätzungen gehen jedoch davon aus, dass die Gesamtzahl der prokaryotischen Arten zwischen 1.000.000 und 100.000.000 liegt (WILSON, 1992; STRICKBERGER, 1996). Im Vergleich dazu sind ca. 70.0000 Pilzarten und mehr als eine halbe Million Insektenspezies bekannt (BULL et al., 1992). Begründet ist diese Diskrepanz vor allem durch die Grenzen der Kultivierung und Vereinzelung von Mikroorganismen unter Laborbedingungen. Für die Forschung und letztlich auch für die Industrie bedeutet dies die Notwendigkeit zur Entwicklung alternativer Methoden und Strategien, um dieses enorme Potential zu analysieren und zu nutzen.

Einige der bisher kultivierten Mikroorganismen haben sich als reichhaltige Quellen für die Naturprodukt-Chemie erwiesen. Zu den wichtigsten Produkten gehören u.a. Antibiotika, Fungizide, Enzyme und Insektizide (RONDON et al., 1999). Geht man davon aus, dass weniger als 1 % der vorkommenden Mikroorganismen bekannt sind, so stellen diese natürlichen Habitate ein nahezu unerschöpfliches Reservoir an neuen Biokatalysatoren und anderen Wirkstoffen dar.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden neue Enzyme und Wirkstoffe vorwiegend durch groß angelegte Screeningverfahren nach Mikroorganismen mit den gewünschten Eigenschaften identifiziert. Nach erfolgreicher Anreicherung und Vereinzelung des Organismus wurde das gesuchte Enzym bzw. die entsprechenden Gene aus diesem isoliert. Dieses klassische Verfahren setzt jedoch die Kultivierbarkeit der Mikroorganismen voraus. Erst seit wenigen Jahren werden Verfahren entwickelt, die auf der Isolierung von DNA basieren, um die Biodiversität von Böden, Sedimenten und anderen natürlichen Habitaten in seiner Gesamtheit zugänglich zu machen und zu nutzen (SEOW et al., 1997; Handelsmann et al., 1998; COTTRELL et al., 1999;

HENNE et al., 1999; RONDON et al., 1999 und 2000). In diesem Zusammenhang wurde von RONDON et al. (2000) der Begriff des Metagenoms als Bezeichnung für die gesamte genetische Information aller Mikroorganismen eines Habitats geprägt. In einer Vielzahl von molekular-ökologischen Studien wurde die isolierte DNA genutzt, um universell konservierte Genmarker, zumeist die 16S rRNA-Gene, mittels PCR zu amplifizieren und phylogenetisch zu analysieren. So wurden z.B. aus einer Bodenprobe aus Darmstadt 300 verschiedene 16S-rDNA-tragende Klone untersucht. Die Sequenzierung der partiell-amplifizierten 16S-rRNA Gene und der Vergleich mit den in der Datenbank gespeicherten Sequenzen zeigte, dass keine davon identisch zu einer 16S-rDNA-Sequenz einer bis dahin kultivierten Spezies war. Die Klone konnten in 11 verschiedene Phyla (Hauptabstammungslinien) eingeordnet werden, von denen einige hauptsächlich oder sogar ausschließlich durch Umweltsequenzen repräsentiert wurden (SCHLEPER und ECK, 2000).

Ein weitergehender Ansatz ist die direkte Klonierung der aus Umweltproben isolierten genomischen DNA in Vektoren und ihre Durchmusterung auf das Vorhandensein von Genen für verschiedene biologisch aktive Substanzen und Enzyme (s. Abb. 1). Die ersten Arbeiten in denen die Konstruktion solcher Metagenombanken aus komplexen Habitaten und die Identifizierung neuartiger, funktioneller Genprodukte beschrieben werden konnte, wurden 1999 von HENNE et. al. und COTTRELL et al. publiziert. Bis heute konnte diese Strategie zur Isolierung von Genen für Enzyme verschiedener Klassen wie 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen, Chitinasen, Lipasen/Esterasen und Amylasen (COTTRELL et al., 1999; HENNE et al., 1999 und 2000; RONDON et al., 2000; RICHARDSON et al., 2002), sowie für Na^+/H^+-Antiporter (MAJERNIK et al., 2001), für die Synthese von Biotin (ENTCHEVA et al., 2001) oder auch für antibakterielle Wirkstoffe (RONDON et al., 2000; OSBURNE et al., 2000; BRADY et al., 2001) genutzt werden.

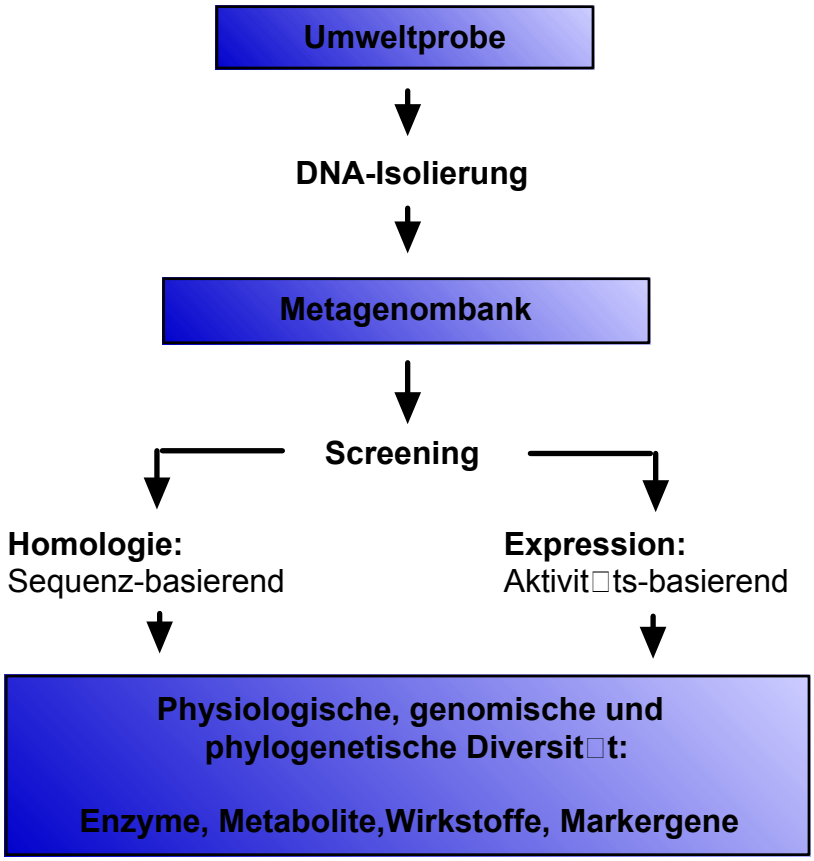


Abbildung 1: Strategie der Metagenomik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Umweltgenbanken konstruiert und als Quelle für die industriell interessanten Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen, sowie zur Identifizierung neuartiger Alkohol-Oxidoreduktasen verwendet.

Die bekannten Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und die isofunktionellen Diol-Dehydratasen (EC 4.1.2.30 bzw. EC 4.2.1.28) katalysieren die Umsetzung von Glycerin, 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol zu den entsprechenden Aldehyden (PAWELKIEWICZ und ZAGALAK, 1965; SMILEY und SEBOLOV, 1962). Sie sind die Schlüsselenzyme in der anaeroben Verwertung von Glycerin und 1,2-Propandiol und konnten bisher bei Vertretern der Enterobakterien, der Propionsäurebakterien, der Clostridien und der Milchsäurebakterien nachgewiesen werden. Durch ausführliche Untersuchungen der Glycerinfermentation und der daran beteiligten Enzyme in den Enterobakterien *Citrobacter freundii* und *Klebsiella pneumoniae* (SCHNEIDER et al., 1970; McGregor et al., 1974; FORAGE und FOSTER, 1979; JOHNSON et al., 1984;

JOHNSON und LIN, 1987; DANIEL et al., 1995b; SEYFRIED et al., 1996) konnte das in Abbildung 2 dargestellte Stoffwechselschema entwickelt werden. Das Substrat Glycerin unterliegt dabei einer Disproportionierung, an der als Schlüsselenzyme die Glycerin-Dehydrogenase, die Dihydroxyaceton-Kinase, die Glycerin- oder Diol-Dehydratase und die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase beteiligt sind (s. Abb. 2). Im oxidativen Zweig des Stoffwechselweges wird Glycerin unter Reduktion von NAD^+ zu Dihydroxyaceton oxidiert und anschließend phosphoryliert. Das entstehende Dihydroxyacetonphosphat kann dann in den Embden-Meyerhoff-Parnas-Weg eingeschleust werden. Der reduktive Zweig des Stoffwechsels beginnt mit der Dehydratisierung des Glycerins. Das entstehende β-Hydroxypropionaldehyd wird nachfolgend zu 1,3-Propandiol reduziert. Das Endprodukt der Fermentation, 1,3-Propandiol ist eine Substanz, die von großem wirtschaftlichen Interesse ist, da sie zur Herstellung von Polyestern, Polyurthanen, Heterozyklen und Pharmazeutika genutzt wird. Seit einigen Jahren wird die Verwendung von 1,3-Propandiol auch im Zusammenhang mit biologisch-abbaubaren Polymeren beschrieben (WITT et al., 1994). Da die Herstellung von 1,3-Propandiol auf chemischer Basis sehr kostenintensiv ist, haben die Firmen DuPont und Genencor International in den vergangenen Jahren einen biotechnologischen Produktionsprozeß entwickelt. Mit Hilfe eines rekombinanten *E. coli*-Stammes wird dabei das 1,3-Propandiol direkt aus dem preiswerten Rohstoff Glukose gewonnen (CHOTANI et al., 2000). Die Dehydratase stellt in diesem biotechnologischen Verfahren aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften einen limitierenden Faktor dar und ist deshalb das Objekt eingehender Untersuchungen.

Die bisher untersuchten Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen stellen eine sehr homogene, hoch konservierte Gruppe von Enzymen dar. Dies gilt für die genetische Organisation, sowie für die strukturellen und biochemischen Eigenschaften der Proteine. Beide Dehydratase-Typen bestehen aus 3 strukturellen Untereinheiten, die im nativen Zustand einen Komplex aus $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ bilden (DANIEL et al., 1998). Ein weiteres Charakteristikum ist die sogenannte „suicide-Inaktivierung“ bei der Katalysereaktion mit Glycerin. *In vivo* wird Glycerin-inaktivertes Enzym durch einen als Reaktivierungsfaktor bezeichneten Proteinkomplex reaktiviert. Für die Dehydratasen aus *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca* und *Citrobacter freundii* konnten die dafür kodierenden Gene und die korrespondierenden Genprodukte bereits identifiziert und charakterisiert werden (MORI et al., 1997, TORAYA und MORI, 1999; SEIFERT et al., 2001; KAJIURA et al., 2001).

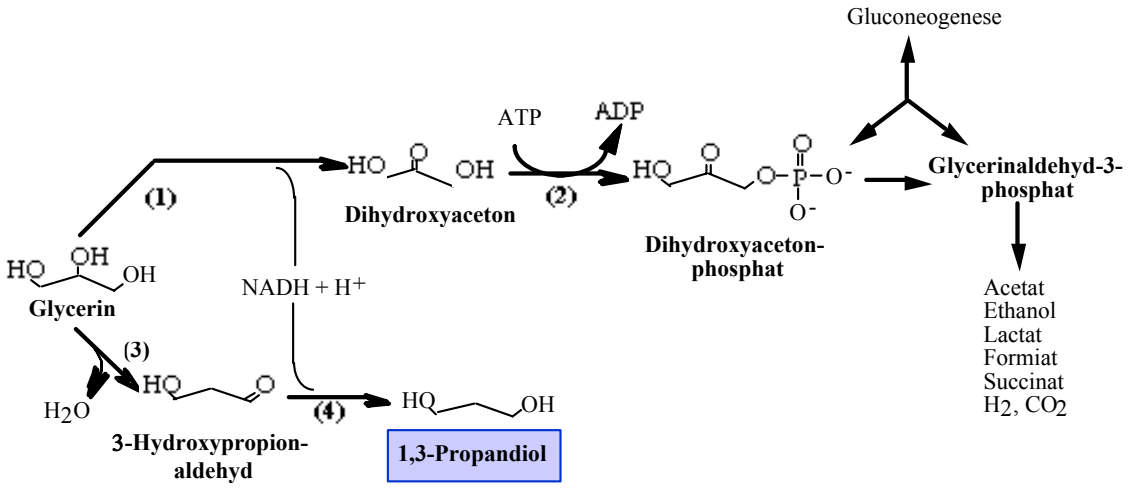


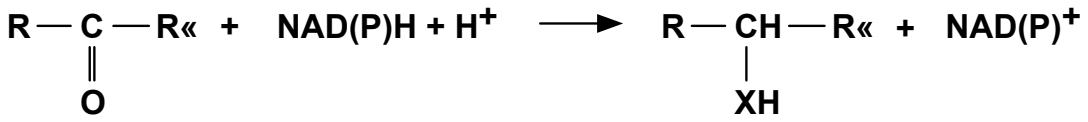
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glycerinfermentation in Enterobakterien
(1): Glycerin-Dehydrogenase; (2): Dihydroxyaceton-Kinase; (3): Glycerin- oder Diol-Dehydratase; (4): 1,3-Propandiol-Dehydrogenase.

Eine weitere Durchmusterung der Metagenombanken hatte Gene zum Ziel, die Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität in *E. coli* vermittelten. Die Umwandlung von Alkoholen, Aldehyden und Ketonen spielt in einer großen Anzahl von metabolischen Prozessen eine tragende Rolle. Diese Reaktionen werden durch Oxidoreduktasen katalysiert, zu denen auch die Alkohol-Dehydrogenasen zählen. Die bisher bekannten Alkohol-Oxidoreduktasen stellen im Vergleich zu den Glycerin- und Diol-Dehydratasen eine sehr heterogene Gruppe mit unterschiedlichen Kofaktor-Bedürfnissen dar. REID und FEWSON (1994) haben folgende Einteilung in drei Gruppen für diese Enzyme formuliert:

1. <u>$NAD(P)^+$-abhängige Dehydrogenasen</u>: Man unterscheidet langkettige, Zink-enthaltene Dehydrogenasen (Typ I, z.B. die Alkohol-DH I aus *Zymomonas mobilis*), kurzkettige und Zink-unabhängige Dehydrogenasen (Typ II, z.B. die Ribitol-DH aus *Enterobacter aerogenes*) und die Eisen-aktivierten Enzyme (Typ III, z.B. die 1,3-Propandiol-DH aus *C. freundii*). 2. <u>$NAP(P)^+$-unabhängige Dehydrogenasen</u>: Die Enzyme dieser Gruppe besitzen statt $NAD(P)^+$ andere Kofaktoren wie FAD, PQQ oder F_{420} (z.B. die Alkohol-DH aus *Acetobacter aceti*). 3. <u>Oxidasen:</u> Die Oxidasen katalysieren eine irreversible Oxidation von Alkoholen (z.B. die Alkohol-Oxidase 1 aus *Candida boidinii*).

Die Nikotinamid-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen sind dabei von besonderer biotechnologischer Relevanz. Diese Enzyme besitzen zumeist eine hohe

Enantioselektivität und werden in der Industrie für die Produktion von Carbonylverbindungen, Hydroxysäuren, Aminosäuren und chiralen Alkoholen eingesetzt, die chemisch nur schwer zu synthetisieren sind (REID und FEWSON, 1994; FANG et al., 1995; HUMMEL, 1997 und 1999). Abbildung 3 zeigt ein typisches Reaktionsschema zur Synthese von chiralen Verbindungen durch Dehydrogenasen. Weitere Anwendungsgebiete sind die Herstellung von Deuterium- oder Tritium-markierten Substanzen, die Produktion von Dihydroxyaceton und die enzymatische Analyse von Serumlipiden (YAMADA et al., 1982; FANG et al., 1995). Aufgrund der hohen Kosten für die Nikotinamid-Komponenten, ist für eine Anwendung der Alkohol-Dehydrogenasen im industriellen Maßstab eine Regeneration des Kofaktors durch effiziente Systeme notwendig. Häufig verwendete Systeme basieren auf der Glukose-6-Phophat-Dehydrogenase- oder der Formiat-Dehydrogenase-Reaktion (CHENAULT und WHITESIDES, 1987). Auf diese Weise können zum einen die Prozeßkosten gesenkt werden und zum anderen thermodynamisch ungünstige Reaktionsgleichgewichte in Richtung des gewünschten Produktes verschoben werden (FANG et al., 1995; HUMMEL, 1999).



Prochirales Keton **Chirales Produkt**

Abbildung 3: Reaktionsschema zur Bildung von chiralen Verbindungen durch NAD(P)H-abhängige Dehydrogenasen (nach HUMMEL, 1999)
Wenn das X für ein Sauerstoffatom steht, handelt es sich bei dem Produkt um einen Alkohol, steht es für NH, entsteht eine Aminosäure.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekularbiologische Analyse von komplexen, mikrobiellen Konsortien wie sie in natürlichen Habitaten wie Sediment- und Bodenproben vorhanden sind. Dazu gehörte die Konstruktion und Nutzung von komplexen Metagenombanken als Quelle für Gene und Genprodukte für den Einsatz in verschiedenen biotechnologischen Prozessen. Durch eine Kombination von Anreicherungstechniken und der direkten Isolierung von DNA aus Umweltproben wurden Genbanken erstellt und anschließend mit auf Enzymaktivität oder Sequenzähnlichkeiten basierenden Verfahren durchmustert. Ziel war die Identifizierung

von Genen für Coenzym B_{12}-abhängige Glycerin- und Diol-Dehydratasen sowie von Genen, die Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität mit kurzkettigen Polyolen vermitteln.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in Tabelle 1, die Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 1: Verwendete Organismen

Stamm	relevanter Geno- oder Phänotyp	Herkunft/Referenz
Citrobacter freundii	Wildtyp	DSM 30040
Klebsiella oxytoca	Wildtyp	DSM 4798
Escherichia coli ECL707	*F⁻ gld* :: ΔTn*10*, *glpK* :: ΔTn*10 ptsD* ::ΔTn*10*,*araD139*, *flbB* Δ(*lacU169*), *ptsF25*, *relA*, *rpsL*, *thi*	YANISCH-PERRON et al., 1985
Escherichia coli DH5α	*F⁻ endA1*, ϕ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)*U169*,*endA1*,*recA1*,*hsdR17*(r_K - m_K+), *deoR*, *thi-1*, *supE44*, λ-, *gryA96*, *relA1*	HANAHAN, 1983
Escherichia coli BL21(DE3)	F^- *ompT hsd*S_B (r_B-m_B-) , *gal dcm rne131* (DE3)	Invitrogen,Carlsbad, USA
Escherichia coli TOP10	F^- *mcrA* Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *deoR ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*	Invitrogen,Carlsbad, USA

Tabelle 2: Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	relevantes Merkmal	Herkunft/Referenz
pBluescript®SK+	Ap^r, *lacPOZ`*, pMB1-Replikon	Stratagene, San Diego, USA
pSTV28	Cml^r, *lacPOZ* α, p15A-Replikon	
pCR2.1-TOPO	Ap^r, Kan^r, pMB1-Replikon	Invitrogen, Carlsbad, USA
pET100/D-TOPO	Ap^r, His_6-tag N-terminal, Xpress-epitop	Invitrogen, Carlsbad, USA
pET101/D-TOPO	Ap^r His_6-tag C-terminal, V5-epitop-tag	Invitrogen, Carlsbad, USA
pRD1	Ap^r, *dhaK*, *dhaD*, *dhaR*, *orfW*, *orfX*, *dhaT*, *orfY*, *dhaB*, *dhaC*, *dhaE*, *orfZ*	DANIEL, 1994
pGEX2T/dhaB	Ap^r, *dhaB*	RÖSKENS, 1997
pFL1	Ap^r, *dhaT*, *orfY*, *orfW*, *orfX´*, *orfZ´*	LUERS, 1997
pLM3	Ap^r, *dhaB*, *dhaC*, *dhaE*	MACIS et al. , 1998
pMS2	Ap^r, *dhaB*, *dhaC*, *dhaE*, *orfZ*	SEYFRIED, 1996
pCS120	Ap^r, *dhaB*, *dhaC*, *dhaE*, (3`His_6-Tag)	SEIFERT, 2001
pCS111	Ap^r, *dhaFG (C. freundii),* (3`His_6-Tag)	SEIFERT, 2001
pCS211	Ap^r, *dhaFG (Cl. pasteurianum),* (3`His_6-Tag)	SEIFERT, 2001

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
alpha3	5´-GAYTTYGAYGAYTAYAAY-3`*
beta1	5´-YTTNGTYTCYTTDATRTG-3`*
pAK2-1	5´-CACCATGAGAAGATCAAAACGATTC-3´
pAK2-2A	5´-TTACTGGCTGCCTTTACGCAG-3´
pAK2-2B	5´-CTGGCTGCCTTTACGCAG-3´
pAK3-1	5‘-CGGTACCGAACTACGACAACATGTTTG-3‘
pAK3-2A	5‘-TCACTGACTGCCTTTACGCAG-3‘
pAK3-2B	5‘-CTGACTGCCTTTACGCAG-3‘
pAK4-1	5‘-TCCGGTTATTCCGCGGTGCCGAACTAC-3‘
pAK4-2	5‘-TCAAGGATGCGATCGTCT-3‘
pAK5-1	5‘-TGCTGCGCCAGATAATTGAAGACGTAC-3‘
pAK5-2A	5‘-TTAATCGTCACCTTTGACTTT-3‘
pAK5-2B	5‘-ATCGTCACCTTTGACTTT-3‘
pAK7-1	5´-CACCATGAGAAGATCAAAACGATTTG-3´
pAK7-2A	5´-TTACTGGCTGCCTTTACGCAG- 3´
pAK7-2B	5´-CTGGCTGCCTTTACGCAG- 3´
CF-1 (B1)	5´-CACCATGAGAAGATCAAAACGATTC-3‘
CF-2 (B2)	5‘-CAAACATGTTGTCGTAGTTCGGTACCG-3‘
ST/KO-1	5´-CACCATGAGATCGAAAAGATTTGA-3´
ST/KO-2	5´-TTAATCGTCGCCTTTGAGTTT -3´
ST-3 (α-Ende)	5‘-GTACGTCTTCAATTATCTGGCGCAGCA-3‘
KO-3 (α-Ende)	5‘-GTAGTTCGGCACGGCGGAATAACCGGA-3‘

* Y= C+T, N= A+C+T+G, D= A+T+G, R= A+G

Die Erkennungssequenz für die gerichtete Klonierung in die Expressionsvektoren pET100/D-TOPO bzw. pET101/D-TOPO ist unterstrichen.

2.2 Nährmedien

Alle aufgeführten Medien wurden durch 30-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Die C- Quellen für Mineralmedien wurden separat autoklaviert und erst unmittelbar vor dem Animpfen zugegeben. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugefügt.
Anaerobe Medien wurden nach der von COSTILOW (1981) beschriebenen Methode unter Begasung mit sauerstofffreiem Stickstoff hergestellt.

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

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	10	g
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml

2.2.2 DYT-Medium (SAMBROOK et al., 1989)

Trypton	16	g
Hefeextrakt	10	g
NaCl	5	g
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml

2.2.3 SOB-Medium (HANAHAN, 1983)

Trypton	20	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	0,58	g
KCl	0,18	g
$MgCl_2$	2,0	g
$MgSO_4$	2,5	g
$H_2O_{dest.}$	ad 980	ml

2.2.4 **M9-Mineralmedium** (MILLER, 1972; modifiziert)

KH_2PO_4	3,0	g
Na_2HPO_4	6,0	g
NH_4Cl	3,0	g
NaCl	0,5	g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,05	g
$CaCl_2$ x 12 H_2O	0,002	g
$FeSO_4$	0,02	g
Hefeextrakt	0,2	g
SL-4	1	ml
Vitaminlösung nach Wolin	1	ml
pH-Wert einstellen auf	7,4	

Dem Medium wurde Glycerin, 1,2 Propandiol, 2,3-Butandiol oder Ethylenglykol in einer Endkonzentration von 100 mM und Thiamin-HCl in einer Konzentration 10 mM zugesetzt.

2.2.5 **Carbonyl-Indikator-Medium** (CONWAY et al., 1987, modifiziert)

Um 1 l Indikatormedium zu erhalten, wurde 1 l LB-Medium (s. 2.2.1) hergestellt, autoklaviert und auf ca. 45 °C abgekühlt. Zugefügt wurden:

Pararosanilin	20	mg
$Na_2S_2O_5$	100	mg

Pararosanilin und Natriumbisulfit wurden vor der Zugabe im Dunkeln in 20 bis 30 ml H_2O gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Als C-Quellen wurden dem Medium Glycerin, 1,2 Propandiol, 2,3-Butandiol oder Ethylenglykol in einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt.

2.2.6 *Citrobacter*-Mineralmedium mit Hefeextraktzusatz (AVERHOFF,1988; modifiziert)

KH_2PO_4	6,0	g
K_2HPO_4	14,0	g
$(NH_4)_2SO_4$	3,0	g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,2	g
$CoCl_2$ (50 mM)	85,0	µl
Hefeextrakt	1	%
SL-4	1,0	ml
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml
pH-Wert einstellen auf	7,5	
zusätzlich bei anaeroben Medien:		
Resazurin (0,1%)	1,0	ml
Cystein-HCl (200 g/l)	1,0	ml

Für die Anzucht von rekombinanten *E. coli*-Stämmen enthielt das Medium zusätzlich Thiamin-HCl (10 mM). Anschließend wurde das Medium für 25 min mit einem N_2/CO_2 Gasgemisch (80 %/20 %, (v/v)) durchgast, mit einem Butyl-Gummistopfen verschlossen und für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Als Reduktionsmittel diente eine Cystein-HCl-Lösung, die direkt vor dem Animpfen zugesetzt wurde.

2.2.7 Spurenelementelösung SL-4 (PFENNIG und LIPPERT, 1966)

Na_2-EDTA	5,0	g
$FeSO_4$ x 7 H_2O	2,0	g
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0,1	g
$MnCl_2$ x 4 H_2O	0,03	g
H_3BO_4	0,3	g
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,2	g
$CuCl_2$ x 2 H_2O	0,01	g
$NiCl_2$ x 6 H_2O	0,02	g
$NaMoO_4$ x 2 H_2O	0,03	g
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt und die Lösung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.2.8 **Spurenelementelösung SL-9** (TSCHECH und PFENNIG; 1984)

Titriplex	12,8	g
$FeCl_2$ x 4 H_2O	2,0	g
$CoCl_2$ x 6 H_2O	190	mg
$MgCl_2$ x 2 H_2O	100	mg
$ZnCl_2$	70	mg
H_3BO_3	6	mg
$NiCl_2$ x 6H_2O	24	mg
$CuCl_2$ x 2 H_2O	2	mg
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	36	mg
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml

2.2.9 **Vitaminlösung** (WOLIN et al., 1964, modifiziert)

Biotin	2	mg
Folsäure	2	mg
Pyridoxin x HCl	10	mg
Thiamin x HCl	15	mg
Riboflavin	5	mg
Nikotinsäure	5	mg
Ca-Pantothenat	5	mg
Vitamin B_{12}	10	µg
p-Aminobenzoesäure	5	mg
α-Liponsäure	1	mg
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml

2.2.10 Antibiotika und sonstige Medienzusätze

Für die Anzucht rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Medienzusätze verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Medienzusätze und Konzentrationen

Medienzusatz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	50 mg/ml 50 % Ethanol	50-100 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml Ethanol	25-50 µg/ml
Coenzym B_{12}	1 mg/ml $H_2O_{dest.}$	1 mg/l
IPTG	25 mg/ml $H_2O_{dest.}$	50 µg/ml
X-Gal	20 mg/ml Dimethylformamid	40 µg/ml

Die Stammlösung von Coenzym B_{12} wurde gegebenenfalls steril filtriert und für 20 min steril mit N_2 durchgast. Die IPTG-Stammlösung wurde ebenfalls steril filtriert. Die Zugabe der Komponenten erfolgte erst nach dem Abkühlen der autoklavierten Medien auf mindestens 60 °C. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.3 Zellanzucht

2.3.1 Aerobe Anzucht

Die aerobe Anzucht von *E. coli* erfolgte in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben. Das Kulturvolumen betrug ca. 20 % des Füllvolumens der Reagenzgläser bzw. Erlenmeyerkolben. Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 30 ° oder 37 °C inkubiert.

2.3.2 Anaerobe Anzucht

Anaerobe Kulturen wurden mit einem 1 bis 10 %igen (v/v) Inokulum aus einer Stammkultur (s. 2.3.3) oder aus einer aeroben oder anaeroben Vorkultur beimpft. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C. Für Kulturen mit einem Volumen bis zu 10 ml wurden Hungate-Röhrchen (Anaerobe Test Tubes, Hungate Type, 16 × 125 mm, Fa. Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey, USA) und für Anzuchten bis 50 ml 125-ml-Serumflaschen ("Hypovials", Fa. Pierce, Rockford, England) verwendet. Bei einem

Kulturvolumen von bis zu 500 ml fanden 1-l-Serumflaschen (Fa. Müller und Krempel AG, Bülach, Schweiz) Verwendung. Für das Überimpfen wurden sterile Einwegspritzen benutzt.

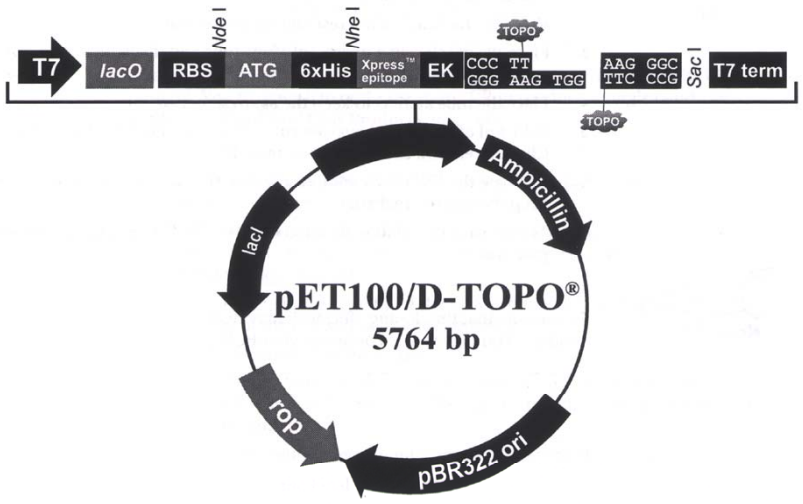
2.3.3 Stammhaltung

Agarplatten mit *E. coli* konnten maximal bis zu 8 Wochen bei 4 °C gelagert werden. Zur längerfristigen Konservierung wurden Stammkulturen angelegt. Dazu wurden diese bei 30 °C in LB-Medium (s. 2.2.1) angezogen. In der logarithmischen Wachstumsphase wurden dann 0,75 ml Zellsuspension entnommen, mit 0,25 ml Glycerin (87 %, (v/v)) versetzt und bei -70 °C gelagert.
Die Stammhaltung von *Ilyobacter polytrophus* erfolgte in 5 ml Mineralmedium (s. 2.2.7) bei 4 °C.

2.3.4 Anzucht von rekombinanten *E. coli*-Stämmen zur heterologen Genexpression

2.3.4.1 Expression mit dem „pET Directional TOPO® Expression"-Kit

Der „pET Directional TOPO® Expression"-Kit (Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA) nutzt die Klonierungsstrategie des „TOPO-Cloning" (s. Abb. 6 und detaillierte Erklärung des Grundprinzips unter 2.8.3.2), um blunt-end-PCR-Produkte gerichtet in einen „high-level"-Expressionsvektor zu klonieren. Außerdem besteht die Möglichkeit das Zielgen N- oder C-terminal mit einem Tag (u. a.His_6-Tag) zu versehen, der später eine einfache Detektion mit Antikörpern oder die Reinigung des gebildeten Proteins ermöglicht. Die physikalische Karten der verwendeten Vektoren pET100/D/*lacZ* und pET101/D/*lacZ* sind in Abbildung 4 dargestellt.



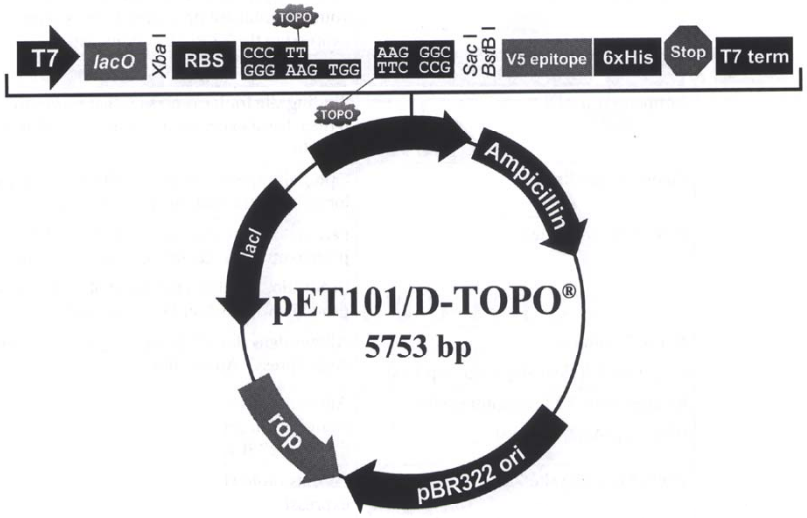


Abbildung 4: Physikalische Karten der Expressionsvektoren pET100/D/*lacZ* und pET101/D/*lacZ*.
lacO, lac-Operator; *lacI*, lac-Repressor; RBS, Ribosomenbindestelle; EK, Enterokinase-Erkennungsstelle; *rop*, erleichtert „low-copy"-Replikation in *E. coli*

Die gerichtete TOPO-Klonierung (s. Abb. 5) wurde durch das Anhängen einer spezifischen Sequenz (5´-CACC) an das durch PCR amplifizierte Zielgen erreicht, die komplementär (3´-GTGG) als Einzelstrang-Überhang auf dem Vektor vorhanden war.

Dieser Überhang drang in das 5´-Ende des PCR-Produkts ein und stabilisierte so die korrekte Orientierung des inserierten Gens.

Das pET-Expressionssystem machte sich die hohe Aktivität und Spezifität der T7-RNA-Polymerase zu Nutze. Dies ermöglichte ausgehend vom T7-Promotor eine regulierte Expression von heterologen Genen in *E. coli* (ROSENBERG et al., 1987; STUDIER und MOFFATT, 1986; STUDIER et al. 1990). Für die Expression wird der *E. coli*-Stamm BL21 Star™ (DE3) herangezogen. Dieser Stamm trägt den defekten, lysogenen Bakteriophagen DE3 des λ-Phagen, der folgende Elemente chromosomal codiert enthält:

- den Lac-Repressor *lac*I
- die T7-RNA-Polymerase-Gene unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors
- einen Teil des *lac*Z-Gens

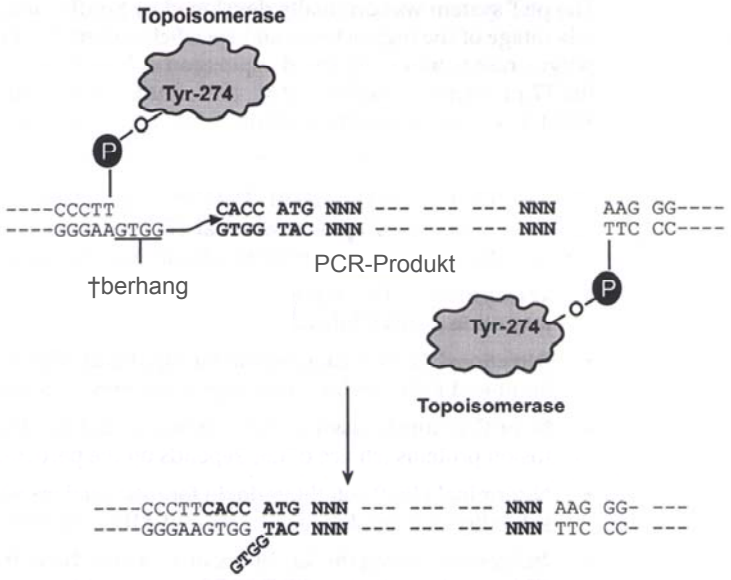


Abbildung 5: Schematische Darstellung der gerichteten TOPO-Klonierung.

Wenn dieser Vektor in einem DE3-lysogenen Stamm etabliert wurde, wirkte der gebildete *lac*-Repressor zum einen an dem *lacUV5*-Promotor im Wirtschromosom und reprimierte dort die Expression der T7-Polymerase und zum anderen am T7-Promotor des Vektors. Letzteres verhinderte die Expression der inserierten Gene. Die Expression der T7-RNA-Polymerase und der inserierten Gene ließ sich somit durch die Zugabe von IPTG induzieren.

2.4 Bestimmung von Wachstumsparametern

2.4.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte anhand von Trübungsmessungen bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen sterile Nährlösung in einem Spektralphotometer (UV-VIS Spektrophotometer V-550, Fa. Jasco, Jena) in Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Bei Zelldichten $E_{600} > 0,3$ wurden die Proben mit steriler Nährlösung entsprechend verdünnt. Die Messungen erfolgten gegen Medium als Leerwert.
Die OD von Hungate-Kulturen konnte direkt im Röhrchen mit Hilfe eines Photometers der Fa. Milton Roy (Spectronic 21, Rochester, New York, USA) bei 600 nm in einem Extinktionsbereich zwischen 0 und 2,0 verfolgt werden. Als Referenz dienten Röhrchen mit unbeimpftem Medium.

2.4.2 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde mit einem WTW pH-Meter pH 526 (Fa. WTW GmbH, Weilheim) mit einer Glas-Calomel-Elektrode (Fa. Cahn-Ingold, Frankfurt) bestimmt. Vor den Messungen wurde das Gerät für den entsprechenden Meßbereich mit Eichlösungen (pH 4,0 und pH 7,0 der Fa. Riedel de Haen AG, Hannover) geeicht.

2.5 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Lösungen und Geräte wurden zur Inaktivierung von Nukleasen für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und Metalloberflächen abgeflammt. Hitzelabile Biochemikalien wurden sterilfiltriert.

2.5.2 Puffer und Lösungen

Im folgenden sind die Zusammensetzungen einiger Puffer und Lösungen aufgeführt, die im nachfolgenden Text nicht näher erläutert werden. Die Herstellung niedrigerer Pufferkonzentrationen erfolgte durch Verdünnung des Puffers mit $H_2O_{dest.}$.

10 x TE-Puffer

1 M Tris-Puffer (pH 8,0)	100	ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	10	ml
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml

20 x SSC-Puffer

NaCl	175	g
$Na_3Citrat$	88	g
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml

50 x TAE-Puffer

Tris	242	g
Eisessig	57	ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100	ml
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml

2.5.3 Fällung, Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren

2.5.3.1 Fällung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte durch Fällung mit Ethanol oder Isopropanol. Durch Zugabe von 3 M Na-Acetat (pH 5,5) wurde, falls notwendig, die Ionenstärke erhöht (Endkonzentration 0,3 M). Zur Präzipitation der Nukleinsäuren erfolgte die Zugabe von 2 Vol. Ethanol (96 %) bzw. 1 Vol. Isopropanol (96 %). Die Ethanolfällung erfolgte durch Inkubation bei -70 °C für mindestens 20 min, bei Isopropanol wurde mindestens 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation (13000 bis 16000 x g, 4 °C oder RT, 30 min) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem Ethanol (70 %, v/v) gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen sterilem H_2O oder TE-Puffer aufgenommen.

2.5.3.2 DNA-Fällung nach Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Ziel dieser Fällung war die Abtrennung von Saccharose nach der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (s. 2.9). Dazu wurde jedes Aliquot aus dem Gradienten mit 0,5 Vol. PEG-NaCl-Lösung (20 % PEG 6000, 2,5 M NaCl) versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Lösungen (30 min, 22650 x g, RT). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 0,5 ml Ethanol (70 % (v/v), RT) versetzt und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen, das Pellet getrocknet und in 20 - 30 µl sterilem H_2O aufgenommen. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt, da bei Einsatz niedrigerer Temperaturen das Polyethylenglykol ausfällt.

2.5.3.3 Mikrodialyse von DNA

Um die Effizienz der Elektroporation (s. 2.10.2) zu erhöhen, wurden die Salze aus Ligationsansätzen durch eine Mikrodialyse entfernt. Die Dialyse wurde in einer kleinen Petrischale gegen steriles H_2O als Dialysepuffer durchgeführt. Zunächst wurden kleine Membranfilterscheiben (Porengröße 0,025 µm, Fa. Milipore, Eschborn) mit der glänzenden Seite nach oben auf die Wasseroberfläche gegeben. Dann wurden mit einer Pipette vorsichtig 5 bis 10 µl der Probe auf die Dialysemembran aufgetragen. Nach 30 min konnten die dialysierten Proben abgenommen werden.

2.5.3.4 Dialyse von Umwelt-DNA

Enthielt die aus den Standort-Proben isolierte DNA zu hohe Salzkonzentrationen, mußte sie vor einer weiteren Reinigung zunächst einer Dialyse unterzogen werden.
Zu diesem Zweck wurden 20 bis 30 cm lange Dialyseschlauchstücke in TE-Puffer autoklaviert. Anschließend wurde die DNA-Lösung in die Schläuche eingefüllt, die an beiden Enden mit Dialyseschlauch-Klammern verschlossen wurden. Die DNA-Lösung wurde dann 24 h gegen TE-Puffer dialysiert. Nach etwa 4 bis 5 h wurde der Puffer ausgewechselt. Anschließend erfolgte eine Fällung der DNA mit Ethanol (s. 2.5.3.1).

2.5.3.5 Gelfiltration von DNA-Lösungen

Die Abtrennung niedermolekularer Bestandteile, wie z.B. einzelner Nukleotide von DNA-Fragmenten, erfolgte durch eine Gelfiltration mit NAP-5-Säulen (Fa. Amersham Pharmacia LKB GmbH, Freiburg). Die Säulen wurden mit 10 ml $H_2O_{dest.}$ äquilibriert. Danach wurde 0,5 ml DNA-Lösung aufgetragen und mit 1,0 ml H_2O eluiert.

2.5.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wäßriger Lösung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.
Eine Extinktion von 1 entspricht etwa:

⇒ 50 µg/ml doppelsträngiger DNA,

⇒ 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder

⇒ 30 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide.

Die Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen konnte durch das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} bestimmt werden. Bei reinen DNA-Lösungen sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen (SAMBROOK et al., 1989), niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

2.5.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten mittels „QIAquick Gel Extraction“-Kit

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde der „QIAquick Gel Extraction“-Kit (Fa. Qiagen GmbH, Hilden) herangezogen. Die Methode beruht auf der Bindung der DNA an eine Silica-Membran in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen. Der Kit kann zur Extraktion von DNA-Fragmenten von einer Größe von 0,1 bis 10 kBp aus Agarosegelen in TAE-Puffer genutzt werden. Die Extraktion erfolgte nach den im Herstellerprotokoll beschriebenen Arbeitsschritten. Die DNA wurde mit $H_2O_{dest.}$ eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

2.5.3.8 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels „QIAquick PCR Purification“-Kit

Zur Reinigung von PCR-Produkten und anderen linearen DNA-Fragmenten wurde der „QIAquick PCR Purification“-Kit (Fa. Qiagen GmbH, Hilden) genutzt. Wie auch beim „QIAquick Gelextraction“-Kit (s. 2.5.3.7) wird die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silica-Membran gebunden. Die Reinigung wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte mit $H_2O_{dest.}$. Die so gereinigten PCR-Produkte wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

2.6 Isolierung von Nukleinsäuren

2.6.1 **Isolierung von DNA aus Umweltproben** (ZHOU et al., 1996)

Diese Methode der DNA-Isolierung aus Bodenproben beruht auf der direkten Lyse der Zellen, so daß sie vor dem Aufschluß nicht von den Bodenpartikeln abgetrennt werden müssen. Weiterhin wird so die zusätzlich im Boden frei vorliegende DNA erhalten.
Zur DNA-Isolierung wurden 50 g Boden mit 135 ml DNA-Extraktionspuffer (DEP) und 1 ml Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 37 °C horizontal geschüttelt (225 Upm). Nach der Zugabe von 15 ml 20 % SDS (oder 30 ml 10 %) wurde das Gemisch für 2 h bei 65 °C inkubiert und dabei alle 15 bis 20 min vorsichtig geschüttelt.
Zur Trennung der bereits gelösten DNA von der Bodenmatrix wurde anschließend zentrifugiert (10 min, 7000 Upm, Rotor GS3, Sorvall Zentrifuge, Fa. Du Pont Instruments, Newton, USA, RT) und der Überstand in einen GS3-Zentrifugenbecher überführt. Das Pellet wurde noch zweimal in je 45 ml DEP und 5 ml 20 % SDS suspendiert und nach einer 10-minütigen Inkubation bei 65 °C wie oben beschrieben zentrifugiert.
Zur Extraktion der DNA wurde den gesammelten Überständen 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt und für 10 min bei 7000 Upm (Rotor GS3, Sorvall Zentrifuge, Fa. Du Pont Instruments, Newton, USA) und RT zentrifugiert.
Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol für 1 h bei RT. Nach einer Zentrifugation bei 9000 Upm für 20 min bei RT wurde das Pellet mit eiskaltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen und in 4 bis 5 ml sterilem H_2O aufgenommen.

DNA-Extraktionspuffer (DEP)

Tris	100	mM
EDTA	100	mM
Na_2HPO_4	100	mM
NaCl	1,5	M
CTAB	1	%

pH 8,0

2.6.2 Reinigung von Umwelt-DNA (HENNE et al., 1999)

Bei der verwendeten Methode zur Isolierung von DNA aus Standortproben (s. 2.6.1) wurden neben der DNA auch Huminsäuren gefällt, die in nachfolgenden Klonierungsschritten Restriktionsenzyme und Ligase inhibieren können. Durch Reinigung über das „Wizard™ *Plus* Minipreps DNA Purification System" (Fa. Promega Deutschland GmbH, Mannheim) und eine anschließende Anionenaustauschchromatographie (Qiagen-tip-100 Säulen, Fa. Qiagen GmbH, Hilden), konnten die Huminsäuren zum größten Teil abgetrennt werden. Jedoch ist diese Methode mit einem hohen Verlust an DNA verbunden.

Der erste Reinigungsschritt erfolgte nacheinander über zwei Minisäulen. Dazu wurden 150 µl DNA-Lösung mit 150 µl H_2O verdünnt, mit 1 ml „DNA Purification Resin" versetzt und auf den Säulenkörper gegeben. Nach dem Waschen mit 2 ml „Wash"-Puffer wurde zum Trocknen des Säulenmaterials bei 2000 Upm für 2 min zentrifugiert. Die Elution der DNA aus der Säulenmatrix erfolgte mit jeweils 50 µl TE-Puffer (65 – 70 °C). Da bei dieser Methode die Bindekapazität des Säulenmaterials stark überschritten wird, wurde die Elution sechsmal wiederholt. Das vereinigte Eluat wurde wieder mit 1 ml Resin versetzt und auf die zweite Säule aufgetragen. Die Elution wurde viermal wiederholt.

Eluate aus mehreren Ansätzen wurden wiederum vereinigt und mit 1 Vol. eines MOPS/NaCl-Puffers (1,5 M NaCl, 100 mM MOPS, pH 7,0) versetzt, um eine effiziente Bindung an die nachfolgende Anionenaustauschchromatographie-Säule zu gewährleisten. Die verwendeten Qiagen-tip-100-Säulen wurden mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert und die DNA-Lösung aufgetragen, und entsprechend der mitgelieferten

Vorschrift mit den Puffern QC gewaschen, mit QF eluiert und mit Isopropanol gefällt. Die Puffer QBT, QC und QF wurden vom Hersteller Qiagen mitgeliefert.

2.6.3 **Isolierung von RNA aus Umweltproben** (HURT et al., 2001; modifiziert)

Diese Methode der RNA-Isolierung ist eine Variation der Methode zur DNA-Isolierung aus Umweltproben nach ZHOU et al. (1996) (s.2.6.1). DNA und RNA werden parallel isoliert und anschließend durch Anionenaustauschchromatographie an Qiagen-tip 500-Säulen (QIAGEN RNA/DNA-Kit) getrennt. Ein entscheidender Unterschied zur DNA-Isolierung ist die Erniedrigung des pH-Wertes des DEP-Puffers (s. 2.6.1) auf 7,0, was eine Stabilisierung der RNA bewirkt.

Analog zu der in 2.6.1 beschriebenen Methode werden 50 g Probe mit 135 ml DEP-Puffer (pH 7,0), 1 ml Proteinase K (10 mg/ml) und 15 ml SDS (20 %, w/v) versetzt und für 30 min bei 37 °C horizontal geschüttelt (225 Upm).

Anschließend wurde das Gemisch in flüssigem N_2 eingefroren und auf Eis wieder aufgetaut (ca. 2 h). Es folgte eine 1-stündige Inkubation bei 65 °C im Wasserbad. Zur Abtrennung der gelösten RNA und DNA wurde 10 min bei 7000 Upm und RT zentrifugiert (Rotor GS3, Sorvall Zentrifuge, Fa. Du Pont Instruments, Newton, USA) und der Überstand in einen sterilen GS3-Zentrifugenbecher überführt. Zur Extraktion des RNA/DNA-Gemisches wurde 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt und für 10 min bei 7000 Upm und RT zentrifugiert (s.o.).

Die Nukleinsäuren wurden dann für 1 h mit 0,6 Vol. Isopropanol bei –20 °C gefällt und durch Zentrifugation bei 9000 Upm für 20 min pelletiert, mit eiskaltem Ethanol (70 %, v/v) gewaschen und in 5 bis 10 ml sterilem H_2O suspendiert.

Die Trennung der so koextrahierten Nukleinsäuren wurde mittels Anionenaustauschchromatographie an Qiagen-tip 500 Säulen (Fa. Qiagen) durchgeführt. Zunächst wurden 8 ml RNA/DNA-Lösung mit 2,5 ml QRL-Puffer und 22,5 ml QRV2-Puffer versetzt und zur Sedimentation von eventuell ausgefallenen Salzen für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Diese Behandlung diente zur Einstellung des pH-Werts und einer geeigneten Salzkonzentration für eine effektive Bindung der Nukleinsäuren an das Säulen-Material. Die so vorbereitete Lösung wurde auf die Säulen gegeben, die zuvor mit 10 ml QRE-Puffer äquilibriert wurde. In diesem ersten Schritt band nur die RNA an das Säulenmaterial, der die DNA enthaltende Durchfluß mußte

daher aufgefangen werden und wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei RT aufbewahrt. Anschließend wurde die Säule mit 28 ml QRW-Puffer gewaschen und die RNA mit 15 ml QRU-Puffer (vorgewärmt auf 45 °C) in einen sterilen, RNase-freien Zentrifugenbecher (SS34, Sorvall) eluiert. Das Eluat wurde mit 1 Vol. eiskaltem Isopropanol versetzt, vorsichtig gemischt und auf Eis aufbewahrt.
Nachfolgend wurde der zuvor aufgefangene Durchfluß zur Bindung der DNA 2 mal hintereinander auf die Säule aufgetragen, die Säule mit 28 ml QC-Puffer gewaschen und die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Die Fällung erfolgte mit 0,7 Vol. Isopropanol (RT) für 10 min bei RT.
Zur Pelletierung wurden die gefällte RNA und DNA für 30 min bei 15000 Upm und 4 °C zentrifugiert (Rotor SS34, Sorvall Zentrifuge, Fa. Du Pont Instruments, Newton, USA). Die Pellets wurden mit 4 ml eiskaltem Ethanol (70 %, v/v) versetzt, kurz gevortext und nochmals für 20 min zentrifugiert (s.o.). Anschließend wurden die Pellets bei RT für 10 min getrocknet und in 0,1 bis 2 ml H_2O gelöst (ü.N. bei RT, auf einem Schüttler).
Die Puffer QRL, QRV2, QRE, QRW, QC, QBT und QF wurden vom Hersteller Qiagen migeliefert.

2.6.4 Reinigung von Poly(A)-RNA aus Gesamt-RNA

Bei der Isolierung von RNA werden in der Mehrheit tRNA- und rRNA-Moleküle erhalten, da der Anteil der mRNA in einer Zelle nur ca. 1 bis 5 % beträgt. Die meiste eukaryotische mRNA (und auch einige virale RNAs) besitzen einen poly(A)-Schwanz von 20 bis 250 Adenosinnukleotiden. Zur Abtrennung von mRNA von der isolierten Gesamt-RNA aus Umweltproben wurde der Oligotex-Kit der Firma Qiagen genutzt, der sich diese Eigenschaft zu Nutze macht. Oligotex besteht aus Polystyren-Latex-Partikeln mit einer Größe von ca. 1,1 µm Durchmesser, kovalent gebunden befindet sich ein $dC_{10}T_{30}$-Oligonukleotid an der Oberfläche. Die Poly(A)-mRNA kann also durch Hybridisierung mit dem dT-Oligomer, das an eine feste Phase gebunden ist, gereinigt werden. Die Hybridisierung erfolgt dabei unter Hochsalzbedingungen, die Elution der RNA bei niedriger Ionenstärke, was zur Destabilisierung der RNA/Oligotex-Hybride führt.

Für die Reinigung wurden 250 µl RNA-Lösung mit 250 µl OBB-Puffer und 15 µl Oligotex-Suspension versetzt und anschließend durch Pipettieren gemischt. Zur Auflösung der Sekundärstruktur der RNA wurde das Gemisch für 3 min bei 70 °C inkubiert, die Bindung der RNA erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation (14000 –18000 x g) wurde das Oligotex-Material pelletiert, der Überstand entfernt (bis auf ca. 50 µl) und das Pellet für einen Waschschritt in 400 µl QW2-Puffer suspendiert und anschließend auf die Säulenkörper aufgetragen. Es folgte eine Zentrifugation bei 14000 –18000 x g. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Zur Elution der RNA wurde der OEB-Puffer auf 70 °C erhitzt und 20 –100 µl davon auf die Säule gegeben und anschließend wieder zentrifugiert. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten wurde das Eluat nochmals auf die Säule aufgetragen und abermals zentrifugiert.

2.6.5 Isolierung von chromosomaler DNA (AUSUBEL et al., 1987)

Zur Isolierung der chromosomalen DNA aus *Ilyobacter polytrophus* und *Klebsiella oxytoca* wurde eine 500-ml-Kultur bis zur stationären Phase bei 30 °C inkubiert und die Zellen anschließend geerntet.

Das Pellet wurde in 9,5 ml TE-Puffer und 0,5 ml SDS (10 %, (w/v)) suspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) und eine Inkubation für 1 h bei 37 °C. Danach wurden 1,8 ml 5 M NaCl-Lösung und 1,5 ml CTAB/NaCl-Lösung zugefügt, durch Schwenken des Gefäßes gemischt und für 20 min bei 65 °C inkubiert. Zur Abtrennung der Proteine erfolgte eine Extraktion mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, (v/v)). Der Überstand wurde abgenommen und zweimal mit 0,5 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1, (v/v)) extrahiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol und anschließende Zentrifugation für 15 min bei 13000 Upm (Rotor SS34, Sorvall, Fa. Du Pont Instruments, Newton, USA). Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (70 %, (v/v)) gewaschen, getrocknet und in sterilem H_2O suspendiert.

CTAB/NaCl-Lösung

NaCl	700 mM
CTAB	275 mM

2.6.6 Isolierung von Plasmid-DNA

2.6.6.1 „Cracking“ von Plasmiden

Für die schnelle Analyse einer großen Anzahl von Plasmiden wurde die Methode des „Crackings“ eingesetzt.
Die Kolonien wurden direkt von der Agarplatte mit einem Zahnstocher abgenommen und in 50 µl 10 mM EDTA-Lösung suspendiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl frisch angesetztem „Cracking“-Puffer und eine Inkubation bei 70 °C für 5 min. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 1,5 µl 4 M KCl und 2 µl Stop-Mix (s. 2.7.1) zugegeben und die Proben für 3 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine Zentrifugation bei 16000 x g und 4 °C. Ca. 20-25 µl des Überstandes wurden in einer Standard-Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.7.1) analysiert.

„Cracking“-Puffer

NaOH-Lösung (2N)	100	µl
SDS-Lösung (10 %(w/v)	50	µl
Saccharose	0,2	g
H_2O	ad 1000	µl

2.6.6.2 **Plasmidschnellpräparation** (HOLMES & QUIGLEY, 1981)

Diese Methode diente vor allem zum schnellen Nachweis und zur Charakterisierung von Klonierungsergebnissen.
1,5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur wurden geerntet (5000 x g, 5 min, RT) und in 350 µl STET-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) und einer kurzen Inkubation des Ansatzes bei RT erfolgte anschließend eine Denaturierung für 1 min bei 100 °C. Zellreste und

denaturierte Proteine wurden nach Zentrifugation (16000 x g, 10 min) mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Nach der Zugabe von 40 µl Na-Acetat (2,5 M, pH 5,2) und 420 µl Isopropanol wurde das Plasmid durch Zentrifugation (16000 x g, 5 min) pelletiert. Das enthaltene Pellet wurde mit Ethanol (70 %, (v/v)) gewaschen, getrocknet und in 50 µl $H_20_{dest.}$ suspendiert.

STET-Puffer

NaCl	100	mM
Tris-HCl	10	mM
EDTA	1	mM
Triton X-100	5	%
pH 8,0		

2.6.6.3 Minipräparation von Plasmiden mittels „Wizard™ *Plus* Minipreps DNA Purification System"

Eine schnelle Plasmidisolierung zum Erhalt sehr sauberer DNA erfolgte unter anderem durch Verwendung des „Wizard™ *Plus* Minipreps DNA Purification System" (Fa. Promega Deutschland GmbH).

1,5 ml einer 5-ml-Übernachtkultur wurden für 5 min bei 6000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl „Cell Resuspension Solution" suspendiert. Nach Zugabe von 200 µl „Cell Lysis Solution" wurde der Ansatz bis zum Aufklaren der Lösung geschwenkt und dann mit 200 µl „Neutralization Solution" versetzt. Die Probe wurde anschließend 10 min bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand mit 1 ml „DNA-Purification Resin" gemischt. Das DNA-Resin-Gemisch wurde dann auf eine vom Hersteller mitgelieferte Minisäule gegeben und mit 2 ml „Column Wash Solution" gewaschen und durch Zentrifugation (2 min, 10000 x g) getrocknet. Die Elution der DNA von der Matrix erfolgte durch Zugabe von 50 µl $H_20_{dest.}$, 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (30 s, 12000 x g). Bei der Isolierung von Plasmiden > 7 kBp erfolgte die Inkubation bei 65 °C. Das Resin und alle verwendeten Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert.

2.6.6.4 Minipräparation von Plasmiden mittels „QIAprep Spin Miniprep Kit“

Alternativ zum „Wizard™ *Plus* Minipreps DNA Purification System” (s. 2.6.6.3) wurde zum Erhalt von sehr sauberer Plasmid-DNA der „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Fa. Qiagen) genutzt.
1,5 ml einer 5-ml-Übernachtkultur wurden für 5 min bei 6000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 250 µl Puffer P1 suspendiert. Es folgte die Zugabe von 250 µl Puffer P2, Schwenken bis zum Aufklaren der Lösung und Neutralisation durch Zusatz von 350 µl Puffer N3. Durch Zentrifugation (10 min, 13000 x g) wurden die ausgefällten Proteine und Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend auf eine QIAprep Säule aufgetragen, die eine Silica-Gel-Membran für die selektive Adsorption von Plasmid-DNA enthält. Durch Zentrifugation (1 min, 13000 x g) erfolgte die Bindung der DNA an die Membran, der Durchfluß wurde verworfen. Nach einem Waschschritt mit 750 µl Puffer PE und dem Trocknen durch Zentrifugation (1 min, 13000 x g) wurde die Plasmid-DNA mit 30 bzw. 50 µl $H_2O_{dest.}$ eluiert.
Alle verwendeten Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert.

2.6.6.5 Präparative Plasmidisolierung über Anionenaustausch-chromatographie

Die Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA erfolgte nach alkalischer Lyse mit den Puffern P1, P2 und P3 über Anionenaustauschchromatographie (Qiagen Plasmid Midi-Kit, Fa. Qiagen).
25 ml Zellkultur wurden bei einer OD_{600} von 1 bis 1,5 geerntet und in 4 ml P1-Puffer suspendiert. Es folgte die Zugabe von 4 ml P2-Puffer und eine Inkubation für 5 min bei RT. Anschließend wurden 4 ml P3-Puffer zugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 16000 x g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und zur vollständigen Aufklarung erneut für 15 min zentrifugiert.
Der dabei erhaltene Überstand konnte dann auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Quiagen-tip-100 Säule aufgetragen. Es folgte ein Waschschritt mit 20 ml QC-Puffer und die Elution der Plasmid-DNA durch Zugabe von 5 ml QF-Puffer. Die DNA wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 16000 x g, 4 °C)

pelletiert. Das Sediment wurde anschließend mit Ethanol (70 %, v/v) gewaschen und getrocknet und in 100 bis 200 µl H_2O aufgenommen.
Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus größeren Kulturvolumina als 100 ml wurde die Menge an P1, P2 und P3 entsprechend erhöht. Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte dann in mehreren Durchgängen, wobei die Säule nach jeder Elution mit 4 ml QBT-Puffer neu äquilibriert wurde. Auf diese Weise wurde Plasmid-DNA aus Kulturvolumina bis 250 ml isoliert.
Alle verwendeten Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert.

2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.7.1 Standard-Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten diente die Standard-Agarose-Gelelektrophorese (SAMBROOK et al., 1989). Es wurden Gele mit einem Volumen von 10 bis 25 ml gegossen. Die Agarosekonzentration variierte zwischen 0,8 und 1,5 %. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Volumen Stopp-Mix versetzt, um sie zu beschweren und um die Lauffront zu markieren. Als Elektrophoresepuffer wurde 1-fach TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung zwischen 25 und 120 V durchgeführt, wodurch sich je nach Gelgröße eine Laufzeit von 1 bis 7 h ergab. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Agarosegele in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml H_2O) für 10 bis 30 min angefärbt. Nach kurzem Entfärben im Wasserbad konnten die Gele auf der Gel Doc 2000-Anlage (Fa. Biorad, München) bei Licht der Wellenlänge 254 nm begutachtet werden. Zur Dokumentation diente ein Videoprinter (Intas Video Graphic Printer UP-890 CE, Fa. Sony Corporation, Japan), der eine Bildübertragung auf Thermopapier ermöglichte.

Stopp-Mix

Saccharose	50	% (w/v)
Harnstoff	7	M
EDTA	1	mM
Bromphenolblau	0,1	% (w/v)

2.7.2 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Als Größenstandard für lineare DNA-Fragmente wurde der “Ladder-Mix” (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt.
Die Größen der Fragmente betrugen in kBp:

10,0	3,5	1,2	0,6
8,0	3,0	1,03	0,5
6,0	2,5	0,9	0,4
5,0	2,0	0,8	
4,0	1,5	0,7	

und 3 weitere kleinere Fragmente, die meist im Gel nicht mehr sichtbar waren.

2.8 Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.1 Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Sequenz-spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen lieferte lineare DNA-Fragmente mit definierten Enden. Die Spaltung erfolgte in den vom Hersteller mitgelieferten Puffersystemen bei den empfohlenen Temperaturen. Die Ansätze wurden mit einem Gesamtvolumen von mindestens 15 µl für 2 bis 15 Stunden durchgeführt. Zur Vermeidung einer zu hohen Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz durfte das Volumen der zugegebenen Enzymlösung höchstens 1/10 des Gesamtvolumens betragen.
Die partielle Spaltung von chromosomaler bzw. von Standort-DNA wurde zeitlimitiert durchgeführt. Es wurde routinemäßig mit 1 U Restriktionsenzym gearbeitet. Die Verdauung wurde in bestimmten Zeitabständen durch Zugabe von EDTA (20 mM) und Inkubation auf Eis gestoppt.

2.8.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Erhöhung der Effizienz einer Ligationsreaktion zwischen Insert-DNA und Vektor-DNA wurde die Vektor-DNA an den 5´-Enden dephosphoryliert. Auf die Weise sollte eine Rezirkularisierung des Vektors verhindert werden. Es wurde die alkalische

Phosphatase der Fa. MBI Fermentas GmbH eingesetzt. Nach vollständiger Spaltung des Vektors wurde 1 U alkalische Phosphatase pro µg DNA zugesetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten

2.8.3.1 Ligation mit T4-DNA-Ligase

Zur Verknüpfung von linearisierter, dephosphorylierter Vektor- und Insert-DNA wurde T4-DNA-Ligase eingesetzt, die in Anwesenheit von ATP eine Phosphodiesterbindung zwischen 3´-OH- und 5´-PO_4-Enden von Nukleinsäuren katalysiert. Die Ligationen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Es wurden jeweils 0,2 bis 1 µg Vektor- bzw. Insert-DNA eingesetzt. Der Ansatz enthielt weiterhin 1 U T4-DNA-Ligase und in 1-facher Konzentration den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer. Die Ligationsansätze mit kohäsiven Enden wurden über Nacht bei 16 °C, für 2 bis 4 h bei Raumtemperatur oder für 48 h bei 4 °C inkubiert. Zur Ligation glatter Enden wurden 2 U Ligase eingesetzt und die Ansätze für 1 h bei 37 °C inkubiert.

2.8.3.2 Ligation mit dem „TOPO-TA-Cloning®“-Kit

Für eine besonders effektive Klonierung von PCR-Produkten, die mit der *Taq*-DNA-Polymerase in einer Polymerasekettenreaktion (PCR, s. 2.12) amplifiziert wurden, wurde der „TOPO-TA-Cloning®“-Kit (Fa. Invitrogen) verwendet. Für diese Art der Ligation wird keine Ligase benötigt.
Die *Taq*-DNA-Polymerase besitzt eine von der Matrize unabhängige terminale Transferase-Aktivität und hängt an die 3´-Enden von PCR-Produkten einzelne Desoxyadenosine (A) an. Der im Kit vorhandene, bereits linearisierte Vektor pCR2.1-TOPO besitzt analog dazu an den 3´-Enden einzelne Desoyxthymidin-Rest (T). Dies erlaubt eine Ligation nach der sogenannten TA-Methode.

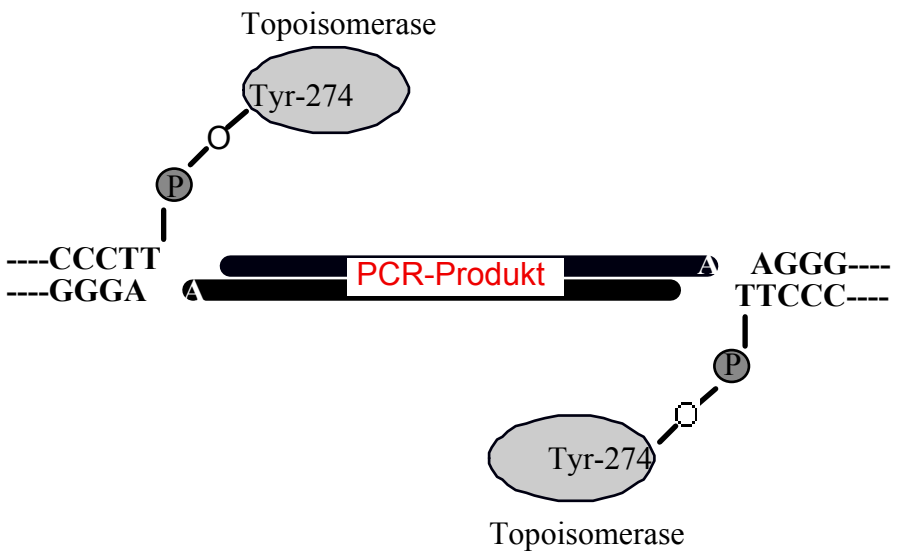


Abbildung 6: Schematische Darstellung der TOPO-TA-Klonierung.

Des Weiteren besitzt der Vektor die kovalent gebundene Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus. Die Topoisomerase I bindet an spezifische Sequenzen doppelsträngiger DNA und spaltet dort das Phosphodiester-Gerüst stromabwärts der Sequenz 5´-CCCTT in einem Strang (SHUMAN, 1991). Die Energie dieser Spaltungsreaktion wird durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3´-Phosphat des gespaltenen Stranges und dem Tyrosin-274 der Topoisomerase I konserviert. Die Reaktion zwischen DNA und Protein kann durch den Angriff des 5´-Hydroxyl-Restes umgekehrt werden, was dann zur Abspaltung der Topoisomerase I führt (SHUMAN, 1994). Dieses Prinzip wird zur effizienten Klonierung von PCR-Produkten genutzt (s. Abb. 6).

2.8.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die als Sonden für Hybridisierungen eingesetzt werden sollten, wurden mit Hilfe des "Random Primed Labeling Kit" (Fa. Gibco BRL, Eggenstein) unter Verwendung von [α-^{32}P]-dATP radioaktiv markiert. Zur Denaturierung wurden 25 bis 50 ng DNA in 25 µl $H_2O_{dest.}$ in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel für 10 min bei 95 °C denaturiert und danach schnell auf Eis abgekühlt. Die folgenden Bestandteile des Reaktionsansatzes wurden dann auf Eis zusammen pipettiert:

denaturierte DNA-Lösung	25 µl
dCTP, dGTP, dTTP	je 2 µl
Reaktionspuffer	15 µl
[α-^{32}P]-dATP (3000 Ci/mol, 10 µCi/ml)	3 µl

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Klenow-Fragment (2U/µl) gestartet und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde die DNA-Lösung über NAP-5-Säulen (s. 2.5.3.5) gelchromatographisch gereinigt.

2.9 **Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation** (SAMBROOK et al., 1989; modifiziert)

Die Größenfraktionierung von Fragmenten partiell verdauter, chromosomaler DNA, die zur Klonierung eingesetzt werden sollte, erfolgte mittels einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Bei dieser sehr schonenden Methode werden die verschiedenen Fragmentgrößen entsprechend ihrer Schwebedichte im Saccharosegradienten getrennt. Zunächst wurde ein Saccharose-Stufengradient (10 - 40 %) in 10 ml-Zentrifugenröhrchen (Sorvall Polyallomer 3699, Fa. Du Pont de Nemours Deutschland GmbH, Dreieich) hergestellt. Dazu wurden je 1,9 ml 40 %, 32,5 %, 25 %, 17,5 % und 10 % Saccharose (jeweils w/v in 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0) beginnend mit der höchsten Konzentration übereinandergeschichtet und nach jeder Stufe eingefroren. Auf den fertigen Gradienten wurde 100 - 200 µg partiell verdaute chromosomale DNA aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte in einem „swing-out”-Rotor (Sorvall TH641, Fa. Du Pont de Nemours) in einer Ultrazentrifuge (Sorvall OTD 55 B, 27000 Upm, 24 h, 20 °C). Zur Ernte des Gradienten wurden vorsichtig je 400 µl von oben beginnend abgenommen. Anschließend erfolgte eine DNA-Fällung mit PEG/NaCl aus Saccharose (s. 2.5.3.2). 10 µl jeder dritten Fraktion wurden durch Agarosegelelektrophorese (s. 2.7.1) auf Größe und Qualität hin überprüft.

2.10 Übertragung von DNA in *E. coli* und Selektion rekombinanter Klone

2.10.1 Hocheffiziente Transformation in *E. coli* (INOUE et al., 1990)

Zur Herstellung hocheffizienter Transformanten wurde *E. coli* aus einer Stammkultur auf eine LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus 10 bis 12 Einzelkolonien wurde eine 5 ml Vorkultur angeimpft. Diese diente als Inokulum für 250 ml SOB-Medium (s. 2.2.3). Diese Kultur wurde bei 16 °C schüttelnd bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 2500 x g, 4 °C), in 80 ml eiskalter TB-Lösung suspendiert und für 10 min auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen (10 min, 2500 x g, 4 °C) und Suspension in 20 ml TB-Lösung mit DMSO (Endkonzentration 7 %, v/v). Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurden Aliquots von 200 µl in flüssigem N_2 eingefroren und direkt zur Transformation eingesetzt oder bei - 70 °C gelagert.
Zur Transformation wurden 200 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut und nach der Zugabe von 1 bis 20 µl DNA-Lösung (ca. 10 bis 500 ng) für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C, eine kurze Inkubation auf Eis und die Zugabe von 0,8 ml LB-Medium. Zur Ausprägung der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz wurden die Ansätze für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Suspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

TB-Lösung

Pipes	10	mM
$MnCl_2$	55	mM
$CaCl_2$	15	mM
KCl	250	mM

pH 6,7

Das $MnCl_2$ wurde ungelöst und separat autoklaviert.

2.10.2 Transformation in *E. coli* durch Elektroporation (DOWER et al., 1988)

Diese Methode beruht auf der Permeabilisierung der Zellmembran durch Elektroschock. Dieser verursacht einen kurzfristigen reversiblen lokalen Zusammenbruch des Membranpotentials bzw. eine Desorganisation der Membranstruktur (CHASSY et al., 1988) und erleichtert damit die Aufnahme von Makromolekülen wie z. B. Plasmid-DNA in die Zelle.

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde eine 5-ml-Übernachtkultur in 250 ml LB-Medium (s. 2.2.1) überimpft und bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 1,0 inkubiert. Die Kultur wurde für 15 bis 30 min auf Eis gehalten und danach für 10 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann zweimal mit 1 Volumen $H_2O_{dest.}$ gewaschen und anschließend noch einmal mit 10 ml Glycerin (10 %, (v/v)). Abschließend erfolgte die Suspendierung in 0,5 ml Glycerin (10 %, v/v). Aliquots der Suspension wurden bei -70 °C gelagert.

Pro Ansatz wurden 40 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut, in eine sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) überführt und mit 1 bis 5 µl dialysierter DNA-Lösung versetzt. Die Elektroporation erfolgte in einem Gene Pulser TM (Bio Rad Laboratories GmbH, München) bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und eine Zeitkonstante von 3,5 bis 4,5 ms erreicht wurde. Nach dem Stromimpuls wurden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen, 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

2.10.3 Transduktion

2.10.3.1 Transduktion mit den „Gigapack® III Gold Packaging Extract"

Zunächst wurden die vom Hersteller (Fa. Stratagene, San Diego, USA) gelieferten, bei -70 °C gelagerten Lysate durch Reiben zwischen den Fingern aufgetaut. Dann wurden sofort 0,1 - 1,0 µg (max. 4 µl) ligierte DNA hinzugefügt und vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt. Anschließend wurde das Gemisch kurz (3 - 5 s) zentrifugiert, damit sich alle Bestandteile am Boden befinden, und es folgte eine Inkubation von 2 h bei RT. Danach wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform zugefügt, vorsichtig

gemischt und zum Sedimentieren des "Abfalls" kurz (5 - 10 s) zentrifugiert. Die in Phagenköpfe verpackte DNA befandt sich nun im Überstand und konnte bei 4 °C bis zu 4 Wochen aufgehoben werden.

Für die Infektion mit den durch den „Gigapack® III Gold Packaging Extract" (Fa. Stratagene) *in vitro* verpackten Ligationsansätzen wurden *E. coli* ECL707 oder *E. coli* BM25.8 eingesetzt. Zur Ausbildung des für die Transduktion notwendigen λ-Rezeptors wurden die Stämme in LB-Medium (s. 2.2.1) mit 0,2 % (w/v) Maltose und 10 mM $MgSO_4$ für 6 bis 8 h bei 37 °C oder für 12 h bei 30 °C angezogen. Das Pellet wurde in $MgSO_4$-Lösung (10 mM) suspendiert und auf eine OD_{600} von 0,5 - 1,0 eingestellt. Diese Suspension wurde bei 4 °C gelagert und noch am gleichen Tag zur Transduktion eingesetzt.

Vom Verpackungsansatz wurden verschiedene Verdünnungen (z.B. 1:10, 1:50) in SM-Puffer hergestellt und jeweils 25 µl dieser Verdünnungen wurden mit 25 µl Empfängerzellen vermischt und 30 min bei RT inkubiert. Dann wurden jeweils 200 µl LB-Medium (s. 2.2.1) hinzugefügt und zur Ausbildung der entsprechenden Antibiotikaresistenz erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Ansätze 1 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die sedimentierten Zellen wurden dann in 50 µl LB-Medium suspendiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

SM-Puffer

NaCl	5,8	g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	2,0	g
Tris (1 M)	50,0	ml
Gelatine (2%, (w/v))	5,0	ml
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml
pH 7,5		

2.10.4 Der X-Gal-Test zur Selektion rekombinanter Klone

Bei Klonierungen ist es entscheidend, Klone, die nach Übertragung von DNA nur den Vektor enthalten, von denjenigen die ein Plasmid mit Insert tragen, zu unterscheiden.

Aus diesem Grund wurde ein zusätzliches Screeningsystem neben der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz benutzt. Plasmide der pBluescript-Reihe enthalten neben dem Promotor- und Operator-Bereich des *lac*-Operons auch das 5´-Ende des *lacZ*-Genes (VIEIRA und MESSING, 1982). Dieses kodiert für das sogenannte α-Peptid, welches die inaktive β-Galaktosidase von Wirtsstämmen wie *E. coli* DH5α komplementieren kann. Da sich die multiple Klonierungsstelle der verwendeten Vektoren innerhalb des aminoterminalen Bereichs des *lacZ*-Gens befindet, ist eine α-Komplementation nur möglich, wenn das Plasmid kein Insert besitzt. Der Nachweis der aktiven β-Galaktosidase auf Agarplatten erfolgte durch Zugabe des Induktors IPTG (Isopropyl-ß-thiogalaktopyranosid) und des Substrats X-Gal (5-Brom-4-chlor-indoyl-β-D-galaktosid), welches durch das Enzym gespalten wurde. Dabei entstand in Anwesenheit von Sauerstoff der blaue Farbstoff 5-Brom-4-chlor-indigo, welcher der Indikator für rekombinante *E. coli*-Stämme ist, die ein Plasmid ohne Insert tragen.

2.10.5 Screening auf die Verwertung von C2-C4-Polyolen

Die Überprüfung rekombinanter *E. coli*-Stämme auf die Verwertung von C2-C4-Polyolen wurde auf Carbonyl-Indikator-Medium (s. 2.2.5) durchgeführt. Als Basismedium diente hierbei LB-Medium (s.2.2.1), welches das Wachstum aller *E. coli*-Klone erlaubt. Zusätzlich enthielt es das zu testende Substrat (Glycerin, 1,2-Propandiol, Ethylenglykol oder 2,3-Butandiol; 1%ig) sowie den Farbstoff Pararosanilin und Na-bisulfit. Der Farbstoff bildete zusammen mit dem Na-bisulfit ein Schiff´sches Reagenz, das farblos ist. Wurden nun bei der Substrat-Verwertung Aldehyde bzw. Ketone gebildet, kam es zur Ausbildung einer Schiff´schen Base, die intensiv rot gefärbt war. Daher wiesen Kolonien von zur Polyol-Verwertung befähigten *E. coli*-Klonen in diesem Medium eine rote Farbe auf und färbten auch den Agar rot an.; alle anderen Klone blieben hell.

Für das Screening wurde als Wirtsstamm die Glycerin-negative *E. coli*-Mutante ECL707 verwendet. Nach der Transformation von rekombinanten Plasmiden wurde auf den Indikatorplatten ausplattiert und für 16 bis 72 h bei 30 oder 37 °C inkubiert.

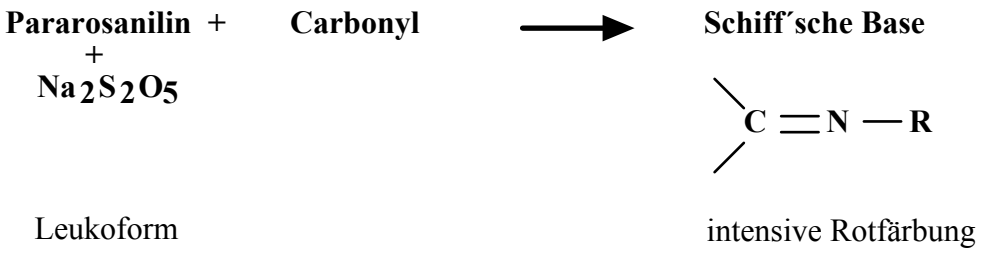


Abbildung 7: Testprinzip der Aldehyd/Keton-Indikatorplatten.

2.11 DNA-DNA-Hybridisierung

2.11.1 Vorbereitung von Nylonmembranen für Koloniehybridisierungen

Zur Analyse einer großen Anzahl rekombinanter Klone in Hybridisierungsexperimenten dienten runde Nylonmembranen mit 8,2 cm Durchmesser (Hybond^{TM}-N, Fa. Amersham Pharmacia).

Bis zu 100 Klone wurden auf eine „Masterplatte" mit entsprechendem Antibiotikum übertragen. Nach ca. 20 bis 30 h Inkubation bei 37 °C wurde die Membran aufgelegt, leicht angedrückt und wieder abgezogen, um so das Zellmaterial zu übertragen. Alternativ dazu wurden die Kolonien direkt (ohne Ausstrich) auf die Nylonmembranen übertragen.

Anschließend wurde die Nylonmembran mit dem Impfmaterial nach oben für 2 min auf Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt, das mit 2-fachem SSC-Puffer und 5 % SDS (w/v) getränkt war und anschließend für 2,5 min bei 600 W im Mikrowellenherd gebacken. Die auf diese Weise für die Hybridisierung vorbereitete Membran wurden anschließend mit 5-fachem SSC-Puffer und 0,1 % SDS (w/v) 1 h gewaschen und getrocknet und konnten so bis zu 2 Wochen bei RT aufbewahrt werden.

2.11.2 **Southern-Blot** (SOUTHERN, 1975)

In Agarosegelen aufgetrennte DNA wurde durch Kapillarblotting auf Nylonmembranen (Hybond-XL, Fa. Amersham Pharmacia) übertragen. Dabei wurde Transferpuffer durch das Gel gesaugt, um die DNA auf der darüberliegenden Membran zu fixieren.
Die zu analysierende DNA wurde im Standard-Agarosegel (Volumen 100 ml) aufgetrennt, im Ethidiumbromidbad gefärbt, gewässert und zusammen mit einem Lineal fotografiert. Anschließend wurde das Gel für 10 min in 0,25 M HCl inkubiert, was zu Strangbrüchen in der DNA führt, die den Transfer auf die Membran erleichtern. Dann wurde es für 30 min in Denaturierungslösung (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl) und nochmals 30 min in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH7,5) geschwenkt. Eine Nylonmembran wurde in Gelgröße zugeschnitten, mit $H_2O_{dest.}$ angefeuchtet und für mindestens 10 min in 10x SSC-Puffer (s. 2.5.1) äquilibriert. Die Blottingkammer eigener Bauart wurde mit 10x-SSC-Puffer gefüllt. In der Mitte der Kammer wurden wie folgt übereinander gelegt:

⇒ 3 Lagen Filterpapier (Whatman 3MM), welches in Kontakt mit dem Transferpuffer stand
⇒ das Agarosegel mit der Unterseite nach oben
⇒ die äquilibrierte Nylonmembran
⇒ bis 6 Lagen Filterpapier (Whatman 3MM)
⇒ ein ca. 10 cm hoher Stapel Papierhandtücher
⇒ ein Gewicht (ca. 200 bis 500 g)

Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran benötigt etwa 16 bis 24 h. Um eine vollständige Denaturierung der immobilisierten DNA für die Hybridisierung zu gewährleisten, wurde die Membran für 60 s in 0,4 M NaOH geschwenkt. Nach der Neutralisierung in 2x SSC und 0,2 M Tris (pH 7,5) für 2 min wurde die Nylonmembran bei RT getrocknet. Die auf diese Weise immobilisierte DNA konnte für Hybridisierungen eingesetzt werden.

2.11.3 **Dot-Blot**

Für die Herstellung von Dot-Blots wurden die DNA-Proben direkt auf eine Nylonmembran getropft und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die Membran

für wenige Minuten auf einem mit 2x SSC, 5% SDS (w/v) getränkten Filterpapier inkubiert. Das Fixieren der DNA erfolgte in der Mikrowelle bei 600 W für 2,5 min. Nach Waschen der Membran in 5x SSC, 0,1% SDS (w/v) für 5 min konnte sie für Hybridisierungen eingesetzt werden.

2.11.4 Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Sonden

Auf Nylonmembranen fixierte DNA wurde mit radioaktiv-markierten DNA-Fragmenten (s. 2.8.4) hybridisiert. Vor der Hybridisierung war eine Prähybridisierung notwendig, um unspezifische Bindungsstellen für die DNA-Sonde auf den Nylonmembranen abzusättigen. Hierzu wurden die Membranen in speziellen Hybridisierungsröhrchen (Fa. Ochs, Göttingen) mit 10 ml Prähybridisierungsmix versetzt und 1 bis 4 h in einem Hybridisierungsofen (OV 10, Fa. Biometra, Göttingen) bei 60 °C prähybridisiert.
Für die Hybridisierung wurde die radioaktiv-markierte Sonde, die zuvor für 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gehalten wurde, zugegeben. Die Membranen wurden dann für 12 bis 16 h bei 60 °C (homologe Sonde) bzw. bei 45 °C (heterologe Sonde) inkubiert.
Nach erfolgter Hybridisierung schlossen sich je nach Bedingungen unterschiedlich stringente Waschschritte an. Bei Einsatz von homologen Sonden wurde wegen der zu erwartenden starken Signale grundsätzlich zweimal für je 5 min in 2-fachem SSC-Puffer (s. 2.5.1), anschließend zweimal für je 30 min in 2-fachem SSC-Puffer mit 1 % (w/v) SDS bei 60 °C gewaschen.
Nach Abschluß der Waschprozeduren wurden die Membranen in Haushaltsfolie eingeschweißt. Die Autoradiographie erfolgte mit Hilfe von Autoradiographiekassetten (Storage Phosphor Screen GP, Fa. Kodak, Stuttgart) und eines Phosphoimagers (Storm 860, Fa. Molecular Dynamics GmbH, Krefeld). Zur Quantifizierung wurde das Programm Image Quant für Macintosh Version 1.2 (Fa. Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) verwendet.

Prähybridisierungsmix

Dextransulfat (50 % , w/v)	2	ml
0,5 M Tris	1	ml
5 M NaCl	2	ml
SDS-Lösung (10 %, w/v)	2	ml
$H_2O_{dest.}$	ad 10	ml
pH 7,5		

2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Herstellung spezifischer DNA-Fragmente für Klonierungen verwendet. Als Enzyme wurden die Taq-DNA-Polymerase (Fa. MBI Fermentas), die Platinum-*Pfx*-DNA-Polymerase (Fa. Invitrogen GmbH), die Deep-Vent-DNA-Polymerase (Fa. New England Biolabs GmbH, Freiburg) und die Herculase Enhanced DNA Polymerase (Fa. Stratagene) eingesetzt. Die Reaktionen wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen in einem Volumen von 50 bzw. 100 µl durchgeführt und enthielten folgende Bestandteile:

DNA	0,5 - 1	µg
Oligonukleotide	je 100	pmol
dNTP-Gemisch	200	µM
DNA Polymerase	1	U
Reaktionspuffer (10x)	10	µl
$MgCl_2$ oder $MgSO_4$	1,5	mM
$H_2O_{dest.}$	ad 100	µl

Die Temperaturzyklen wurden den jeweiligen Anforderungen in Bezug auf die Hybridisierungstemperatur (x) und die Dauer der Kettenverlängerung (y) angepaßt. Sie wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	95 °C	2 min
30 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	1 min
Hybridisierung	x°C	1 min
Kettenverlängerung	68, 72 o. 75 °C	y min
Ende der Zyklen		
Kettenverlängerung	68, 72 o. 75 °C	10 min

Für die Einstellung der Parameter waren die zu erwartende Fragmentlänge und die Schmelztemperatur T_m der verwendeten Oligonukleotide entscheidend. Für die Hybridisierung wurde entsprechend der zu erwartenden Fragmentlänge eine Zeit von ca. 1 min/1000 Bp gewählt. Die optimale Hybridisierungstemperatur wurde nach der Schmelztemperatur T_m der Oligonukleotide festgelegt, die über folgende Formel errechnet wurde:

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

L = Länge des Oligonukleotids

% GC-Gehalt = prozentualer GC-Gehalt des Oligonukleotids

Durch Verkürzung der Hybridisierungsdauer, Verringerung der Oligonukleotidkonzentration und Variation der $MgCl_2$-Konzentration konnte die Spezifität der PCR optimiert werden.

Die Temperaturzyklen wurden mit einem Primus-Cycler (Fa. MWG AG-Biotech, München) oder dem „Mastercycler Gradient“ (Fa. Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (s.2.7.1) analysiert.

2.12.1 Reaktionsbedingungen der „Megaprime“-PCR

Zur Komplettierung der unvollständig klonierten Dehydratase-Genregionen wurden sog. Megaprime-PCR-Reaktionen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich überlappende DNA-Fragmente von einer Größe von mehr als 1000 Bp zusammensetzen (BARIK und GALINSKY, 1997). Die Amplifikation der Einzelfragmente und die anschließende Zusammensetzung in einer weiteren PCR-Reaktion wurden unter den in Tabelle 5 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide und Bedingungen der PCR-Reaktionen zur Komplementation der Dehydratasen von pAK3 bis und 5 sowie zur Subklonierung der Dehydratase-Gene aus pAK2 und pAK7
Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind in Tab. 3 (s. 2.1) aufgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden mit 30 Zyklen durchgeführt.

Dehydratase aus:	Primer	DNA-Matrize	Annealing	Ketten-verlängerung	Größe des Produktes
pAK2	pAK2-1 pAK2-2	pAK2	60 °C 1:00 min	68 °C 2:40 min	2699 Bp
pAK3	pAK3-1 pAK3-2	pAK3	60 °C ± 5 °C 1:00 min	68 °C 1:30 min	1596 Bp
	CF-1 CF-2	pGEX2T/dhaB	60 °C ± 5 °C 1:00 min	68 °C 1:10 min	1130 Bp
	pAK3-2 CF-1	Produkte aus vorherigen Reaktionen	48 °C ± 10 °C 1:00 min	72 °C 2:40 min	2699 Bp
pAK4	pAK4-1 pAK4-2	pAK4	62 °C ± 5 °C 1:00 min	68 °C 1:40 min	1644 Bp
	ST/KO-1 KO-3	chr. DNA *K. oxytoca*	59 °C ± 5 °C 1:00 min	68 °C 1:00 min	1064 Bp
	ST/KO-1 pAK4-2	Produkte aus vorherigen Reaktionen	50 °C ± 10 °C 1:00 min	72 °C 2:50 min	2690 Bp
pAK5	pAK5-1 pAK5-2	pAK5	60 °C ± 5 °C 1:00 min	68 °C 1:10 min	1189 Bp
	ST/KO-1 ST-3	chr. DNA *S. typhimurium*	60 °C ± 5 °C 1:00 min	68 °C 1: 40 min	1725 Bp
	ST/KO-1 pAK5-2	Produkte aus vorherigen Reaktionen	50 °C ± 10 °C 1:00 min	72 °C 3:00 min	2884 Bp
pAK7	pAK7-1 pAK7-2	pAK7	60 °C ± 5 °C 1:00 min	68 °C 2:40 min	2699 Bp

2.13 Sequenzierung und Analyse von Sequenzdaten

Die Isolierung der zu sequenzierenden Plasmide erfolgte unter Verwendung des „Wizard™ *Plus* Miniprep DNA Purification Systems“ (s. 2.6.5.3) bzw. des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ (s. 2.6.5.4). Die Sequenzierungen wurde durch das „Göttingen

Genomics Laboratory“ (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) am ABI PRISM 337 DNA-Sequencer durchgeführt.
Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen ABI Edit View 1.0.1, DNA-Strider 1.2 (MARCK, 1988) und DNAid 1.8 auf einem Macintosh PowerPC (Fa. Apple Computer Inc., Cupertino, USA). Hiermit konnten offene Leserahmen gefunden, Restriktionskarten erstellt und die Kodon-Nutzung ermittelt werden. Ferner konnten mit diesen Programmen Proteinsequenzen abgeleitet und auf hydrophobe und hydrophile Eigenschaften untersucht werden. Weitergehende Analysen wurden mit dem GCG-Paket („Wisconsin Genetics Computer Group Sequence Analysis Software Package“), Version 8.0 (University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, USA; DEVEREUX et al., 1984) über einen UNIX-Computer (GWDG, Göttingen) und dem im Internet angebotenen Service der NCBI (http//:www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Dazu zählte der Sequenzabgleich mit Daten der PIR-, NBRF-, SWISSPROT-, EMBL- und GenBank-Datenbanken (PEARSON und LIPMAN, 1988).

2.14 Herstellung von Rohextrakten

2.14.1 Zellaufschluss mit der Frenchpresse

Für die Herstellung von Rohextrakten mit der Frenchpresse wurde von einem Kulturvolumen mit mindestens 25 ml ausgegangen. Zunächst wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 Upm, 10 min, 4 °C, GS3-Rotor, Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Fa. Du Pont de Nemours GmbH) geerntet und das Pellet in einem geeigneten Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in eine vorgekühlte French-Press-Apparatur (Fa. SLM Aminco, Urbana, USA) gefüllt. Der Aufschluß der Zellen fand bei einem Druck von 140 Mpa statt. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, wobei vor dem ersten Mal eine Spatelspitze DNase I (Fa. Boehringer, Mannheim) zugegeben wurde. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 Upm und 4 °C für 30 min (SS34-Rotor, Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Fa. Du Pont de Nemours GmbH). Der erhaltene Extrakt wurde als Rohextrakt bezeichnet und konnte bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert werden.
Sollten anaerobe Rohextrakte hergestellt werden, wurden alle Zentrifugenröhrchen 24 h vor dem Aufschluß in eine Anaerobenkammer (Microflow Anaerobic System, Fa.

Intermed M.D.H. GmbH, Rüsselsheim) eingeschleust. Vor dem Zellaufschluß wurde die Zellsuspension in der Anaerobenkammer in die vorgekühlte Frenchpresse gefühlt, die am Ausgang mit einem Isoversinic-Schlauch und einer Kanüle versehen war. Die Kanüle wurde in das Septum eines Hungate-Röhrchens eingeführt. Für eine Wiederholung des Preßvorgangs wurde die Suspension mit Hilfe des Stempels der Frenchpresse wieder aus dem Hungate-Röhrchen zurück in die Presse gezogen. Die Lagerung der nach der Zentrifugation erhaltenen Rohextrakte erfolgte bei –20 °C in Hungate-Röhrchen, die zuvor für mindestens 30 min mit N_2 begast wurden.

2.14.2 Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung

Zum Zellaufschluss durch Ultraschall wurden die geernteten Zellen (6000 Upm, 10 min, 4 °C, GS3-Rotor, Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Fa. Du Pont de Nemours GmbH) zunächst in einem geeigneten Puffer aufgenommen. Das Gefäß mit der Zellsuspension wurde in die Halterung des Ultraschallgerätes (Ultraschallprozessor UP200S, Fa. Dr. Hielscher GmbH, Stahndorf) eingespannt. Um eine zu hohe Erwärmung der Zellsuspension zu vermeiden, wurde das Gefäß während der gesamten Prozedur durch ein Eisbad gekühlt. Es wurde viermal mit einer Amplitude von 80 Micron beschallt. Zwischen den Beschallungen wurde jeweils für eine halbe Minute pausiert. Nach der Ultraschallbehandlung wurde der Extrakt für 30 min bei 15000 Upm und bei 4 °C in einem SS34-Rotor (Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Fa. Du Pont de Nemours GmbH) zentrifugiert, um intakte Zellen abzutrennen. Die erhaltenen Extrakte konnten bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert werden.

2.15 **Proteinbestimmung** (BRADFORD,1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von BRADFORD (1976).

Es wurden 20 µl einer Probe zu 1 ml Bradford-Reagenz gegeben. Wenn nötig, konnte die Probe mit $H_2O_{dest.}$ verdünnt werden. Nach einer Inkubation für 10 min bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 580 nm gegen einen Leerwert gemessen. Zur

Konzentrationsbestimmung wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin in einem Bereich von 0 bis 10 µg/ml aufgenommen.

Bradford-Reagenz

Serva Blau G-250	70	mg
Ethanol (96 %, v/v)	50	ml
H_3PO_4 (85 %, v/v)	100	ml
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml

Nach vollständigem Lösen des Farbstoffs in Ethanol und Zugabe der übrigen Bestandteile erfolgte eine Filtration durch einen Faltenfilter. Das Reagenz wurde lichtgeschützt gelagert und war ca. 1 Jahr haltbar.

2.16 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden im Bereich der linearen Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinmenge bestimmt. Eine Enzymeinheit 1 U entspricht dabei dem Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute. Die Volumenakitivitäten [U/ml] wurden nach folgender Formel berechnet.

$$U/ml = \frac{\Delta E / min \times V}{\varepsilon \times d \times v}$$

$\Delta E/min$	= Extinktionsänderung pro Minute
V	= Volumen der Küvette [ml]
ε	= Extinktionskoeffizient [ml x μmol^{-1} x cm]
d	= Schichtdicke der Küvette [cm]
v	= Volumen der eingesetzten Probe

Die spezifische Enzymaktivität [U/mg Protein] ergab sich aus der Division der Volumenaktivität [U/ml] durch die ermittelte Proteinkonzentration [mg/ml] (s. 2.15).

2.16.1 Glycerin-Dehydratase

2.16.1.1 Nach TORAYA et al. (1977)

Die Aktivität der Glycerin- bzw. Diol-Dehydratase wurde hierbei mit der 3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazon (MBTH)-Methode bestimmt. MBTH reagiert mit den Aldehyden, wie dem in der Enzymreaktion aus Glycerin entstandenen 3-Hydroxypropionaldehyd, zu einem Hydrazin-Derivat, welches spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 305 nm erfaßt werden kann (PAZ et al., 1965).

Testansatz:	280 µl	38,5 mM K-PO_4-Puffer (38,5 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4; 55 mM KCl; pH 8)
	10 µl	Glycerin (3 M)
	10 µl	Coenzym B_{12} (0,45 mM)
Start mit:	10 µl	Probe
		1 min bei 37 °C inkubieren
Stop mit:	300 µl	K-Citrat (0,1 M; pH 3,6)
	500 µl	MBTH (0,1 %)
		30 min bei 37 °C inkubieren

Messung der Extinktion bei 305 nm (Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 13{,}3 \times 10^3\ M^{-1} \times cm$). Sämtliche Puffer- und Substratlösungen wurden anaerob hergestellt. Für den Test wurden 1,5 ml-Küvetten eingesetzt, die mit einem Septum versehen und für 15 min mit Stickstoff begast worden waren.
Nach Zugabe einer frisch hergestellten anaeroben Coenzym B_{12}-Lösung und 5 min Vorinkubation im Dunkeln bei 37 °C erfolgte der Reaktionsstart. Für jede Probe wurden Parallelansätze gegen einen Leerwert (Reaktionszeit = 0) gemessen.

2.16.1.2 Nach CHASE (persönliche Mitteilung)

Die Aktivität der Glycerin- und Diol-Dehydratasen wird in diesem Test ebenfalls durch die Reaktion von MBTH mit den entstandenen Aldehyden gemessen. Das entstehende

Hydrazin-Derivat reagiert mit Fe(III) und es kommt zu einer Blaufärbung der Reaktionslösung die bei einer OD von 670 nm verfolgt werden kann.

Testsansatz:	100 µl	HEPES-Puffer (80 mM HEPES/KOH; pH 8,2)
	60 µl	Probe
	20 µl	Coenzym B_{12} (120 µM)
Start mit:	20 µl	Substrat (1,2-Propandiol oder Glycerin, 1M)

⇒ Inkubation bei 37 °C für 1 min

Stop mit:	100 µl	MBTH (6 mg/ml in Glycin/HCl-Puffer; 375 mM, pH 2,7)

⇒ Inkubation für 3 min bei 100 °C (Wasserbad oder Heizblock)

⇒ kurzes Abkühlen auf Eis

Zugabe von:	1000 µl	$FeCl_3$ x 6 H_2O (3,3 mg/ml H_2O; jeweils frisch ansetzen)

Nach einer weiteren Inkubation von 15 min bei RT konnte die Extinktion bei 670 nm bestimmt werden (Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 5{,}23 \times 10^3\ M^{-1} \times cm$). Die Verdünnung der Proben, um eine OD_{670} <1,0 zu erreichen, erfolgte mit H_2O.
Jede Probe wurde parallel gegen einen Leerwert (ohne Coenzym B_{12}) gemessen. Alle Reaktionsschritte wurden unter aeroben Bedingungen durchgeführt.

2.16.2 **Alkohol-Dehydrogenase** (RUCH et al., 1974; BOENIGK et al., 1991)

Die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenasen wurde in Oxidationsrichtung bei Raumtemperatur über die Extinktionsänderung bei 365 nm aufgrund der NAD^+-Reduktion bestimmt.

Testansatz:	870 – 970 µl	K_2CO_3-Puffer (0,1M K_2CO_3, 30 mM $(NH_4)_2SO_4$; pH 9,0)
	10 µl	NAD^+ oder $NADP^+$(180 mM)
	10 – 100 µl	Probe
Start mit:	20 µl	Substrat (5 M)

Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug immer 1 ml.

Zur Feststellung ob die identifizierten Alkohol-Dehydrogenasen auch in der Lage sind die Reduktion von Aldehyden/Ketonen zu Alkoholen zu katalysieren, wurden verschiedenen Aldehyde und Ketone als Substrate eingesetzt. Die Oxidation von NADH wurde photometrisch bei 365 nm in einer Plastikküvette (d=1) verfolgt.

Testansatz:	950 µl	Triethanolamin-Puffer (0,1 M, pH7,5)
	15 µl	NADH (24,5 mM in 0,6 M $NaHCO_3$)
	10 µl	Probe
Start mit:	10 µl	Aldehyd/Keton (1 M)

2.17 Methoden zur Proteinanreicherung

2.17.1 Metall-Chelat-Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie beruht auf der Fähigkeit bestimmter Aminosäuren z. B. Histidin als Elektronendonator, an Proteinoberflächen zu fungieren und so an Metallionen wie Ni^{2+} und Cu^{2+} zu binden (HOCHULI et al., 1988; YIP et al., 1989). Die Metallionen wiederum sind über Chelatgruppen an ein Trägermaterial (Agarose oder Sepharose) gebunden.
Die Metall-Chelat-Chromatographie besitzt im neutralen pH-Bereich ihre größte Spezifität und Effizienz. Die Elution der Proteine findet unter Verwendung eines Imidazolgradienten statt. Imidazol führt zu einer kompetetiven Verdrängung des Histidins. Alternativ kann eine Elution durch einen pH-Gradienten erfolgen.

2.17.1.1 Vorbereitung der Säule

Für die Metall-Chelat-Chromatographie wurde Ni^{2+}-Nitrilotriessigsäure-Agarose (NTA-Agarose; Fa. Qiagen GmbH) verwendet. Nach dem Einsetzen der unteren Fritte wurden 4 - 6 ml Ni^{2+}-NTA-Agarose in eine PD 10-Säule (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) eingefüllt. Nach der Sedimentation des Trägermaterials wurde die Säule mit dem Zellaufschlußpuffer gespült und bei 4 °C aufbewahrt.

2.17.1.2 Reinigung löslicher Proteine unter nativen Bedingungen

Zur Reinigung löslicher Proteine unter nativen Bedingungen wurde der Rohextrakt mit der Ni^{2+}-NTA-Agarose, die mit Zellaufschlußpuffer äquilibriert worden war, unter Rühren bei 4 °C für 1 h inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Lösung in den Säulenkörper einer PD-10 Säule gefüllt. Nach dem Absetzen der Agarose wurde diese zunächst mit einem geeigneten Volumen Zellaufschlußpuffer gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit Puffer I. Die Elution der Proteine erfolgte in mehreren Schritten mit Puffer II.
Vor einer erneuten Verwendung der Säule wurde das Chromatographiematerial mit Puffer II gespült und dann mit dem Zellaufschlußpuffer äquilibriert.

Zellaufschlußpuffer			Puffer I		
KH_2PO_4	50	mM	KH_2PO_4	50	mM
NaCl	300	mM	NaCl	300	mM
Imidazol	10	mM	Imidazol	20	mM
pH 8,0			pH 8,0		
Puffer II					
KH_2PO_4	50	mM			
NaCl	300	mM			
Imidazol	250	mM			
pH 8,0					

2.17.1.3 Regeneration der Säule

Die Notwendigkeit einer Regeneration der Ni^{2+}-NTA-Agarose wurde durch eine Farbänderung von grün-blau nach bräunlich-grau angezeigt. Durch das chelatierende Agens EDTA erfolgte die Elution des Nickels von der Säule. Nach einer anschließenden Wiederbeladung mit Ni^{2+}-Ionen stand das Säulenmaterial erneut für mehrere Reinigungszyklen zur Verfügung. Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte anhand des Herstellerprotokolls.

2.17.2 Entsalzen von Proteinlösungen

Für die Entsalzung von Proteinlösungen wurden PD10-Säulen (Fa. Amersham Pharmacia) verwendet. Das Prinzip beruht auf einer Gelfiltration an Sephadex G-25. Das Säulenmaterial musste vor Benutzung mit 25 ml des für die Elution verwendeten Puffers äquilibriert werden. Es konnten pro Lauf maximal 2,5 ml Probe aufgetragen werden, anschließend wurde mit 3,5 ml eluiert.

2.18 Inaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen

Die Inaktivierung der Dehydratasen durch Glycerin erfolgte durch Inkubation des Enzyms mit 50 µM Coenzym B_{12} bei 37 °C für 30 min in 2,5 ml HEPES-Puffer (s. 2.16.1.2) und 30 % Glycerin unter aeroben Bedingungen. Glycerin und ungebundene B_{12}-Derivate wurden mittels einer Gelfiltration abgetrennt (s. 2.17.2).

2.19 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter denaturierenden und nicht denaturierenden Bedingungen wurden in Minigel-Elektrophorese-Kammern (Fa. Bio-Rad, München) mit 8,5 x 8,0 x 0,1 cm Glasplatten durchgeführt.

2.19.1 SDS-PAGE nach SCHÄGGER und VON JAGOW (1987)

Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung (Menge für 2 Gele):

		12,5%ig		15%ig	
Trenngel:	Gelpuffer	3	ml	3	ml
	Acrylamidlösung	2,25	ml	2,7	ml
	$H_2O_{dest.}$	3,75	ml	3,3	ml
	APS-Lösung	45	µl	45	µl
	TEMED	4,5	µl	4,5	µl

Sammelgel:	Gelpuffer	1,13	ml	1,13	ml
	Acrylamidlösung	375	µl	375	µl
	$H_2O_{dest.}$	3	ml	3	ml
	APS-Lösung	45	µl	45	µl
	TEMED	4,5	µl	4,5	µl

Zunächst wurden Acrylamidlösung, Gelpuffer und $H_2O_{dest.}$ gemischt. Nach der Zugabe von TEMED und APS-Lösung wurde das Gel gegossen und mit $H_2O_{dest.}$ überschichtet, um eine ebene Fläche zu erhalten. Nach Polymerisation des Trenngels (ca. 30 min) konnte das $H_2O_{dest.}$ abgenommen und das Sammelgel gegossen werden, in das zur Formung von Geltaschen ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt wurde. Nach 30 min war das Gel vollständig polymerisiert und konnte verwendet werden.
Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:3 mit Denaturierungspuffer gemischt. Anschließend wurden die Proben auf das mit Elektrophoresepuffer überschichtete Gel mit Hilfe einer Hamiltonspritze aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von 100 V, bis die blaue Markerbande das Trenngel erreicht hatte, und wurde dann auf 130 V erhöht. Als Netzgerät diente ein Gene-Power-Supply GPS 200/400 (Fa. Amersham Pharmacia). Die Elektrophorese wurde beendet wenn die Markerbande das Gelende erreicht hatte.

Acrylamidlösung			Gelpuffer		
Acrylamid	96	g	Tris	181,7	g
Bisacrylamid	3	g	SDS	1,5	g
$H_2O_{dest.}$	ad 200	ml	$H_2O_{dest.}$	ad 500	ml
			pH 8,4		

Kathodenpuffer			Anodenpuffer		
Tris	12,1	g	Tris	24,2	g
Tricin	17,9	g	$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml
SDS	1	g	pH 8,9		
$H_2O_{dest.}$	ad 1000	ml			
pH 8,5					

Denaturierungspuffer		
Tris	0,2	g
SDS	1,2	g
Serva-Blau G250	3	mg
Glycerin	3	ml
2-Mercaptoethanol	0,5	ml
$H_2O_{dest.}$	ad 10	ml
pH 6,8		

APS-Lösung		
Ammoniumpersulfat	0,1	g
$H_2O_{dest.}$	ad 1	ml

2.19.2 Native Gradienten-PAGE

Für ein Gradientengel von 4 bis 20 % wurden Polyacrylamidlösungen folgender Zusammensetzung verwendet:

„Leichte“ Lösung

Acrylamid	4,0	g
Bisacrylamid	0,2	g
Gelpuffer	ad 100	ml

Die Lösung wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

„Schwere“ Lösung

Acrylamid	20,0	g
Bisacrylamid	1,0	g
Glycerin (87 % [v/v])	8,6	ml
Gelpuffer	ad 100	ml

Die Lösung wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Für das Trenngel von 4 bis 20 % (w/v) wurden jeweils 2 ml „Leichte“ und „Schwere“ Lösung in die Kammern eines kleinen Gradientenmischers gefüllt und unter Rühren je 3 µl TEMED und 15 µl APS-Lösung (s. 0) in die einzelnen Kammern gegeben. Nach dem Öffnen des Gradientenmischers konnte die Acrylamidlösung mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Meredos GS, Fa. Meredos, Nörten-Hardenberg) zwischen die Glasplatten gegossen werden. Anschließend erfolgte die Überschichtung des Trenngels

mit ca. 1 ml $H_2O_{dest.}$. Nach Polymerisierung des Gels für 30 min wurde das $H_2O_{dest.}$ abgenommen. Dann wurde das Sammelgel gegossen, für das 2 ml „Leichte“ Lösung, 3 µl TEMED und 15 µl APS-Lösung verwendet wurden. Direkt im Anschluß wurde ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisierung für 30 min konnte das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden und die Pufferreservoirs mit Elektrodenpuffer gefüllt werden. Nachdem der Kamm entfernt worden war, wurde zunächst eine Vorelektrophorese (100 V, 30 min) durchgeführt. Danach konnten die mit 0,1 Volumen Beschwerungslösung versetzten Proben aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C und 100 V für 20 bis 24 h.

Gelpuffer		
Tris	250	mM
pH 8,5		

Elektrodenpuffer		
Tris	0,1	M
Glycin	0,1	M
pH 8,7		

Beschwerungslösung		
Saccharose	4	g
Bromphenolblau	5	mg
$H_2O_{dest.}$	ad 10	ml

Die Beschwerungslösung wurde bei –20 °C gelagert.

2.20 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

2.20.1 Coomassie-Färbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele kurz mit $H_2O_{dest.}$ gespült und dann für 60 min in die Coomassie-Färbelösung gelegt. Nach Spülen mit $H_2O_{dest.}$ wurde das Gel entfärbt, wobei die Entfärbelösung mehrfach gewechselt wurde. Bei guter Transparenz des Hintergrundes konnten die Gele ausgewertet werden.

Coomassie-Färbelösung		
Coomassie-Blau G-250	0,08	% (w/v)
Coomassie-Blau R-250	0,08	% (w/v)
Methanol	45	% (v/v)
Eisessig	10	% (v/v)

Entfärbelösung		
Methanol	33	% (v/v)
Eisessig	10	% (v/v)

2.20.2 **Aktivitätsfärbung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen** (TOBIMATSU et al., 1995)

Die Aktivitätsfärbung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen erfolgte entsprechend der für die 1,2-Propandiol-Dehydratase aus *Klebsiella oxytoca* entwickelten Methode von TOBIMATSU et al. (1995). Die Methode beruht darauf, daß das durch die Coenzym B_{12}-abhängige Dehydratisierung von 1,2-Propandiol gebildete Propionaldehyd mit dem Farbstoff 2,4-Dinitrophenylhydrazin ein gelbes Präzipitat bildet. Da Glycerin-Dehydratasen neben Glycerin ebenfalls 1,2-Propandiol dehydratisieren, konnte die Aktivitätsfärbung mit allen vorliegenden Enzymen durchgeführt werden.

Zur Identifizierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen in Rohextrakten, wurde eine native Gradienten-PAGE (s. 2.18.2) durchgeführt. Dabei wurde dem Elektrodenpuffer 1,2-Propandiol (Endkonzentration 100 mM) zugesetzt. Die Elektrophorese wurde durchgeführt, bis die Farbmarkerbande das Gelende erreicht hatte. Das Proteingel wurde dann in 100 ml Reaktionspuffer überführt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionspuffer entfernt und 100 ml Färbelösung zugefügt. Während einer nachfolgenden 15-minütigen Inkubation bei 37 °C kam es zur Bildung des gelben Präzipitats. Anschließend wurde der Hintergrund durch Inkubation in 2 M HCl entfärbt. Alle Schritte der Aktivitätsfärbung wurden unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Der Reaktionspuffer wurde jeweils frisch angesetzt; Coenzym B_{12} im Dunkeln (unter N_2-Begasung) in H_2O gelöst und erst unmittelbar vor Reaktionsstart zugegeben.

<u>Reaktionspuffer</u>

K-Phosphat-Puffer (pH 8,0)	35 mM
KCl	50 mM
1,2-Propandiol	100 mM
Coenzym B_{12}	15 µM

<u>Färbelösung:</u>

2,4-Dintrophenylhydrazin 0,4 % (w/v in 2M HCl)

Die Färbelösung konnte mehrfach verwendet werden.

2.21 Molekularmassenbestimmung

2.21.1 Molekularmassenbestimmung durch SDS-PAGE

SDS lagert sich an Proteine an und zerstört fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen, so daß die Dissoziation von Proteinen in ihre Untereinheiten erreicht wird. Durch die Bindung des negativ geladenen Detergens wird die Eigenladung der Proteine weitgehend vernachlässigbar und damit eine gelelektrophoretische Auftrennung ermöglicht, die nahezu ausschließlich auf der Masse der Moleküle beruht. Nach der SDS-PAGE und Färbung der Proteine konnte die Molekularmasse eines Proteins ermittelt werden, indem dessen Wanderungsgeschwindigkeit mit der von Markerproteinen verglichen wurde. Die Auftragung des Logarithmus der Molekularmassen der Markerproteine gegen den Rf-Wert (Wanderungsstrecke des Proteins bezogen auf die Wanderungsstrecke des Farbstoffmarkers) ergibt eine Eichgerade, anhand derer die Molekularmasse des jeweiligen Proteins berechnet werden konnte. Als Markerproteine wurden die Proteine des „LMW Calibration“-Kits (Fa. Amersham Pharmacia) eingesetzt.

Markerproteine „LMW Calibration“-Kit

Phosphorylase b	94	kDa
Rinderserumalbumin	67	kDa
Ovalbumin	45	kDa
Carboanhydrase	30	kDa
Trypsininhibitor	20,1	kDa
Laktalbumin	14,4	kDa

2.21.2 Molekularmassenbestimmung durch Gradienten-PAGE (ANDERSON et al., 1972; NISHIZAWA et al., 1988)

Die Auftrennung von Proteinen im nativen Polyacrylamid-Gradientengel (s.2.19.2) hängt in erster Linie von der Größe der Proteine ab. Mit steigender Acrylamidkonzentration nimmt die Porengröße ab und so wird das Weiterwandern von

größeren Proteinen verhindert. Die Eigenladung der Proteine ist hier theoretisch vernachlässigbar (MARGOLIS und KENRICK, 1967).
Nach Auftrennung durch native Gradienten-PAGE (s. 2.19.2) und Anfärben der Proteinbanden (s. 2.20.1) konnte die Molekularmasse von Proteinen ermittelt werden, indem die Wanderungsstrecke mit der von Markerproteinen verglichen wurde. Als Markerproteine wurde der „HMW Calibration"-Kit (Fa. Amersham Pharmacia) eingesetzt.

Markerproteine „HMW Calibration"-Kit

Protein	Molekularmasse	RF-Wert
Thyroglobin	669 kDa	0,453
Ferritin	440 kDa	0,570
Katalase	232 kDa	0,651
Laktat-Dehydrogenase	140 kDa	0,714
Rinderserumalbumin	67 kDa	0,957

2.22 Chemikalien, Enzyme und Gase

Es wurden Chemikalien des handelsüblichen Reinheitsgrades der Firmen Boehringer (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Hannover), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) verwendet. Des Weiteren wurde mit Biochemikalien, Enzymen etc. folgender Firmen gearbeitet:

- Amersham Pharmacia, Freiburg:
  Nylonmembranen, NAP-5-Säulen PD10-Säulen
- Biozym GmbH, Hess. Oldendorf
  Elektroporationsküvetten
- Eurogentec, Seraing, Belgien:
  Agarose
- Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg:
  IPTG, X-Gal, Ampicillin, Proteinase K
- Gibco BRL, Eggenstein:
  Random Primed Labeling Kit

- Hartmann Analytic, Braunschweig:
  [α-32P]-dATP
- Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
  pET Directional TOPO Expression Kit, TOPO TA Cloning Kit, Platinum *Pfx*-DNA-Polymerase
- MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot:
  Taq-DNA-Polymerase, T4-DNA-Ligase, Ladder-Mix, Nukleotide, Restriktionsendonukleasen
- Messer Griesheim GmbH, Kassel:
  Gase (N_2, H_2, N_2/CO_2)
- Metabion, Martiensried
  Oligonukleotide
- Millipore, Eschborn:
  Mikrodialyse-Filter
- New-England Biolabs GmbH, Freiburg:
  Restriktionsendonukleasen, Deep-Vent DNA Polymerase
- Promega, Deutschland GmbH, Mannheim:
  Wizard™ *Plus* Minipreps DNA Purificaton System, *Pfu*-DNA-Polymerase
- Qiagen GmbH, Hilden:
  Plasmid Midi-Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiaquick PCR-Purification-Kit; Qiaquick Gel Extraction Kit, RNA/DNA Maxi Kit
- Sartorius AG, Göttingen:
  Sterilfilter
- Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen:
  Coenzym B_{12}, Cyano-B_{12}, Hydroxy-B_{12}, Methyl-B_{12}
- Stratagene, USA:
  Gigapack® III Gold Packaging Extract,Herculase enhanced DNA Polymerase
- Whatman, Maidstone, England:
  Whatman-Filterpapier 3MM

3 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

Die Charakterisierung und Nutzbarmachung der bisher weitgehend unerschlossenen mikrobiellen Diversität sind die Hauptziele der Metagenomforschung (RONDON et al., 2000). Diese nutzt die Gesamtheit der in einem Habitat, wie Boden oder Sediment, vorhandenen genetischen Information, einerseits als Quelle für neuartige Enzyme und Wirkstoffe und andererseits zur genomischen Charakterisierung von nicht-kultivierten Mikroorganismen. Daraus ergeben sich interessante Ansätze sowohl für die angewandte als auch für die Grundlagenforschung.

Systematische Untersuchungen verschiedener Standorte, bei denen universell konservierte Genmarker, meist die 16S rRNA Gene, mit Hilfe der PCR direkt aus isolierter Umwelt-DNA amplifiziert und sequenziert wurden, haben gezeigt, dass die bisher bekannten und systematisch erfaßten Organismen nur einen Bruchteil der tatsächlichen vorhandenen Anzahl ausmachen (MUYZER et al., 1992; BORNEMANN et al., 1996; BORNEMANN und TRIPLETT, 1997; SCHLEPER und ECK, 2000).

Eine notwendige Voraussetzung, um dieses enorme Potential an metabolischen und physiologischen Fähigkeiten zu erforschen und auch für die industrielle Nutzung zugängig zu machen, war die Konstruktion von komplexen Genbanken aus Umweltproben. In einigen wenigen Untersuchungen konnten so Enzyme verschiedener Klassen identifiziert und charakterisiert werden. Dazu gehörten z.B. Lipasen/Esterasen (HENNE et al., 2000; RONDON et al., 2000), Na^+/H^+-Antiporter (MAJERNIK et al., 2001) und antibakterielle Wirkstoffe (RONDON et al., 2000; OSBURNE et al., 2001; BRADY et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit werden Weiterentwicklungen zur Konstruktion und zur Durchmusterung von Metagenomgenbanken vorgestellt. Die DNA wurde nach Anreicherung mit verschiedenen C-Quellen nach der Methode der direkten Lyse aus den Umweltproben isoliert und gereinigt (ZHOU et al., 1996). Für die Konstruktion der Genbanken diente *Escherichia coli* als Wirtsorganismus und pBluescript SK^+ als Vektor. Anschließend wurden die Genbanken auf das Vorhandensein von Genen für neuartige Glycerin- und Diol-Dehydratasen sowie für Alkohol-Oxidoreduktasen hin untersucht.

3.1 Konstruktion von Metagenombanken in *Escherichia coli*

Zur Identifizierung neuartiger, industriell interessanter Enzyme wurden in der vorliegenden Arbeit vier Metagenombanken aus Umweltproben erstellt. Des Weiteren konnten bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe konstruierte Genbanken aus natürlichen Habitaten für die verschiedenen Durchmusterungsverfahren verwendet werden (s. 3.3.3).

3.1.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus verschiedenen Umweltproben

Für die Konstruktion der Metagenombanken wurden vier verschiedene Standorte ausgewählt. Es handelte sich dabei um eine Bodenprobe von einem Zuckerrübenfeld (ZR) in der Nähe von Göttingen und um drei unterschiedliche Sedimentproben aus dem Fluss Grone (GII) bei Göttingen, dem Solar Lake (SL; Sinai, Ägypten) und aus dem Golf von Eilat (GE; Israel) (s. Abb. 8).
Um den Mikroorganismen in den Boden- und Sedimentproben einen Wachstumsvorteil zu verschaffen, die die später identifizierten Zielgene für Glycerin- bzw. Diol-Dehydratasen und Polyol-Oxidoreduktasen (s. 3.2 und 3.3) enthielten, wurde vor der DNA-Isolierung ein Anreicherungschritt durchgeführt. Diese Vorgehensweise war zuvor von ENTCHEVA et al. (2001) und HEALY et al. (1995) erfolgreich zur Isolierung von neuen Biotinbiosynthese- und Cellulase-Genen eingesetzt worden. Zu diesem Zweck wurden je 50 g der Standortproben mit 500 ml M9-Mineralmedium (s. 2.2.4) überschichtet, das je 50 mM Glycerin und 1,2-Propandiol als Kohlenstoffquellen enthielt. Das Gemisch wurde anschließend für 20 min mit N_2 durchgast und unter anaeroben Bedingungen bei 30° C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Proben pelletiert, mit frischem Medium überschichtet und für einen weiteren Tag inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zusammen mit der Boden- oder Sediment-Matrix geerntet und als Material für die DNA-Isolierung genutzt. Die Anreicherung der Polyol-verwertenden Organismen konnte zum einen durch eine leichte Trübung des Mediums als auch durch den gaschromatographischen Nachweis von erwarteten Produkten, wie 1,3-Propandiol verfolgt werden (Daten nicht gezeigt).

D)

C)

Abbildung 8: Ausgewählte Standorte zur Entnahme von Boden- und Sedimentproben
Dargestellt sind die Standorte Grone II (A), Solar Lake (B), Golf von Eilat (C) und ein Zuckerrübenfeld bei Göttingen (D).

Die Präparation der Roh-DNA erfolgte nach der Methode der direkten Lyse der Zellen von ZHOU et al. (1996). Mit dieser Methode kann sowohl die DNA aus den Bodenbakterien als auch frei vorliegende DNA isoliert werden. Der Zellaufschluß erfolgte dabei durch eine ausgedehnte Hitzeinkubation in einem Hochsalzextraktionspuffer in Anwesenheit von SDS, CTAB, EDTA und Proteinase K. Nach Abtrennung aller Boden- und Zellpartikel wurde die DNA mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und anschließend mit Isopropanol gefällt (s. 2.6.1). Bei dieser Methode der DNA-Isolierung wurden je nach Probenzusammensetzung unterschiedliche Mengen an Matrix-Bestandteilen, wie z.B. Huminsäuren, koextrahiert. Dies machte sich durch eine Braunfärbung der Präparation bemerkbar. Wie erwartet war der Anteil der isolierten Huminstoffe in der Bodenprobe am größten. Eine deutlich geringere Färbung zeigte sich bei der Roh-DNA aus dem Grone-Sediment. Die Präparationen aus Solar Lake- und Golf von Eilat-Sediment waren beinahe farblos.

Huminsäuren inhibieren Restriktionsenzyme, Polymerasen und Ligasen (TEBBE und VAHJEN, 1993), die Werkzeuge der nachfolgenden Genbank-Konstruktion. Mit Hilfe des „Wizard DNA Purification System" und einer anschließenden Anionenaustauschchromatographie an Qiagen-tip-100-Säulen konnten sie jedoch weitgehend abgetrennt werden. Die DNA aus den Proben SL und GE wurde aufgrund der geringen Verunreinigungen lediglich durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt.

Aus dem „angereicherten" Standort-Material konnten auf diese Weise je g Probe zwischen 15 und 28 µg hochmolekulare, gereinigte DNA isoliert werden (s. Tab. 6), die nachfolgend für die Konstruktion von Metagenomgenbanken genutzt wurden.

Tabelle 6: **DNA-Ausbeuten aus den verschiedenen Standorten nach Anreicherung von Polyol-fermentierenden Mikroorganismen**
Die Bestimmung der DNA-Mengen erfolgte durch Abschätzen der Intensität von Banden im Agarosegel.

Standort/Bezeichnung	DNA-Menge [µg/ g Probe]
Zuckerrübenboden/ZR	28
Sediment Grone/GII	25
Sediment Golf von Eilat/GE	15
Sediment Solar-Lake/SL	15

3.1.2 Klonierung der Umwelt-DNA

Es wurde angestrebt DNA-Fragmente > 3 kBp zu klonieren. Die Gene der bisher bekannten B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen umfassen eine Region von 2,6 bis 2,9 kBp (DANIEL et al., 1998). Bei den Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität vermittelnden Genen handelt es sich um eine sehr viel heterogenere Gruppe. Die Längen einiger bisher untersuchter Gene liegen in einem Bereich von ca. 0,75 bis 1,8 kBp (REID und FEWSON, 1994).

Für die Konstruktion der Genbanken wurde der Vektor pBluescript SK^+ ausgewählt. Dieser Plasmidvektor wird in *E. coli* in hoher Kopienzahl gebildet und eignet sich besonders für die Klonierung von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe von 10 kBp. Die Selektion der Transformanten erfolgt durch die auf dem Vektor kodierte

Ampicillin-Resistenz, außerdem ermöglicht das ebenfalls vorhandene *lacZ*-Gen die Identifizierung von rekombinanten Plasmiden durch den X-Gal-Test (s. 2.10.4).

Die gereinigte Umwelt-DNA wurde zunächst zeitlimitiert mit dem Restriktionsenzym *Bsp*143I (ein Isoschizomer von *Sau*3AI) partiell verdaut (s. 2.8.1), um eine statistische Verteilung aller vorkommenden DNA-Fragmente zu gewährleisten. Der Verlauf der DNA-Spaltung wurde dabei in einem Zeitraum von 10 min durch 6 bis 8 Probennahmen und anschließender Analyse in Agarosegel (s. Abb. 9B) überprüft (s. 2.7.1). Um die Klonierung von sehr kleinen DNA-Fragmenten (< 1,0 kBp) zu verhindern, wurde die DNA in einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation größenfraktioniert (s. 2.9). Nach der Zentrifugation erfolgte die Fällung der DNA und die Größe der DNA-Fragmente in den entnommenen Aliquots wurde überprüft (s. Abb. 9C). Fraktionen, die DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 2 und 15 kBp enthielten, wurden für die Ligation in den Plasmidvektor pBluescript SK^+ verwendet. Nach der Transformation in *E. coli* DH5α (s. 2.10.1) wurden die Transformanten auf LB-Ampicillin-Agar, der mit X-Gal und IPTG versetzt war, ausplattiert. Zur Konservierung der so erstellten Genbanken wurden alle Klone von den Platten abgeschwemmt, die Plasmide isoliert und bei -20 °C gelagert.

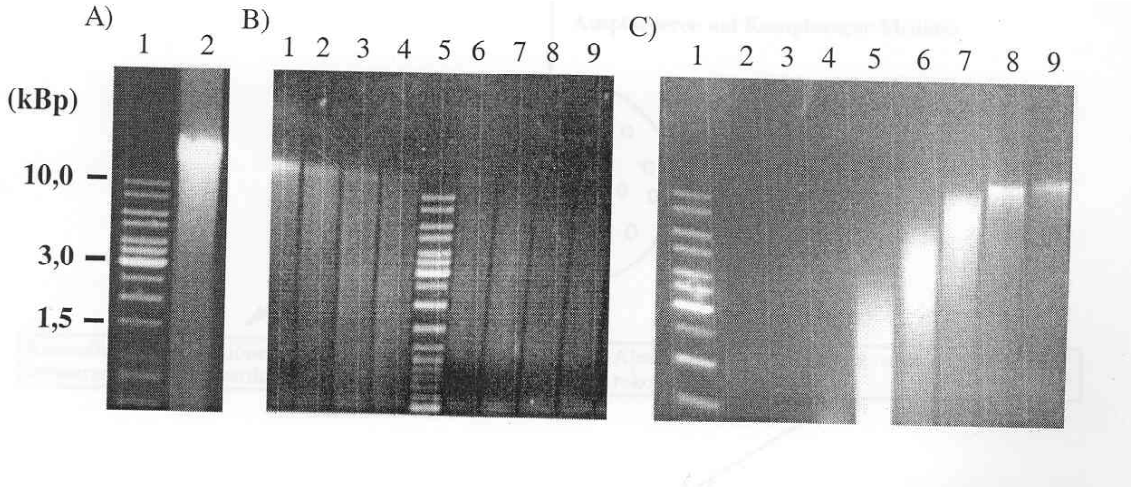


Abbildung 9: Isolierung von chromosomaler Standort-DNA zur Konstruktion von Metagenombanken
A) Spur 2: Unverdaute chromosomale DNA; B) Spuren 1-4 und 6-9: Proben partiell verdauter Standort-DNA in einem Zeitraum von 10 min (Restriktionsenzym *Bsp*143I); C) Spuren 2-9: DNA-Aliquots ausgewählter Fraktionen nach Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation. In den Spuren A)1, B)5 und C)1 ist jeweils der Längenstandard aufgetragen.

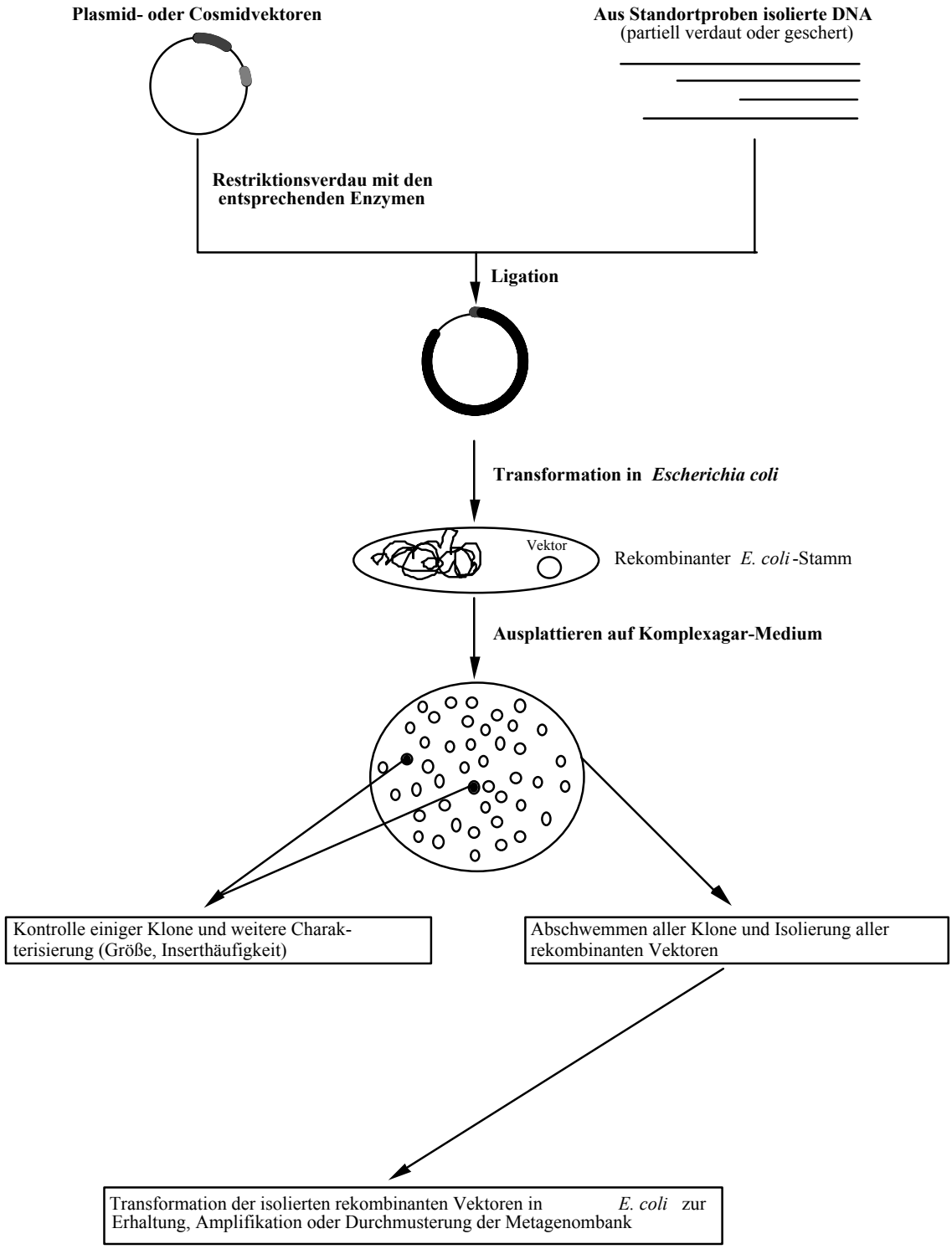


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Konstruktion von Metagenombanken in Plasmidvektoren

3.1.3 Charakterisierung der konstruierten Metagenombanken

Aus den vier verwendeten Boden- und Sedimentproben wurden Genbanken mit unterschiedlichen Eigenschaften gewonnen, die in Tabelle 7 zusammengefasst sind. Zur Charakterisierung wurden Parameter wie die Gesamtzahl der rekombinanten Plasmide, die durchschnittliche Inserthäufigkeit und die durchschnittliche Insertgröße bestimmt. Die Inserthäufigkeit konnte durch den X-Gal-Test (s. 2.10.4) ermittelt werden. Zur Analyse der Insertgrößen wurden je Genbank 30 *E. coli*-Klone in LB-Medium (s. 2.2.1) angezogen, die Plasmide isoliert und mittels Restriktionsverdau mit verschiedenen Enzymen untersucht. Dabei wurden neben der durchschnittlichen Insertgröße die Daten der jeweils kleinsten und größten gefundenen Inserts festgehalten (s. Tab. 7).

Die Gesamtzahl der abgeschwemmten, Insert-tragenden *E. coli*-Klone betrug 63200 für den Standort Golf von Eilat, 46700 für das Sediment der Grone. Für den Standort Zuckerrübenboden wurden 71050 und für die Anreicherungsgenbank aus dem Sediment des Solar Lake 37300 rekombinante Plasmide gezählt. Die ermittelten durchschnittlichen Insertgrößen lagen bei 3,3 bis 5,6 kBp, wobei Insert-Fragmente bis zu einer Größe von 12,8 kBp gefunden wurden. Der Anteil der Insert-tragenden Plasmide lag bei 60 bis 78 %.

Die Genbanken, die im Folgenden mit GEA (Golf von Eilat Anreicherung); GIIA (Grone II Anreicherung), ZRA (Zuckerrübenboden Anreicherung) und SLA (Solar Lake Anreicherung) bezeichnet werden, waren somit gut für die Durchmusterung auf das Vorhandensein unterschiedlicher Zielgene geeignet.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Eigenschaften der Plasmid-Genbanken aus den Standortproben Golf von Eilat (GEA), Grone (GIIA), Zuckerrübenboden (ZRA) und Solar Lake (SLA)
Die Insertgrößen wurden durch Isolierung (s. 2.6.6.2) und Restriktionsverdau (s. 2.8.1) von 30 Plasmiden ermittelt. Die Bestimmung des Anteils der Insert-tragenden Plasmide erfolgte durch den X-Gal-Test (s. 2.10.4). Dazu wurde je Genbank 1 µl Plasmid-DNA in *E. coli* DH5α transformiert (s. 2.10.1) und die Transformanten wurden auf LB-Agar, der mit Ampicillin, X-Gal und IPTG versetzt war, ausplattiert.

Standort/ Bezeichnung der Genbank	Anzahl rekomb. Plasmide	minimale Insertgröße [kBp]	maximale Insertgröße [kBp]	∅ Insert-größe [kBp]	Insert-häufigkeit [%]
Golf von Eilat/ GEA	63200	2,1	12,8	5,6	60
Grone/ GIIA	46700	0,7	5,5	3,3	78
Solar Lake/ SLA	37300	0,7	12,4	4,0	66
Zuckerrübenfeld/ZRA	71050	1,0	11,1	5,4	71

3.2 Isolierung von RNA aus Umweltproben

Ein Lücke beim Screening der Metagenombanken ist, dass dabei keine Wirkstoffe und Biokatalysatoren eukaryotischer Herkunft erhalten werden, obwohl besonders niedere Pilze eine Reihe von ökonomisch bedeutenden Enzymen und biologisch aktiver Substanzen synthetisieren. Dazu gehören verschiedene Antibiotika sowie Lipasen und Proteasen, die in der Waschmittelindustrie eingesetzt werden. Zur Konstruktion von Metagenombanken wird bisher zumeist *E. coli* als Wirt verwendet, der jedoch nicht in der Lage ist, die eukaryotische DNA zu transkribieren und die gebildete RNA zu prozessieren. Eine mögliche Methode zur Umgehung dieses Problems ist die Isolierung intakter eukaryotischer Poly(A)-mRNA aus Umweltproben, Umschreibung in cDNA und die Konstruktion von cDNA-Genbanken. Die RNA/DNA-Rate ist außerdem ein wichtiger Indikator für den metabolischen Status der mikrobiellen Gemeinschaft eines Standortes (HURT et al., 2001). Da RNA nicht so stabil ist wie DNA, ist die Extraktion von intakter mRNA eine schwierige, technologische Herausforderung.

Mit der im Folgenden vorgestellten Methode konnten sowohl DNA als auch RNA parallel aus einer Probe isoliert werden. Sie wurde in Anlehnung an die Methode von

ZHOU et al. (1996) zur Isolierung von chromosomaler DNA aus Bodenproben entwickelt (s. Abb. 11).

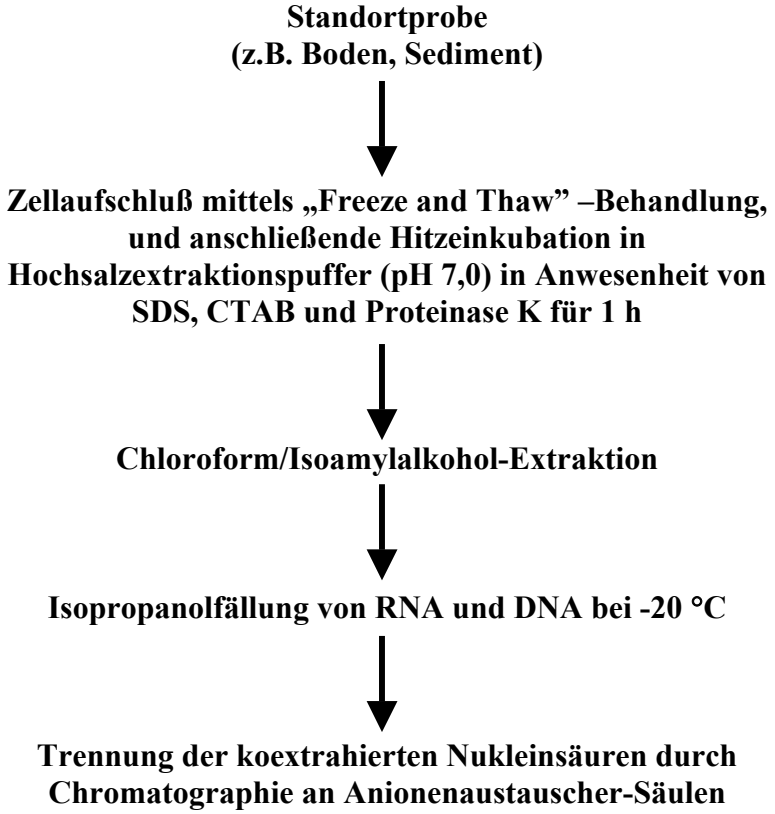


Abbildung 11: Methode zur Isolierung von RNA und DNA aus Standort-Proben (HURT et al., 2001; modifiziert)

Zur Stabilisierung der RNA wurde der pH-Wert des Extraktionspuffers (DEP-Puffer, s. 2.6.1) auf 7,0 gesenkt und die Hitzeinkubation bei 65 °C auf 1 h verkürzt. Im Weiteren wurde zum Aufschluß der Zellen ein sogenannter „Freeze and Thaw"-Schritt eingefügt bei dem die Proben zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend auf Eis wieder aufgetaut wurden. Die Trennung von RNA und DNA erfolgte an Anionenaustauscher-Säulen. Die beschriebene Methode wurde mit der Sedimentprobe aus der Grone (GII) sowie der Bodenprobe des Zuckerrübenfeldes (ZR) durchgeführt. Sowohl RNA als auch DNA ließen sich auf diese Weise isolieren (s. Abb. 12). Beide Lösungen zeigten jedoch die typische braune Verfärbung durch die die Koextraktion von Huminsäuren angezeigt ist. Die Bestimmung der optischen Dichte der Nukleinsäure-Lösungen bei 260 nm erbrachte Werte von 0,3 bzw. 2,1 mg isolierter RNA je 100 g eingesetzter Bodenprobe.

Abbildung 12: Isolierung von RNA und DNA aus Umweltproben
A) Spur 1: Koextrahierte DNA und RNA; B) Spur 1: Längenstandard, Spur 2: DNA nach Trennung über die Anionenaustauscher-Säule, Spur 3: RNA nach Trennung über die Anionenaustauscher-Säule.

Zur Überprüfung, ob in der isolierten RNA auch eukaryotische RNA vorhanden ist, wurde die Poly(A)-mRNA durch eine Chromatographie an Polystyren-Latex-Partikeln von den anderen RNA-Typen getrennt. Die Mehrheit der von Eukaryoten gebildeten mRNA besitzt ein solches Poly(A)-Segment, das zwischen 50 und 150 Nukleotide lang ist. Die Funktion dieser angehängten Nukleotide ist bisher unklar (KOZAK, 1983). Das Prinzip der Trennung der mRNA von anderen RNA-Typen beruht auf der Bindung des Poly(A)-Restes an ein dT-Oligomer, welches an eine solide Phase einer Säule gekoppelt ist. Durch photometrische Bestimmung der RNA-Menge bei einer Wellenlänge von 260 nm konnten geringe Mengen von Poly(A)-mRNA nachgewiesen werden (s. Tab. 8). Die Messungen ergaben eine Menge von 1,9 µg Poly(A)-mRNA je 100 g der Zuckerrübenfeldprobe. Im Eluat des Grone-Präparats konnte keine RNA mehr detektiert werden. Möglicherweise war die hier zur Reinigung der Poly(A)-mRNA eingesetzte Menge Gesamt-RNA zu gering.

Tabelle 8: RNA-Ausbeuten aus den Standorten Grone-Sediment (GII) und Zuckerrübenboden (ZR)
Die Bestimmung der RNA-Mengen erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (s. 2.5.3.6). Die Mengenangaben beziehen sich auf je 100 g verwendeter Standortprobe.

Standort/Bezeichnung	Gesamt RNA-Menge [µg]	Anteil der Poly(A)-mRNA [µg]
Grone/GII	341	nicht nachweisbar
Zuckerrübenboden/ZR	2067	1,9

3.3 Durchmusterung der Metagenombanken auf Gene für Glycerin- und Diol-Dehydratasen

Glycerin- und die isofunktionellen Diol-Dehydratasen sind die Schlüsselenzyme des anaeroben Abbaus von Glycerin bzw. 1,2-Propandiol und kommen sowohl bei den Gram-positven als auch den Gram-negativen Bakterien vor. Dazu gehören u.a. die Enterobakterien wie *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Citrobacter*, aber auch Vertreter der Propionsäurebakterien, lösungsmittelbildenden Clostridien und Lactobacilli (DANIEL et al., 1998). Die Dehydratasen sind von großer ökonomischer Bedeutung, da sie in der biotechnologischen Produktion von 1,3-Propandiol eine wichtige Rolle spielen. 1,3-Propandiol wird u.a. als Ausgangsubstanz für die Herstellung verschiedener Polyester, Polyurethane und biologisch-abbaubarer Polymere genutzt. Kürzlich wurde von den Firmen Genencor International und DuPont ein Produktionsprozess entwickelt, in dem mit Hilfe eines rekombinanten *E. coli*-Stammes 1,3-Propandiol direkt aus Glukose gewonnen wird (CHOTANI et al., 2000).

Alle bisher charakterisierten, Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen setzen Substrate wie z.B. Glycerin, 1,2-Propandiol oder 1,2-Ethandiol in einem radikalischen Mechanismus zu den entsprechenden Aldehyden um. Beide Dehydratase-Typen bestehen aus drei strukturellen Untereinheiten und bilden im nativen Zustand einen Komplex aus $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist die sogenannte „suicide"-Inaktivierung die bei der Katalysereaktion mit Glycerin *in vitro* schon nach wenigen Minuten einsetzt (DANIEL et al., 1998). Für die Dehydratasen aus *C. freundii*, *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* konnten in den

vergangenen Jahren die Reaktivierungsfaktoren für die Glycerin-inaktivierten Enzyme identifiziert und charakterisiert werden (MORI et al. 1997; TORAYA und MORI, 1999; SEIFERT et al., 2001; KAJIURA et al. 2001).
Für die Durchmusterung der Metagenombanken zur Identifizierung neuartiger Glycerin- und Diol-Dehydratasen wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet. Das erste beruhte auf der enzymatischen Aktivität der gesuchten Genprodukte (s. 3.3.1) und das zweite auf Sequenzähnlichkeiten zu bereits bekannten Dehydratase-Genen (s. 3.3.2).

3.3.1 Durchmusterung auf der Grundlage von Enzymaktivität

3.3.1.1 Stand der Vorarbeiten

Für die Durchmusterung von Metagenombanken ist die Verwendung von einfachen Plattentests von großem Vorteil, da eine große Anzahl von Klonen zu untersuchen ist (HENNE et al., 1999; HENNE et al., 2000; DANIEL, 2002). Als eine besonders vorteilhafte und spezifische Methode hat sich die Verwendung von Defektmutanten erwiesen, die nur nach heterologer Komplementation durch die Zielgene zum Wachstum befähigt sind (MAJERNIK et al., 2001).
Zur Durchführung eines derartigen Verfahrens habe ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit einen speziellen Screeningstamm konstruiert, der alle Gene für den anaeroben Abbau von Glycerin aus *C. freundii* mit Ausnahme der Glycerin-Dehydratase plasmidkodiert enthielt (KNIETSCH, 1999). Der Screening-Stamm *E. coli* ECL707/pAK1 trägt die Gene für die Glycerin-Dehydrogenase, die Dihydroxyaceton-Kinase und die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase auf dem Plasmid pAK1 (s. Abb. 13). Somit war der Stamm in der Lage, unter aeroben Bedingungen mit Glycerin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (KNIETSCH, 1999), für das anaerobe Wachstum jedoch benötigte er ein Kosubstrat wie Na-Pyruvat als externen Akzeptor von Reduktionsäquivalenten oder mußte durch eine Glycerin- oder Diol-Dehydratase komplementiert werden. Das Plasmid pAK1 trug eine Chloramphenicol-Resistenz als Selektionsmarker und nutzte den Replikationsursprung des p15A-Replikons. Der Vektor war somit kompatibel mit dem Plasmid pBluescript SK^+ (Replikationsursprung des Replikons pMB1), das für die Konstruktion der Genbanken verwendet wurde.

Um zu zeigen, dass der konstruierte Stamm tatsächlich für ein Screening auf neuartige Glycerin-Dehydratasen geeignet ist, wurden Komplementationsversuche mit den Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und *Clostridium pasteurianum* durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Plasmide pMS2, (SEYFRIED et al., 1996), pFL1 (LUERS, 1997) und pLM3 (MACIS et al., 1998), welche die entsprechenden Dehydratase-Gene enthielten, durch Elektroporation in *E. coli* ECL707/pAK1 übertragen und die Transformanten anschließend unter anaeroben Bedingungen auf M9-Mineralmedium mit Glycerin als einziger Kohlenstoff und Energiequelle inkubiert (s. 2.2.4). Alle drei Plasmide waren in der Lage, *E. coli* ECL707/pAK1 zu komplementieren. Ferner zeigten die entsprechenden Klone Dehydratase-Aktivität und 1,3-Propandiol-Bildung. Somit war der Stamm für eine Durchmusterung der Genbanken auf Gene für Glycerin- und Diol-Dehydratasen geeignet.

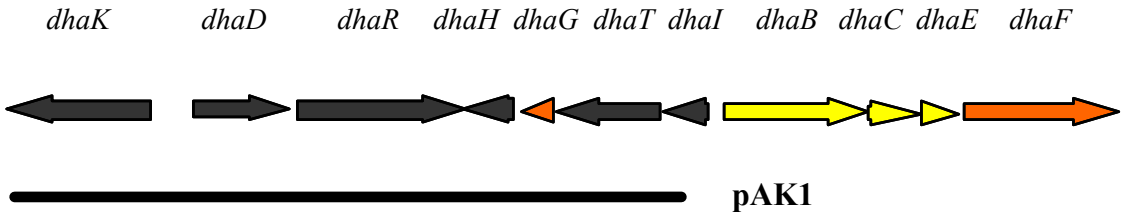


Abbildung 13: Genetische Organisation des *dha*-Regulons aus *C. freundii* und schematische Darstellung der klonierten Region im Plasmid pAK1
Die im *dha*-Regulon von *C. freundii* zusammengefassten Gene kodieren für folgende Proteine: *dhaK*: Dihydroxyaceton-Kinase; *dhaD*: Glycerin-Dehydrogenase; *dhaR*: Regulator-Protein; *dhaH*, *dhaI*: bisher unbekannte Funktion, potentielle Adenosyltransferase; *dhaG*, *dhaF*: Reaktivierungsfaktor der Glycerin-Dehydratase; *dhaT*: 1,3-Propandiol-Dehydrogenase; *dhaB*, *dhaC* und *dhaE*: Untereinheiten der Glycerin-Dehydratase.

3.3.1.2 Durchmusterung durch Komplementation des *E. coli*-Stammes ECL/707/pAK1

Für das Screening der zuvor konstruierten Anreicherungsgenbanken GEA, GIIA, ZRA und SLA (s. 3.1) wurden die Genbank-Plasmide in den Stamm *E. coli* ECL707/pAK1 übertragen. Die Transformanten wurden anschließend unter anaeroben Bedingungen auf

M9-Mineralmedium (s. 2.2.4) mit Glycerin oder 1,2-Propandiol (100 mM) als einziger C- und Energiequelle ausplattiert. Des Weiteren enthielt das Medium Coenzym B_{12}, den Kofaktor der bekannten Dehydratasen sowie eine Vitamin- und eine Spurenelementelösung, um auch Enzyme mit möglicherweise völlig anderen Bedürfnissen detektieren zu können.

Je Genbank wurden zwischen 80000 und 240000 Klone auf das Vorhandensein von Genen für Glycerin- und Diol-Dehydratasen überprüft (s. Tab. 9). Beim initialen Screening wurden 2 positive Klone gefunden. Zur Überprüfung des Phänotyps wurden aus diesen rekombinanten Klonen die Plasmide isoliert und erneut in *E. coli* ECL707/pAK1 transformiert. Beide Plasmide vermittelten einen stabilen Phänotyp. Diese wurden mit pAK2 und pAK8 bezeichnet. Die entsprechenden Klone *E. coli* ECL707/pAK1 /pAK2 und *E. coli* ECL707/pAK1 /pAK8 waren zum anaeroben Wachstum auf Glycerin in der Lage und zeigten auch signifikante Dehydratase-Aktivität in den Rohextrakten (s. Tab. 10). Durch Restriktionsanalysen mit verschiedenen Enzymen konnten für die beiden Plasmide Insertgrößen von 7,2 kBp (pAK2) und 6,5 kBp (pAK8) ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Außerdem wurde durch Enzymtests das Vorhandensein von weiteren im dha-Regulon kodierten Genprodukten überprüft. Die Plasmide pAK2 und pAK8 wurden dafür in *E. coli* ECL707 transformiert und die Enzymaktivitäten in den Rohextrakten bestimmt. Sowohl für *E. coli* ECL707/pAK2 als auch für *E. coli* ECL707/pAK8 konnte zusätzlich eine signifikante Aktivität der 1,3-Propandiol-Dehydrogenase gemessen werden (s. Tab. 10). Als Referenz diente der Rohextrakt von *E. coli* ECL707 ohne zusätzliches Plasmid. Aktivitäten für die ebenfalls im *dha*-Regulon kodierte Glycerin-Dehydrogenase und die Dihydroxyaceton-Kinase konnten nicht detektiert werden. Die Ergebnisse der Sequenzierung der Plasmide und weiterer biochemischer Untersuchungen sind in Kapitel 3.2.3 dargestellt.

Tabelle 9: **Screening der Metagenombanken auf Gene für Glycerin- und Diol-Dehydratasen durch Komplementation von *E. coli* ECL707/pAK1**
Das Screening wurde durch Transformation von je 1 µl Plasmidgenbank in den Stamm *E. coli* ECL707/pAK1 durchgeführt. Die Transformanten wurden bei 30 °C unter anaeroben Bedingungen auf M9-Mineralmedium (s. 2.2.4) mit 100 mM Glycerin oder 1,2-Propandiol als C- und Energiequelle inkubiert.

Genbank	Anzahl getesteter Klone	Positive *E. coli*-Klone nach initialem Screening	Positive *E. coli*-Klone mit stabilem Phänotyp	Bezeichnung der Aktivität-vermittelnden Plasmide
GIIA	80000	1	1	pAK8
ZRA	240000	1	1	pAK2
SLA	240000	-	-	-
GEA	90000	-	-	-

Tabelle 10: **Spezifische Aktivitäten der Glycerin-Dehydratasen und der 1,3-Propandiol-Dehydrogenasen in den Rohextrakten von *E. coli* ECL707/pAK2 und *E. coli* ECL707/pAK8**
Die Zellanzucht erfolgte in LB-Medium (s. 2.2.1) in einem Kulturvolmen von 250 ml unter aeroben Bedingungen. Die Herstellung der Rohextrakte und die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte wie unter 2.14 und 2.16 beschrieben.

Organismus	1,3-Propandiol-Dehydrogenase [U/mg]	Glycerin-Dehydratase [U/mg]
E. coli ECL707/pAK2	0,6	1,1
E. coli ECL707/pAK8	0,7	0,9
E. coli ECL707	< 0,01	n. n.

n. n. = nicht nachweisbar

3.3.2 Durchmusterung auf der Grundlage von Sequenzähnlichkeiten

Parallel zu dem auf Enzymaktivität basierenden Screening wurde eine Durchmusterung der Anreicherungsgenbanken (s. 3.1) auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten durchgeführt. Für diese Art der Vorgehensweise gibt es in der Literatur verschiedene

Beispiele. Zum einen werden mittels der Polymerasekettenreaktion Abschnitte der 16S rRNA-Gene amplifiziert und zur systematischen Analyse von Standorten genutzt (MUYZER et al., 1992; BORNEMANN et al., 1996). Andererseits konnten verschiedene Arbeitsgruppen diese Methode ebenfalls zur Identifizierung von kompletten Genen oder Teilsequenzen von für Enzyme kodierende Gene anwenden (SEOW et al., 1997; ROSADO et al., 1998).

Die Anwesenheit von Glycerin-Dehydratase-Genen in den erstellten Metagenombanken wurden ebenfalls durch eine PCR überprüft. Zu diesem Zweck wurden degenerierte Oligonukleotide aus Bereichen abgeleitet, die in allen bekannten Dehydratasen konserviert sind (s. Abb. 14). Die verwendeten Primer wurden mit alpha3 und beta1 bezeichnet, ihre Sequenz ist in Tabelle 2 aufgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gradientencycler mit einem Gradienten für die Annaeling-Temperatur von 37 ± 10 °C durchgeführt (s. 2.12). Der Temperaturbereich wurde bewußt niedrig gewählt, um auch Hybridisierungen mit Dehydratase-Genen zu ermöglichen, bei denen die Sequenzidentität in dem ausgewählten Bereich nicht so stark ausgeprägt war. Die erwartete DNA-Region mit einer Länge von ca. 1000 Bp konnte in allen Genbanken amplifiziert werden. Zur Amplifikation wurde mit der *Taq*-DNA-Polymerase gearbeitet. Aufgrund der Matrize-unabhängigen terminalen Transferase-Aktivität dieses Enzyms besitzen alle Amplifikate einzelne, überhängende Adenosinnukleotid-Reste. Das ermöglichte eine anschließende Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 nach der Methode der TOPO-TA-Klonierung (s. 2.8.3.2).

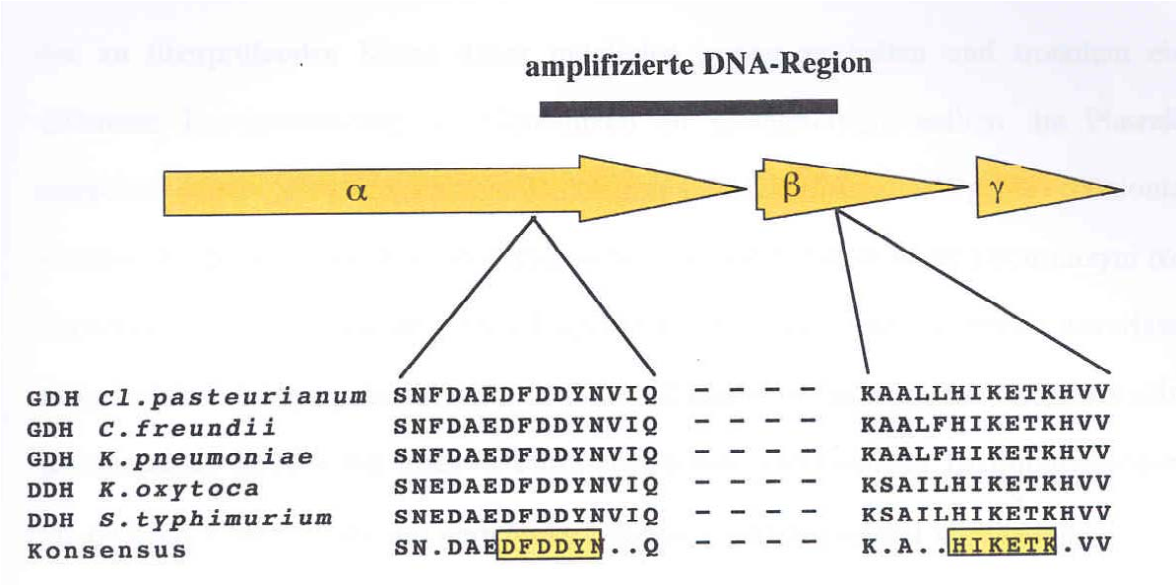


Abbildung 14: Schematische Darstellung der in allen B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen konservierten Bereiche, die zur Ableitung von degenerierten Oligonukleotiden benutzt wurden
Abkürzungen: GDH: Glycerin-Dehydratase; DDH: Diol-Dehydratase. Referenzen: *C. pasteurianum*, MACIS et al. (1998); *C. freundii*, SEYFRIED et al. (1996); *K. pneumoniae*, TOBIMATSU et al. (1996); *K. oxytoca*, TOBIMATSU et al. (1995); *S. typhimurium*, BOBIK et al. (1997).

Um zu überprüfen, ob die klonierten DNA-Fragmente den gewünschten Genbereich enthielten, wurden je Genbank zehn rekombinante Plasmide sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte, dass alle überprüften Plasmide den gewünschten Bereich beinhalteten. Wie zu erwarten war, wiesen alle Inserts hohe Ähnlichkeiten zu den Dehydratase-Genen der Glycerin- oder 1,2-Propandiol- verwertenden Enterobakterien auf. Die untersuchten Plasmidinserts zeigten die höchsten Übereinstimmungen mit den Dehydratase-Genen aus *C. freundii* (alle Genbanken), *K. oxytoca* (Genbank ZRA) und *S. typhimurium* (Genbank SLA).

Die so erhaltenen PCR-Produkte konnten nachfolgend als Sonden für Hybridisierungsexperimente zur Detektion der vollständigen Dehydratase-Gene eingesetzt werden. Bei der Koloniehybridisierung mit radioaktiv-markierten Sonden handelt es sich um ein zeitaufwendiges und kostenintensives Verfahren. Um die Anzahl der zu überprüfenden Klone daher möglichst gering zu halten und trotzdem eine effiziente Durchmusterung der Genbanken zu gewährleisten, sollten die Plasmide zunächst durch eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation größenfraktioniert

werden. Zu diesem Zweck wurden Plasmide zunächst mit dem Restriktionsenzym *Not*I linearisiert, da nur lineare DNA-Fragmente im Saccharosegradienten zuverlässig aufgrund ihrer Länge getrennt werden. Bei *Not*I handelt es sich um ein statistisch selten schneidendes Enzym mit einer 8 Purin-Nukleotide umfassenden Erkennungssequenz (5´-GCGGCCGC-3´), die auf dem Vektor pBluescript SK^+ einmal vorhanden war. Dies garantierte die einfache Linearisierung aller Plasmide, die Wahrscheinlichkeit einer weiteren Fragmentierung der inserierten DNA-Bereiche war jedoch gering.

Nach der Auftrennung im Saccharosegradienten wurden Aliquots einiger ausgewählter Fraktionen nach dem Dot-Blot-Verfahren (s. 2.11.3) auf Nylonmembranen aufgebracht und fixiert. Anschließend erfolgte eine Hybridisierung mit den radioaktiv-markierten Dehydratase-spezifischen Sonden (s. Abb. 15).

Die Fraktionen, die ein besonders deutliches Signal lieferten (s. Pfeile in Abb. 15), wurden für das Screening verwendet. Zunächst wurden die Plasmide in den betreffenden Fraktionen einer Religation mit der T4-DNA-Ligase unterzogen. Anschließend erfolgte dann die Transformation in *E. coli* DH5α und das Ausplattieren auf LB-Ampicillin-Agarplatten. Die so erhaltenen Klone wurden direkt, ohne einen weiteren Ausstrich auf runde Nylonmembranen geblottet (s. 2.11.1). Anschließend wurden die Zellen durch Behandlung mit einem SSC/SDS-Puffer aufgeschlossen und durch “Backen” in der Mikrowelle wurde die freigesetzte DNA auf den Membranfiltern fixiert (s. 2.11.3). Die so präparierten Filter wurden nachfolgend ebenfalls einer Hybridisierung mit den zuvor amplifizierten, spezifischen Dehydratase-Fragmenten unterzogen. Positive Klone zeigten bei Autoradiographie der Membranen eine deutliche Schwarzfärbung (s. Abb. 16).

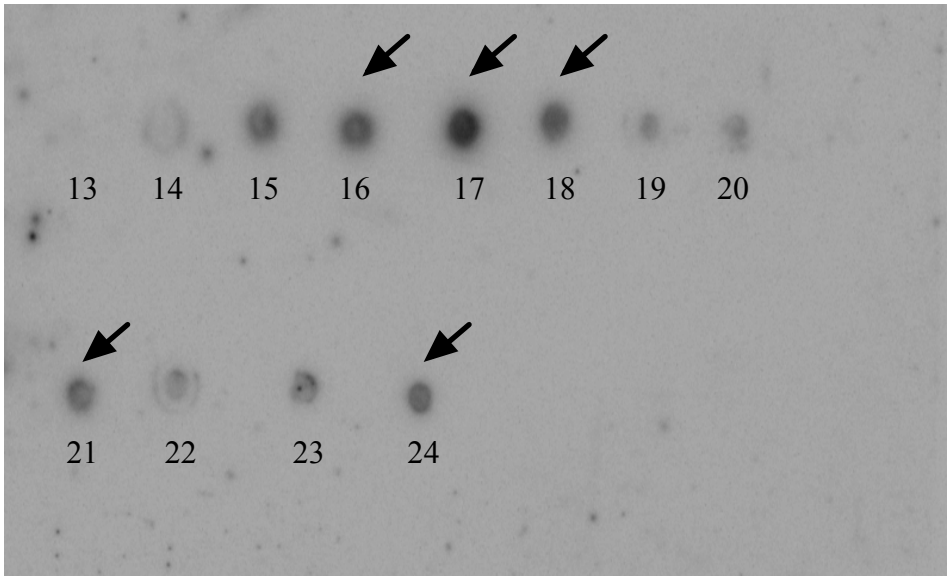


Abbildung 15: Dot-Blot-Hybridisierung ausgewählter Fraktionen (13 bis 24) der Umweltgenbank SLA nach Saccharose-Dichtegradienten-zentrifugation
Die Sonde wurde radioaktiv markiert (s. 2.8.4). Die Hybridisierung erfolgte wie unter 2.11.4 beschrieben. Die Pfeile markieren die Fraktionen die für das nachfolgende Screening verwendet wurden.

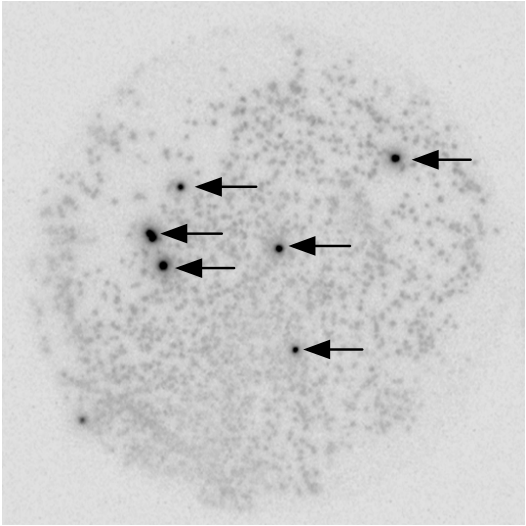


Abbildung 16: Koloniehybridisierung der Metagenombanken mit Dehydratase-spezifischen Sonden
Die Sonde wurde radioaktiv markiert (s. 2.8.4). Die Hybridisierung erfolgte wie unter 2.11.4 beschrieben. Positive Klone sind durch Pfeile markiert.

Im Rahmen des beschriebenen sequenzabhängigen Durchmusterungsverfahren wurden zwischen 32000 und 65000 rekombinanter *E. coli*-Klone der Genbanken GIIA, GEA, ZRA und SLA getestet (s. Tab. 11), insgesamt waren es 198000. Fünf verschiedene positive Klone konnten dabei identifiziert werden, deren Plasmide mit pAK3 bis pAK7 bezeichnet wurden. Die durch Restriktionsverdau ermittelten Insertgrößen lagen zwischen 1,7 und 6,3 kBp. Einzig in Genbank GEA konnte somit mit keinem der beiden beschriebenen Durchmusterungsverfahren ein positiver Klon detektiert werden (s. auch 3.3.1).

Tabelle 11: Sequenz-abhängiges Screening der Metagenomgenbanken GIIA, GEA, ZRA und SLA

Genbank	Anzahl der getesteten rekombinanten *E. coli*-Klone	Anzahl und Bezeichnung der positiven *E. coli*-Klone
SLA	61000	1 (pAK3)
ZRA	65000	2 (pAK4-5)
GIIA	32000	2 (pAK6-7)
GEA	40000	0

Zur Detektion der Dehydratase-Aktivität wurden die Plasmide pAK3 bis pAK7 in *E. coli* ECL707 transformiert und die rekombinanten Klone in LB-Medium (s. 2.2.1) angezogen. Nur in den Rohextrakten von *E. coli* ECL707/pAK6 und *E. coli* ECL707/pAK7 konnte eine Dehydratase-Aktivität nachgewiesen werden. Die spezifischen Aktivitäten lagen bei 0,9 und 1,2 U/mg Protein. Des Weiteren wurde bei *E. coli* DH5α/pAK7 wie auch schon bei *E. coli* ECL707/pAK2 und *E. coli* ECL707/pAK8 eine signifikante Aktivität der 1,3-Propandiol-Dehydrogenase gemessen. Die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Enzyme sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Zusätzlich wurden mit den Plasmiden pAK3-7 Komplementationsversuche im Stamm *E. coli* ECL707/pAK1 durchgeführt. Die Transformation von pAK6 und pAK7 ermöglichte den resultierenden Stämmen *E. coli* ECL707/pAK1/pAK6 bzw. ECL707/pAK1/pAK7 das Wachstum in M9-Mineralmedium (s. 2.2.4) mit Glycerin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle. Mit den Plasmiden pAK3 bis pAK5 war die Komplementation nicht erfolgreich. Ein möglicher Grund für die fehlende Enzymaktivität war, dass hier unvollständige Gene kloniert worden waren, da Sequenz-basierende Durchmusterungsverfahren nicht selektiv für komplette Gene sind. Die

Ergebnisse der Sequenzierung der Plasmide und weiterer biochemischer Untersuchungen sind in Kapitel 3.3.3 dargestellt.

Tabelle 12: Spezifische Aktivitäten der Glycerin-Dehydratasen und der 1,3-Propandiol-Dehydrogenasen in den Rohextrakten von *E. coli* ECL707/pAK3 bis *E. coli* ECL707/pAK7
Die Zellanzucht erfolgte in LB-Medium (s. 2.2.1) in einem Kulturvolmen von 250 ml unter aeroben Bedingungen. Die Herstellung der Rohextrakte und die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte wie unter 2.14 und 2.16 beschrieben

Organismus	1,3-Propandiol-Dehydrogenase [U/mg]	Glycerin-Dehydratase [U/mg]
E. coli ECL707/pAK3	n. n.	n. n.
E. coli ECL707/pAK4	n. n.	n. n.
E. coli ECL707/pAK5	n. n.	n. n.
E. coli ECL707/pAK6	n. n.	0,9
E. coli ECL707/pAK7	0,5	1,2
E. coli ECL707	< 0,01	n. n.

n. n. = nicht nachweisbar

3.3.3 Charakterisierung der identifizierten Glycerin- und Diol-Dehydratase-Gene und ihrer Genprodukte

Mit Hilfe der in den vorangegangenen Kapiteln (3.3.1 und 3.3.2) beschriebenen Methoden konnten insgesamt 7 positive *E. coli*-Klone aus den Metagenombanken GEA, GIIA, ZRA und SLA (s. 3.1) identifiziert werden, die Gene für Glycerin- oder Diol-Dehydratasen tragen. Die mit pAK2 bis pAK8 bezeichneten Plasmide trugen Inserts mit Größen zwischen 1,8 und 7,1 kBp. Je drei der identifizierten Plasmide entstammen den Genbanken, die aus Proben des Grone-Sediments und des Zuckerrübenbodens konstruiert wurden, eine weitere aus der aus dem Sediment des Solar Lake erstellten Genbank. Vier der Plasmide (pAK2 und pAK6–8) vermittelten in *E. coli* ECL707 eine signifikante, Coenzym B_{12}-abhängige Dehydrataseaktivität.
Im folgenden Kapitel werden die Plasmide, die darauf kodierten Gene und ihre Genprodukte ausführlich charakterisiert. Dazu gehörte die Sequenzierung der Plasmide

und die Analyse der Sequenzdaten, sowie eine eingehende biochemische Untersuchung der von den korrespondierenden *E. coli*-Klonen gebildeten Proteine.

3.3.3.1 Molekulare Analyse der Plasmide pAK2 bis pAK8

Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte nach der Methode von SANGER (1977) in beiden Orientierungen. Die Inserts der rekombinanten Plasmide wurden nach dem Verfahren des „primer walking“ durch das „Göttingen Genomics Laboratory“ (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) am ABI PRISM 337 DNA-Sequenzer sequenziert. Die Inserts der Plasmide pAK2 bis 5 und pAK7 konnten auf diese Weise vollständig sequenziert werden. Die Plasmide pAK6 und pAK8 wurden lediglich partiell sequenziert, da die Analyse der ersten Sequenzen gezeigt hatte, dass beide eine 100 %ige Identität zu den Genen für die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* besaßen. Die beiden Plasmide wurden daher nicht in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

Zunächst brachte die Sequenzierung Aufschluß über die genauen Größen der klonierten Inserts. Das Plasmid pAK2 wies eine inserierte Sequenz mit einer Länge von 7115 Bp auf, pAK3 eine von 2157 Bp und pAK4 eine von 1750 Bp. Für pAK5 und pAK7 wurden Insertgrößen von 4236 und 6295 Bp festgestellt (s. Tab. 13). Eine Übersicht über die Insertgrößen und die Größen der klonierten Untereinheiten der Dehydratasen wird in Tabelle 13 gegeben. Die Analyse der Sequenzen der inserierten DNA-Fragmente von pAK2-5 und pAK7 ergab weitgehende Übereinstimmungen zu den DNA-Sequenzen der bekannten Diol- und Glycerin-Dehydratasen aus Enterobakterien. Eine Übersicht über die Sequenzähnlichkeiten aller klonierten Gene zu denen der jeweils nächsten Verwandten geben die Tabellen 14A und 14B. Die DNA-Sequenzen von pAK2 und 3 sowie pAK7 zeigten die größten Identitäten (87 bis 98 %) zu den drei Strukturgenen (*dhaBCE*) der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*. Beim Vergleich der Proteinsequenzen lagen die Homologien in einem Bereich von 96 bis 99 %. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeiten wurden die auf pAK2-3 und pAK7 kodierten Dehydratasen in die Gruppe der B_{12}-abhängigen Glycerin-Dehydratasen eingeordnet. Die Sequenzen von pAK4 und pAK5 dagegen besaßen die größte Ähnlichkeit zu den drei Strukturgenen (*pduCDE*) der Diol-Dehydratase aus *Salmonella typhimurium*. Daher wurden die hier kodierten Enzyme in die Gruppe der B_{12}-abhängigen Diol-

Dehydratasen eingeordnet. Die Übereinstimmungen mit Werten von 77 bis 92 % auf DNA-Ebene und 86 bis 97 % auf Protein-Ebene zu der bekannten Diol-Dehydratase waren hier deutlich geringer als bei den von pAK2-3 und pAK7 kodierten Enzymen.

Tabelle 13: Übersicht über die Insertgrößen der vollständig sequenzierten Plasmide pAK2-5 und pAK7, über die Gene für die Untereinheiten der klonierten Dehydratase, sowie die GC-Gehalte in diesen Regionen
Unvollständige Gene sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Plasmid/ Organismus	Insert-größe [Bp]	GC-Gehalt der Dht*-kodierenden Region [%]	Größe der klonierten Gene für Dehydratase-Untereinheiten [Bp]		
			α	β	γ
pAK2	7115	55,73	1668	585	429
pAK3	2157	54,98	729*	585	429
pAK4	1750	53,66	741*	678	363*
pAK5	4236	52,29	45*	678	519
pAK7	6295	56,33	1668	585	429
C. freundii	-	55,92	1668	585	429
S. typhimurium	-	56,65	1665	678	522

* Dht, Dehydratase.

Tabelle 14: Sequenzähnlichkeiten der auf den Plasmiden pAK2 bis 5 und pAK7 klonierten Gene und der korrespondierenden Genprodukte zu denen der jeweils nächsten Verwandten
Alle Angaben sind in Prozent. Unvollständig klonierte Gene sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

A) pAK2, 3, und 7 im Vergleich zu *C. freundii*

Plasmid	*dhaB*/ DhaB	*dhaC*/ DhaC	*dhaE*/ DhaE	*dhaF*/ DhaF	*dhaG*/ DhaG	*dhaH*/ DhaH	*dhaT*/ DhaT	*dhaI*/ DhaI
pAK2	89/98	89/96	89/96	86/93	-	-	93/98*	87/91
pAK3	90/98*	87/98	89/96	87/92*	-	-	-	-
pAK7	98/99	98/99	98/99	98/100*	98/98	99/100*	98/100	98/98

Fortsetzung Tabelle 14

B) pAK4 und pAK5 im Vergleich zu *S. typhimurium*

Plasmid	***pduC*/ PduC**	***pduD*/ PduD**	***pduE*/ PduE**	***pduG*/ PduG**	***pduH*/ PduH**	***pduJ*/ PduJ**
pAK4	88/97*	81/86	77/87*	-	-	-
pAK5	92/86*	83/91	82/89	89/93	69/62	86/97

Eine Auffälligkeit ergab sich bei der Betrachtung der GC-Gehalte in den Dehydratase-kodierenden Regionen. Die Werte für die Plasmide pAK2-3 und pAK7 weichen nur geringfügig (< 1%) von dem für die entsprechende Genregion aus *C. freundii* (55,92 %) ab. Dagegen waren die Differenzen zwischen pAK4 bzw. pAK5 und *S. typhimurium* in der Dehydratase-Region mit 3,0 und 4,3 % signifikant größer (s. Tab. 13). Besonders auffällig waren diese Unterschiede im Gen für die kleine Untereinheit *pduE*. Zwischen Aminosäure 23 und 38 befand sich ein Abschnitt mit besonders großer Diskrepanz in der Proteinsequenz (s. Abb. 19). Betrachtet man diesen Bereich auf Nukleotid-Ebene (s. Abb. 17) zeigt sich, dass hier der GC-Gehalt in *S. typhimurium* auf 81,0 % ansteigt, während er bei pAK4 und pAK5 mit 64,3 und 52,5 % deutlich darunter liegt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die beiden unbekannten Organismen, aus denen die Dehydratase-kodierenden Genregionen von pAK4 und pAK5 entstammen, eine andere Kodonnutzung aufweisen als *S. typhimurium*.

```
61   C A G G G C G A T G C G C C A G C A G C G G C T C C T G C G  S. typhimurium pduE
61   C A G G G A G A G A C C G T C A C T C C A G C C G C G A C T  pAK4  pduE
61   C A G G G A G A G A C C G T C A C T C C A T C C G C G A C T  pAK5  pduE

91   G C A G G C G G C A C G T C C C G C A G C G C A A A G G T C  S. typhimurium pduE
91   G G T T C A T C A G C G C A T A C C G C G A A A G T G A C G  pAK4  pduE
91   G T T T C A T C A A C A C A T A C C G C A A A A G T G A C G  pAK5  pduE
```

Abbildung 17: Alignment partieller Nukleotid-Sequenzen (Bereich von Basenpaar 61 bis 120) von *pduE* aus *S. typhimurium*, pAK4 und pAK5
Referenzen: *S. typhimurium*, BOBIK et al.(1997); pAK4 und pAK5, diese Arbeit. Die für alle angegebenen Gene identischen Nukleotide sind grau unterlegt.

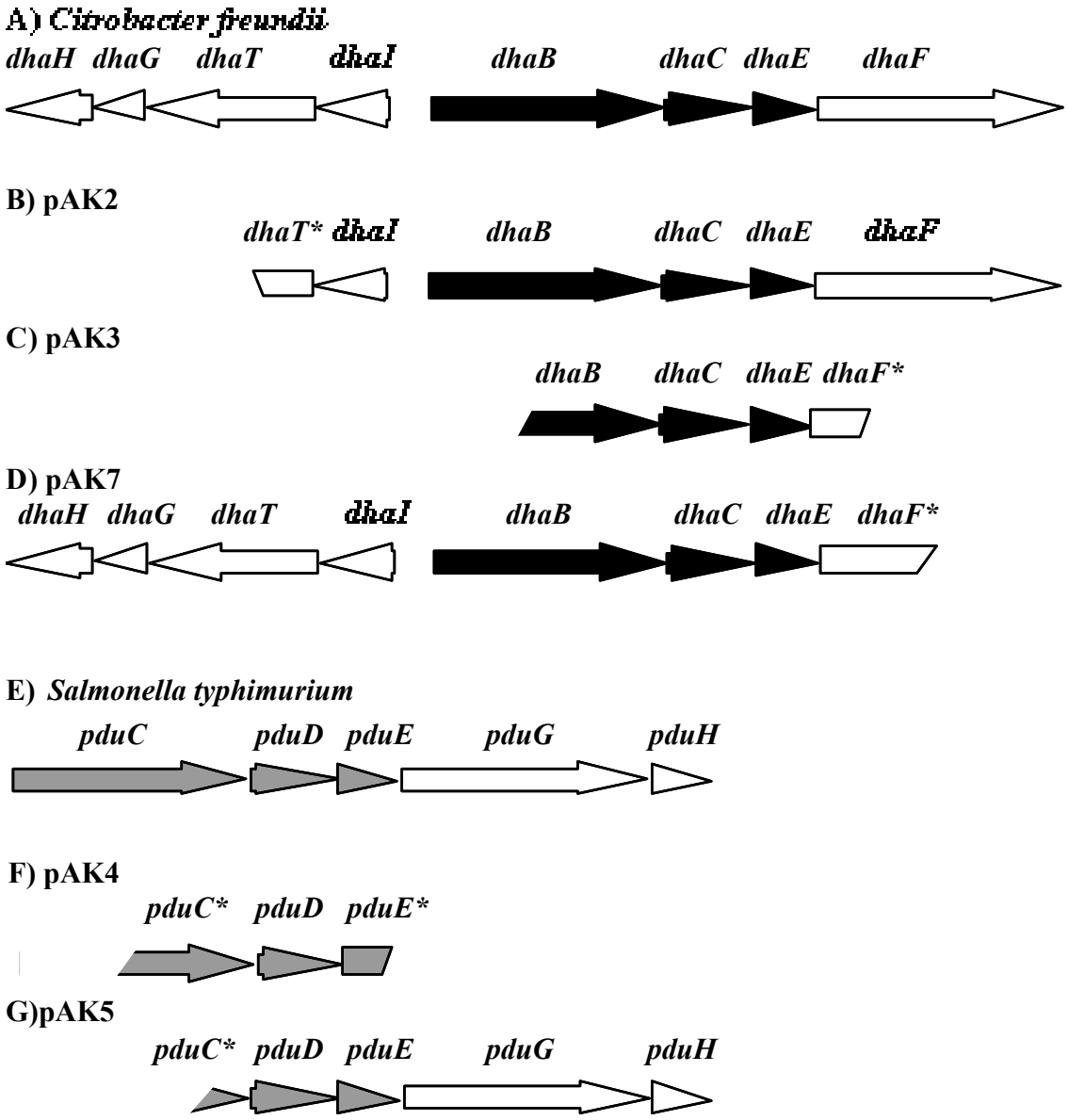


Abbildung 18: Genetische Organisation der klonierten DNA-Regionen aus pAK2-5 und pAK7 (B, C, D, F, G) und der entsprechenden DNA-Regionen aus *C. freundii* (A) und *S. typhimurium* (E)
Pfeile und Pfeilspitzen repräsentieren die Länge, Position und Orientierung von möglichen Genen. Partielle Gene sind durch unterbrochene Pfeile und mit Sternchen gekennzeichnet. Schwarze und graue Pfeile deuten offene Leserahmen an, die homolog zu den Genen für die drei Untereinheiten der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* bzw. zu denen für die Diol-Dehydratase aus *S. typhimurium* sind.
***dhaHI*:Adenosyltransferase;*dhaT*:1,3-Propandiol-Dehydrogenase; *dhaBCE*: Glycerin-Dehydratase; *pduCDE*: Diol-Dehydratase; *dhaFG* und *pduGH*: Reaktivierungsfaktoren.**

Nur auf den Inserts der Plasmide pAK2 und pAK7 lagen alle drei Strukturgene für die Dehydratasen vollständig kloniert vor. Bei den anderen fehlten jeweils unterschiedlich große Teile der α-Untereinheit und im Fall von pAK4 außerdem noch das Ende der γ-Untereinheit (s. Abb. 18). Dies erklärte auch die fehlende Dehydratase-Aktivität in den Rohextrakten der korrespondierenden *E. coli*-Klone (s. Tab. 12). Neben den Dehydratase-Genen waren auf allen Inserts, mit Ausnahme von pAK4, noch weitere für die Dehydratase-Regionen (*dha*-Regulon und *pdu*-Operon) typische Gene lokalisiert. Dazu gehörten unter anderem die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase bei pAK7 die auf Aminosäure-Ebene eine 100 %ige Übereinstimmung zu der aus *C. freundii* aufwies. Außerdem waren Teile der Untereinheiten der Reaktivierungsfaktoren (*dhaGF* bzw. *pduGH*) auf den Plasmiden vorhanden. pAK5 enthielt die beiden Untereinheiten *pduG* und *pduH* vollständig, sie wiesen eine Übereinstimmung von 89 bzw. 69 % zu *pduH* und *pduG* aus *Salmonella* auf.

Die Bindung des Coenzyms B_{12} ist in den Glycerin- und Diol-Dehydratasen sehr komplex. Sie binden den Kofaktor in der sogenannten „Base-on"-Form und gehören damit zur Klasse 2 der B_{12}-bindenden Enzyme. Durch die Kristallisation der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* und der Glycerin-Dehydratase aus *K. pneumoniae* im Komplex mit 1,2-Propandiol und Cyano-B_{12} wurde erstmals die Struktur eines „Base-on"-Enzyms und seine B_{12}-Bindung beschrieben (SHIBATA et al., 1999, TORAYA, 2000, YAMANISHI et al., 2002). Durch Seitenketten einer ganzen Reihe von Aminosäuren wird dabei ein Raum für die Bindung des Cobalamins geschaffen, der weitgehend von hydrophoben Gruppen umgeben ist. Die Aminosäurereste Thrα172, Gluα205, Thrα222, Aspα234 und Metα373 der α-Untereinheit sowie Aspβ112, Asnβ150, Glnβ156 der β-Untereinheit bilden H-Brücken zu den peripheren Amid-Seitenketten des Corrin-Ringes. In der Glycerin-Dehydratase von *K. pneumoniae* ist außerdem das Serβ122 an der Ausbildung der H-Brücken beteiligt (YAMANISHI et al., 2002). Die korrespondierende Aminosäure in der Diol-Dehydratase von *K. oxytoca* ist das Proβ155, welches nicht in der Lage ist, H-Brücken zu bilden. Weitere an der Bindung des Coenzyms beteiligte Aminosäuren sind das Lysβ135, Thrβ137 und Serβ200. Die aufgeführten Reste sind in allen bisher untersuchten Dehydratasen hochkonserviert, lediglich das Serβ200 ist in den Glycerin-Dehydratasen durch ein Alanin ersetzt. Die Alignments der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus pAK2-5 und pAK7 zeigten, dass diese Reste auch in den

neu identifizierten Enzymen hochkonserviert vorliegen (dunkelgrau unterlegt), sofern die entsprechenden Abschnitte kloniert wurden (s. Abb. 19). Auch die Unterschiede zwischen der Gruppe der Glycerin- und der Gruppe der Diol-Dehydratasen wurden hier bestätigt. Es wurden die Sequenzen aus pAK2 - 3 und pAK7 den Proteinsequenzen von *C. freundii* gegenübergestellt (s. Abb. 19A bis C), während die Sequenzen von pAK4 und 5 mit denen von *S. typhimurium* verglichen wurden (s. Abb. 19D bis F).

Das Substrat 1,2-Propandiol und der essentielle Kofaktor K^+ sind beide innerhalb des TIM-Barrel der α-Untereinheit gebunden. Das O(2) und O(1) des Substrats sind durch Wasserstoffbrücken an die Aminosäurereste Gluα171, Glnα297, Hisα144 und Aspα336 im aktiven Zentrum fixiert (s. Abb. 19). Das Kaliumion ist durch die Hydroxylgruppen des Substrats und durch fünf Sauerstoffatome der Aminosäurereste des aktiven Zentrums siebenfach koordiniert.

Das Alignment der Untereinheiten der potentiellen Reaktiverungsfaktoren zeigte, dass auch diese hochkonserviert vorliegen (s. Abb. 20). In den untersuchten Glycerin-Dehydratasen lagen die Abweichungen bei maximal 7 %, dhaF aus pAK7 lag im Vergleich zu *C. freundii* sogar zu 100 % konserviert vor. Auch PduG von pAK5 und *S. typhimurium* wiesen nur geringfügige Unterschiede auf, PduH von pAK5 zeigt jedoch nur 62 % Übereinstimmung zu dem entsprechenden Protein aus *S. typhimurium*.

Abbildung 19: (folgende Seiten)
Alignments der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der 3 Strukturgene der Glycerin-Dehydratasen aus pAK2 - 3 und pAK7 mit denen aus *C. freundii* (A bis C), sowie der Diol-Dehydratase-Gene aus pAK4 und 5 mit denen aus *S. typhimurium* (D bis F)
Referenzen: Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*, SEYFRIED et al. (1996); Diol-Dehydratase aus *S. typhimurium*, BOBIK et al. (1997); Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus pAK2 bis 5 und pAK7, diese Arbeit.
Die für alle angegebenen Proteine identischen Aminosäuren sind grau, die an der B_{12}-Bindung beteiligten sind dunkelgrau unterlegt. Die Aminosäurereste, die in die Bindung des Substrats und des K^+-Ion involviert sind, sind durch einen schwarzen Kasten gekennzeichnet.

A) Glycerin-Dehydratasen: α-Untereinheit

```
1    M R R S K R F E V L A Q R P V N Q D G L I G E W P E E G L I  C.f. DhaB
1    M R R S K R F E V L A Q R P V N Q D G L I G E W P E E G L I  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaB
1    M R R S K R F E V L A Q R P V N Q D G L I G E W P E E G L I  pAK7 DhaB

31   A M E S P Y D P A S S V K V E N G R I V E L D G K S R A E F  C.f. DhaB
31   A M E S P Y D P A S S V K V E N G R I V E L D G K D R A Q F  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaB
31   A M E S P Y D P A S S V K V E N G R I V E L D G K S R A E F  pAK7 DhaB

61   D M I D R F I A D Y A I N V P E A E R A M Q L D A L E I A R  C.f. DhaB
61   D M I D R F I A D Y A I N V A E T E R A M Q L D A L E I A R  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaB
61   D M I D R F I A D Y A I N V P E A E R A M Q L D A L E I A R  pAK7 DhaB

91   M L V D I H V S R E E I I A I T T A I T P A K R L E V M A Q  C.f. DhaB
91   M L V D I H V S R E E I I A I T T A I T P A K A V E V M A K  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaB
91   M L V D I H V S R E E I I A I T T A I T P A K A V E V M A Q  pAK7 DhaB

121  M N V V E M M M A L Q K M R A R R T P S N Q C H V T N L K D  C.f. DhaB
121  M N V V E M M M A L Q K M R A R R T P S N Q C H V T N L K D  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaB
121  M N V V E M M M A L Q K M R A R R T P S N Q C H V T N L K D  pAK7 DhaB

151  N P V Q I A A D A A E A G I R G F S E Q E T T V G I A R Y A  C.f. DhaB
151  N P V Q I A A D A A E A G I R G F S E Q E T T V G I A R Y A  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaB
151  N P V Q I A A D A A E A G I R G F S E Q E T T V G I A R Y A  pAK7 DhaB

181  P F N A L A L L V G S Q C G A P G V L T Q C S V E E A T E L  C.f. DhaB
181  P F N A L A L L V G S Q C G R P G V L T Q C S V E E A T E L  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaB
181  P F N A L A L L V G S Q C G R P G V L T Q C S V E E A T E L  pAK7 DhaB

211  E L G M R G L T S Y A E T V S V Y G T E S V F T D G D D T P  C.f. DhaB
211  E L G M R G L T S Y A E T V S V Y G T E S V F T D G D D T P  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaB
211  E L G M R G L T S Y A E T V S V Y G T E S V F T D G D D T P  pAK7 DhaB

241  W S K A F L A S A Y A S R G L K M R Y T S G T G S E A L M G  C.f. DhaB
241  W S K A F L A S A Y A S R G L K M R Y T S G T G S E A L M G  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaB
241  W S K A F L A S A Y A S R G L K M R Y T S G T G S E A L M G  pAK7 DhaB

271  Y S E S K S M L Y L E S R C I F I T K G A G V Q G L Q N G A  C.f. DhaB
271  Y S E S K S M L Y L E S R C I F I T K G A G V Q G L Q N G A  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaB
271  Y S E S K S M L Y L E S R C I F I T K G A G V Q G L Q N G A  pAK7 DhaB

301  V S C I G M T G A V P S G I R A V L A E N L I A S M L D L E  C.f. DhaB
301  V S C I G M T G A V P S G I R A V L A E N L I A S M L D L E  pAK2 DhaB
1    - - - - - - - - - - - - - I R A V L A E N L I A S M L D L E  pAK3 DhaB
301  V S C I G M T G A V P S G I R A V L A E N L I A S M L D L E  pAK7 DhaB

331  V A S A N D Q T F S H S D I R R T A R T L M Q M L P G T D F  C.f. DhaB
331  V A S A N D Q T F S H S D I R R T A R T L M Q M L P G T D F  pAK2 DhaB
18   V A S A N D Q T F S H S D I R R T A R T L M Q M L P G T D F  pAK3 DhaB
331  V A S A N D Q T F S H S D I R R T A R T L M Q M L P G T D F  pAK7 DhaB

361  I F S G Y S A V P N Y D N M F A G S N F D A E D F D D Y N I  C.f. DhaB
361  I F S G Y S A V P N Y D N M F A G S N F D A E D F D D Y N I  pAK2 DhaB
48   I F S G Y S A V P N Y D N M F A G S N F D A E D F D D Y N I  pAK3 DhaB
361  I F S G Y S A V P N Y D N M F A G S N F D A E D F D D Y N I  pAK7 DhaB
```

```
391  L Q R D L M V D G G L R P V T E E E T I A I R N K A A R A I  C.f. DhaB
391  L Q R D L M V D G G L R P V T E E E T I A I R N K A A R A I  pAK2 DhaB
78   L Q R D L M V D G G L R P V T E E E T I A I R N Q A A R A I  pAK3 DhaB
391  L Q R D L M V D G G L R P V T E E E T I A I R N K A A R A I  pAK7 DhaB

421  Q A V F R E L G L P L I S D E E V D A A T Y A H G S K D M P  C.f. DhaB
421  Q A V F R E L G L P L I S D E E V D A A T Y A H G S K D M P  pAK2 DhaB
108  Q A V F R E L G L P L I S D E E V D A A T Y A H G S K D M P  pAK3 DhaB
421  Q A V F R E L G L P L I S D E E V E A A T Y A H G S K D M P  pAK7 DhaB

451  A R N V V E D L A A V E E M M K R N I T G L D I V G A L S S  C.f. DhaB
451  A R N V V E D L A A E E E M M K R N I T G L D I V G A L N S  pAK2 DhaB
138  A R N V V E D L A A V E E M M K R N I T G L D V V G A L S A  pAK3 DhaB
451  A R N V V E D L A A V E E M M K R N I T G L D I V G A L S S  pAK7 DhaB

481  S G F E D I A S N I L N M L R Q R V T G D Y L Q T S A I L D  C.f. DhaB
481  S G F E D I A S N I L N M L K Q R V T G D Y L Q T S A I L D  pAK2 DhaB
168  S G F D D I A S N I L N M L R Q R V T G D Y L Q T S A I L D  pAK3 DhaB
481  S G F E D I A S N I L N M L R Q R V T G D Y L Q T S A I L D  pAK7 DhaB

511  R Q F D V V S A V N D I N D Y Q G P G T G Y R I S A E R W A  C.f. DhaB
511  R Q F E V V S A V N D I N D Y Q G P G T G Y R I S A E R W A  pAK2 DhaB
198  R Q F E V V S A V N D I N D Y Q G P G T G Y R I S A E R W A  pAK3 DhaB
511  R Q F D V V S A V N D I N D Y Q G P G T G Y R I S A E R W A  pAK7 DhaB

541  E I K N I A G V V Q P G S I E                                C.f. DhaB
541  E I K N I A G V V Q P S A I E                                pAK2 DhaB
228  E I K N I A G V V Q P G S I E                                pAK3 DhaB
541  E I K N I A G V V Q P G S I E                                pAK7 DhaB
```

B) Glycerin-Dehydratasen: β-Untereinheit

```
1    M E C T T E R K P V F T L Q V S E G E A A K A D E R V D E V  C.f. DhaC
1    M E C T I E R K P V F I L Q V S E G E A A K A G D R A D E V  pAK2 DhaC
1    M E C T T E R K P V F T L Q V S E G E A A K A D D R A D E V  pAK3 DhaC
1    M E C T T E R K P V F T L Q V S E G E A A K A D E R V D E V  pAK7 DhaC

31   V I G V G P A F D K Y Q H K T L I D M P H K A I L K E L V A  C.f. DhaC
31   V I G V G P A F D K Y Q H K T L I D M P H K A I L K E L V A  pAK2 DhaC
31   V I G V G P A F D K Y Q H K T L I D M P H K A I L K E L V A  pAK3 DhaC
31   V I G V G P A F D K Y Q H K T L I D M P H N A I L K E L V A  pAK7 DhaC

61   G I E E E G L H A R V V R I L R T S D V S F M A W D A A N L  C.f. DhaC
61   G I E E E G L H A R V V R I L R T S D V S F M A W D A A N L  pAK2 DhaC
61   G I E E E G L H A R V V R V L R T S D V S F M A W D A A N L  pAK3 DhaC
61   G I E E E G L H A R V V R I L R T S D V S F M A W D A A N L  pAK7 DhaC

91   S G S G I G I G I Q S K G T T V I H Q R D L L P L S N L E L  C.f. DhaC
91   S G S G I G I G I Q S K G T T V I H Q R D L L P L S N L E L  pAK2 DhaC
91   S G S G I G I G I Q S K G T T V I H Q R D L L P L S N L E L  pAK3 DhaC
91   S G S G I G I G I Q S K G T T V I H Q R D L L P L S N L E L  pAK7 DhaC

121  F S Q A P L L T L E T Y R Q I G K N A A R Y A R K E S P S P  C.f. DhaC
121  F S Q A P L L T L E T Y R Q I G K N A A R Y A R K E S P S P  pAK2 DhaC
121  F S Q A P L L T L E T Y R Q I G K N A A R Y A R K E S P S P  pAK3 DhaC
121  F S Q A P L L T L E T Y R Q I G K N A A R Y A R K E S P S P  pAK7 DhaC

151  V P V V N D Q M V R P K F M A K A A L F H I K E T K H V V Q  C.f. DhaC
151  V P V V N D Q M V R P K F M A K A A L F H I K E T K H V V Q  pAK2 DhaC
151  V P V V N D Q M V R P K F M A K A A L F H I K E T K H V V Q  pAK3 DhaC
151  V P V V N D Q M V R P K F M A K A A L F H I K E T K H V V Q  pAK7 DhaC

181  D R A P V T L H I A L V R E                                  C.f. DhaC
181  D A A P V T L H I A L V K E                                  pAK2 DhaC
181  D A A P V T L H I A L V R E                                  pAK3 DhaC
181  D A A P V T L H I A L V R E                                  pAK7 DhaC
```

C) Glycerin-Dehydratasen: γ-Untereinheit

```
1    M N D N I M T A Q D Y P L A T R C P E K I Q T P T G K P L T  C.f. DhaE
1    M N D N I M T A Q D Y P L A T R C P E K I L T P T G K P L T  pAK2 DhaE
1    M N E N I M T A Q D Y P L A T R C P E K I L T P T G K P L T  pAK3 DhaE
1    M N D N I M T A Q D Y P L A T R C P E K I Q T P T G K P L T  pAK7 DhaE

31   E I T L E N V L A G R V G P Q D V R I S Q Q T L E Y Q A Q I  C.f. DhaE
31   D I T L E N V L A G R V G P Q D V R I S Q Q T L E Y Q A Q I  pAK2 DhaE
31   D I T L E N V L A G R V G P Q D V R I S Q Q T L E Y Q A Q I  pAK3 DhaE
31   E I T L E N V L A G R V G P Q D V R I S Q Q T L E Y Q A Q I  pAK7 DhaE

61   A E Q M Q R H A V A R N F R R A A E L I A I P D A R I L E I  C.f. DhaE
61   A E Q M Q R H A V A R N F R R A A E L I A I P D A R I L E I  pAK2 DhaE
61   A E Q M Q R H A V A R N F R R A A E L I A I P D A R I L E I  pAK3 DhaE
61   A E Q M Q R H A V A R N F R R A A E L I A I P D A R I L E I  pAK7 DhaE

91   Y N A L R P F R S S F A E L Q A I A D E L E H T W H A T V N  C.f. DhaE
91   Y N A L R P F R S S L A E L L A I A D E L E H T W H A T V N  pAK2 DhaE
91   Y N A L R P F R S S F T E L Q A I A D E L E H T W H A T V N  pAK3 DhaE
91   Y N A L R P F R S S F A E L Q A I A D E L E H T W H A T V N  pAK7 DhaE

121  A G F V R E S A E V Y L Q R N K L R K G S Q                  C.f. DhaE
121  A G F V R E S A E V Y Q Q R N K L R K G S Q                  pAK2 DhaE
121  A G F V R E S A D V Y Q Q R N K L R K G S Q                  pAK3 DhaE
121  A G F V R E S A E V Y Q Q R N K L R K G S Q                  pAK7 DhaE
```

D) Diol-Dehydratasen: α-Untereinheit

```
1    M R S K R F E A L A K R P V N Q D G F V K E W I E E G F I A  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

31   M E S P N D P K P S I K I V N G A V T E L D G K P V S E F D  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

61   L I D H F I A R Y G I N L N R A E E V M A M D S V K L A N M  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

91   L C D P N V K R S E I V P L T T A M T P A K I V E V V S H M  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

121  N V V E M M M A M Q K M R A R R T P S Q Q A H V T N V K D N  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

151  P V Q I A A D A A E G A W R G F D E Q E T T V A V A R Y A P  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

181  F N A I A L L V G S Q V G R P G V L T Q C S L E E A T E L K  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

211  L G M L G H T C Y A E T I S V Y G T E P V F T D G D D T P W  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

241  S K G F L A S S Y A S R G L K M R F T S G S G S E V Q M G Y  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

271  A E G K S M L Y L E A R C I Y I T K A A G V Q G L Q N G S V  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

301  S S I G V P S A V P S G I R A V L A E N L I C S S L D L E C  S.t. PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - C S P G D L E C  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

331  A S S N D Q T F T H S D M R R T A R L L M Q F L P G T D F I  S.t. PduC
9    A S S N D R T F T H S D M R R T A R L L M Q F L P G T D F I  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

361  S S G Y S A V P N Y D N M F A G S N E D A E D F D D Y N V I  S.t. PduC
39   S S G Y S A V P N Y D N M F A G S N E D A E D F D D Y N V L  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

391  Q R D L K V D G G L R P V R E E D V I A I R N K A A R A L Q  S.t. PduC
69   Q R D L K V D G G L R P V R E G D V I A I R N K A A R A L Q  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

421  A V F A G M G L P P I T D E E V E A A T Y A H G S K D M P E  S.t. PduC
99   A V F A G M G L P P I T D E E V E A A T Y A H G S K D M P E  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

451  R N I V E D I K F A Q E I I N K N R N G L E V V K A L A Q G  S.t. PduC
129  R N I V E D I K F A Q E I I S K N R N G L E V V K A L A Q G  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

481  G F T D V A Q D M L N I Q K A K L T G D Y L H T S A I I V G  S.t. PduC
159  G F T D V A Q D M L N I Q K A K L T G D Y L H T S A I I V G  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC
```

```
511  D G Q V L S A V N D V N D Y A G P A T G Y R L Q G E R W E E  S.t. PduC
189  D G Q V L S A V N D V N D Y A G P A T G Y R L Q G E R W E E  pAK4 PduC
1    - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK5 PduC

541  I K N I P G A L D P N E I D                                 S.t. PduC
219  I K N I P G A L D P N E L G                                 pAK4 PduC
1    I K N I P G A L D P N E L G                                 pAK5 PduC
```

E) Diol-Dehydratasen: β-Untereinheit

```
1    M E I N E K L L R Q I I E D V L R D M K G S D K P V S F N A  S.t. PduD
1    M E I N E R L L R Q I I E D V L S E M Q T S D K P V S F R S  pAK4 PduD
1    M E I N E K L L R Q I I E D V L S E M Q T S D K P V S F R S  pAK5 PduD

31   P A A S T A P Q T A A P A G D G F L T E V G E A R Q G T Q Q  S.t. PduD
31   S A A A T A P Q M A T A P G D S F L T E I G E A K Q G Q Q Q  pAK4 PduD
31   S T A A S A P Q A A A A Q G D S F L T E I G E A K Q G Q Q Q  pAK5 PduD

61   D E V I I A V G P A F G L A Q T V N I V G L P H K S I L R E  S.t. PduD
61   D E V I I A V G P A F G L S Q T V N I V G I P H K N I L R E  pAK4 PduD
61   D E V I I A V G P A F G L S Q T V N I V G I P H K S I L R E  pAK5 PduD

91   V I A G I E E E G I K A R V I R C F K S S D V A F V A V E G  S.t. PduD
91   V I A G I G E K A L K H A S S A A L N P S D V A F V A V E G  pAK4 PduD
91   V I A G I E E E G V K A R V I R C F K S S D V A F V A V E G  pAK5 PduD

121  N R L S G S G I S I G I Q S K G T T V I H Q Q G L P P L S N  S.t. PduD
121  N R L S G S G I S I G I Q S K G T T V I H Q Q G L P P L S N  pAK4 PduD
121  N R L S G S G I S I G I Q S K G T T V I H Q Q G L P P L S N  pAK5 PduD

151  L E L F P Q A P L L T L E T Y R Q I G K N A A R Y A K R E S  S.t. PduD
151  L E L F P Q A P L L T L E T Y R Q I G K N A A R Y A K R E S  pAK4 PduD
151  L E L F P Q A P L L T L E T Y R Q I G K N A A R Y A K R E S  pAK5 PduD

181  P Q P V P T L N D Q M A R P K Y Q A K S A I L H I K E T K Y  S.t. PduD
181  P Q P V P T L N D Q M A R P K Y Q A K S A I L H I K E T K Y  pAK4 PduD
181  P Q P V P T L N D Q M A R P K Y Q A K S A I L H I K E T K Y  pAK5 PduD

211  V V T G K N P Q E L R V A L                                 S.t. PduD
211  V V T G K N P Q E L R V A L                                 pAK4 PduD
211  V V T G K N P Q E L R V A L                                 pAK5 PduD
```

F) Diol-Dehydratasen: γ-Untereinheit

```
1    M N T D A I E S M V R D V L S R M N S L Q G D A P A A A P A  S.t. PduE
1    M N T D A I E S M V R D V L S R M N S L Q G E T - V T P A A  pAK4 PduE
1    M N T D A I E S M V R D V L S R M N S L Q G E T - V T P S A  pAK5 PduE

31   A G G T S R S A K V S D Y P L A N K H P E W V K T A T N K T  S.t. PduE
30   T G S S A H T A K V T D Y P L A N K H P E W V K T A T N K T  pAK4 PduE
30   T V S S T H T A K V T D Y P L A N K H P E W V K T A T N K T  pAK5 PduE

61   L D D F T L E N V L S N K V T A Q D M R I T P E T L R L Q A  S.t. PduE
60   L D D F T L E N V L S N K V T A Q D M R I T P E T L R I Q A  pAK4 PduE
60   L D D F T L E N V L S N K V T A Q D M R I T P E T L R L Q A  pAK5 PduE

91   S I A K D A G R D R L A M N F E R A A E L T A V P D D R I L  S.t. PduE
90   D I A K D A G R D R L A M N F E R A A E L T A V P D D R I L  pAK4 PduE
90   E I A K D A G R D R L A M N F E R A A E L T A V P D D R I L  pAK5 PduE

121  E I Y N A L R P Y R S T K E E L L A I A D D L E N R Y Q A K  S.t. PduE
120  E V - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK4 PduE
120  E I Y N A L R P Y R S T K D E L M A I A D D L E N R Y Q A K  pAK5 PduE

151  I C A A F V R E A A G L Y V E R K K L K G D D               S.t. PduE
121  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -               pAK4 PduE
150  I C A A F V R E A A V L Y V E R K K L K G D D               pAK5 PduE
```

Abbildung 20: (folgende Seiten)
Alignments der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Strukturgene der Reaktivierungsfaktoren aus pAK2, 3 und 7 mit denen aus *C. freundii* (A, B*)*, sowie der korrespondierenden Gene aus pAK5 mit denen aus *S. typhimurium* (C, D)
Referenzen: Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*, SEYFRIED et al. (1996); Diol-Dehydratase aus *S. typhimurium*, BOBIK et al. (1997); Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus pAK2 bis 5 und pAK7, diese Arbeit.
Die für alle angegebenen Proteine identischen Aminosäuren sind grau unterlegt.

A) Reaktivierungsfaktor Glycerin-Dehydratasen: α-Untereinheit

```
1    M P L I A G I D I G N A T T E V A L A Q H G R F I A S G I V  C.f. DhaF
1    M S L I A G I D I G N A T T E V A L A Q D G R F V A S G I V  pAK2 DhaF
1    M P L I A G I D I G N A T T E V A L A Q D G R F V A S G I V  pAK3 DhaF
1    M P L I A G I D I G N A T T E V A L A Q H G R F I A S G I V  pAK7 DhaF

31   A T T G M K G T R D N I A G V V A S L Q Q A L N N T P W S L  C.f. DhaF
31   A T T G M K A T R D N I A G V V A S L Q Q A L D N T P W S F  pAK2 DhaF
31   A T T G M K G T R D N I A G V V A S L Q Q A L E K T S S S L  pAK3 DhaF
31   A T T G M K G T R D N I A G V V A S L Q Q A L N N T P W S L  pAK7 DhaF

61   Q D V A K I C I N E A A P V I G D V A M E T I T E T I I T E  C.f. DhaF
61   Q D V A K I F I N E A A P V I G D V A M E T I T E T I I T E  pAK2 DhaF
61   Q D V T K I C I N E A A P V I G D V A M E T I T E T I I T E  pAK3 DhaF
61   Q D V A K I C I N E A A P V I G D V A M E T I T E T I I T E  pAK7 DhaF

91   S T M I G H N P Q T P G G V G V G M G T T I A V E K L A A L  C.f. DhaF
91   S T M I G H N P Q T P G G V G V G M G T T I A V A K L A S L  pAK2 DhaF
91   S T M I G H N P Q T P G G V G V G M G T T I A V E K L A S L  pAK3 DhaF
91   S T M I G H N P Q T P G G V G V G M G T T I A V E K L A A L  pAK7 DhaF

121  S E D R F T Q G W I P L V G E E R D F L E A V W F I N E A L  C.f. DhaF
121  R E D Q F A Q G W I P L V G E E I D F L E A V W L I N E A L  pAK2 DhaF
121  S L D R F A Q G W I - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
121  S E D R F T Q G W I P L V G E E R D F L E A V W F I N E A L  pAK7 DhaF

151  D R G V N V V A A I L K K D D G V L V N N R L R R T M P V V  C.f. DhaF
151  D R G V N V V A A I L K K D D G V L V N N R L H R T M P V I  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
151  D R G V N V V A A I L K K D D G V L V N N R L R R T M P V V  pAK7 DhaF

181  D E V T L L E K V P E G V L A A V E V A A P G Q V V R V L S  C.f. DhaF
181  D E V T L L E K V P E G V Q A A V E V A T T G Q V V R V L S  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
181  D E V T L L E K V P E G V L A A V E V A A P G Q V V R V L S  pAK7 DhaF

211  N P Y G I A T F F T L T P E E T Q T I V P I A R A L I G N R  C.f. DhaF
211  N P Y G I A T F F A L T P E E T Q T I V P I A R A L I G N R  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
211  N P Y G I A T F F T L T P E E T Q T I V P I A R A L I G N R  pAK7 DhaF

241  S A V V L K T P Q G D V R S R V I P A G K I F I R G E K R G  C.f. DhaF
241  S A V V L K T P Q G D V R S R V I P A G K I F I S G E K R G  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
241  S A V V L K T P Q G D V R S R V I P A G K I F I R G E K R G  pAK7 DhaF

271  G E A D V A Q G A Q A I M Q A M S T C A P V C D I R G E A G  C.f. DhaF
271  G E A D V A Q G A Q A I M Q A M N A C V P V C D I H G E A G  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
271  G E A D V A Q G A Q A I M Q A M S T C A P V C D I R G E A G  pAK7 DhaF

301  T H A G G M L E R V R K V M A S L T G H D M N A V Y I Q D L  C.f. DhaF
301  T H A G G M L E R V R K V M A S L S G D D M N S V H I Q D L  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
301  T H A G G M L E R V R K V M A S L T G H D M N A V Y I Q D -  pAK7 DhaF

331  L A V D T F I P R K V Q G G I A G E C S M E N A V G I A A M  C.f. DhaF
331  L A V D T F I P R K V H G G I A G E Y S M E N A V G I A A M  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
329  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK7 DhaF

361  V K S D R L Q M Q A I A S E L S A R L N I P V E V G G V E A  C.f. DhaF
361  V K S D R L Q M Q A I A S E L S V R L N T P V E V G G V E A  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
329  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK7 DhaF
```

```
391  N M A V A G A L T T P G C A A P L A I L D L G A G S T D A A  C.f. DhaF
391  N M A V A G A L T T P G C A A P L A I L D L G A G S T D A A  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
329  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK7 DhaF

421  I I N S D G V V K A V H L A G A G N M V S L L I Q T E L G L  C.f. DhaF
421  I I N G D G T V K A V H L A G A G N M V S L L I K T E L G L  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
329  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK7 DhaF

451  S D P F L A E E I K K Y P L A K V E S L F S I R H E N G A V  C.f. DhaF
451  S D S F L A E E I K K Y P L A K V E S L F S I R H E N G A V  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
329  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK7 DhaF

481  E F F R E P L S P S V F A K V V Y L K N G E L I P V D N Q T  C.f. DhaF
481  E F F R E P L S P S V F A K V V Y L K A G E L I P V D N Q T  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
329  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK7 DhaF

511  S L E K I R L V R R Q A K E K V F V T N C L R A L R Q V S P  C.f. DhaF
511  S L E K I R L V R R K A K E K V F V T N C L R A L H Q V S P  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
329  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK7 DhaF

541  G G S I R D M T F V V L V G G S S L D F E I P Q M I T D A L  C.f. DhaF
541  G G S I R N I S F V V L V G G S S L D F E I P Q M I T D A L  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
329  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK7 DhaF

571  A H Y G V V A G Q G N I R G T E G P R N A V A T G L V L A G  C.f. DhaF
571  A N Y G V V A G Q G N I R G T E G P R N A V A T G L V L A G  pAK2 DhaF
130  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK3 DhaF
329  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  pAK7 DhaF
```

B) Reaktivierungsfaktor Glycerin-Dehydratasen: β Untereinheit

```
1    M S L S S P G V H L F Y H S R W Q G T R V L D E L C W G L E  C.f. DhaG
1    M L L S S P G V H L F Y H S R W Q G T R V L D E L C W G L E  pAK7 DhaG

31   E Q G V P C R A I C C D D H D C A L A L G K L A A K S S T L  C.f. DhaG
31   E Q G V P C R A I C C D D H D C A L A L G K L A A K S S A L  pAK7 DhaG

61   R V G L G L N A T G D I A L T H A Q L P E D R A L V C G H T  C.f. DhaG
61   R V G L G L N A T G D I A L T H A Q L P E D R A L V C G H T  pAK7 DhaG

91   R A G T A Q I R T L G A N A G Q L V K V L P F S E I K        C.f. DhaG
91   R A G T A Q I R T L G A N A G Q L V K V L P F S E I K        pAK7 DhaG
```

C) Reaktivierungsfaktor Diol-Dehydratasen: α Untereinheit

```
1    M R Y I A G I D I G N S S T E V A L A R Q D E T G A L T I T  S.t. PduG
1    M R Y I A G I D I G N S S T E V A L A T L D D A G T L S I K  pAK5 PduG

31   H S A L A E T T G I K G T L R N V F G I Q E A L A L V A K R  S.t. PduG
31   A S A L A E T T G I K G T L R N V F G I Q E A L T L A A K N  pAK5 PduG

61   A G I N V R D I S L I R I N E A T P V I G D V A M E T I T E  S.t. PduG
61   A G I N V S D I S L I R I N E A T P V I G D V A M E T I T E  pAK5 PduG

91   T I I T E S T M I G H N P K T P G G A G L G V G I T I T P E  S.t. PduG
91   T I I T E S T M I G H N P K T P G G V G L G V G V T I T P E  pAK5 PduG

121  E L L T R P A D S S Y I L V V S S A F D F A D I A N V I N A  S.t. PduG
121  E L L T R P A D I P Y I L V V S S A F D F A D V A T M I N A  pAK5 PduG

151  S M R A G Y Q I T G V I L Q R D D G V L V S N R L E K S L P  S.t. PduG
151  S V R A G Y Q L T G V I L Q Q D D G V L V S N R L T T P L P  pAK5 PduG

181  I V D E V L Y I D R I P L G M L A A I E V A V P G K V I E T  S.t. PduG
181  I V D E V L Y I D R I P L G M L A A I E V A V P G K V I E T  pAK5 PduG

211  L S N P Y G I A T V F N L N A D E T K N I V P M A R A L I G  S.t. PduG
211  L S N P Y G I A T V F N L N A E E T K N I V P M A R A L I G  pAK5 PduG

241  N R S A V V V K T P S G D V K A R A I P A G N L E L Q A Q G  S.t. PduG
241  N R S A V V V K T P S G D V K A R A I P A G N L E L Q S Q G  pAK5 PduG

271  R T V R V D V A A G A E A I M K A V D G C G K L D N V T G E  S.t. PduG
271  R T V R V D V A A G A E A I M K A V G D C P R L D N V T G E  pAK5 PduG

301  A G T N I G G M L E H V R Q T M A E L T N K P S S E I F I Q  S.t. PduG
301  A G T N I G G M L E H V R Q T M A E L T N K P S H E I F I Q  pAK5 PduG

331  D L L A V D T S V P V S V T G G L A G E F S L E Q A V G I A  S.t. PduG
331  D L L A V D T S V P V S V T G G L A G E F S L E Q A V G I A  pAK5 PduG

361  S M V K S D R L Q M A M I A R E I E Q K L N I D V Q I G G A  S.t. PduG
361  S M V K S D R L Q M A M I A Q E I T Q K L N I D V Q V G G A  pAK5 PduG

391  E A E A A I L G A L T T P G T T R P L A I L D L G A G S T D  S.t. PduG
391  E A E A A I L G A L T T P G T T R P L A I L D L G A G S T D  pAK5 PduG

421  A S I I N P K G E I I A T H L A G A G D M V T M I I A R E L  S.t. PduG
421  A S I I N P K G E I I A T H L A G A G D M V T M I I A R E L  pAK5 PduG

451  G L E D R Y L A E E I K K Y P L A K V E S L F H L R H E D G  S.t. PduG
451  G L D D R Y L A E E I K K Y P L A K V E S L F H L R H E D G  pAK5 PduG

481  S V Q F F P T P L P P A V F A R V C V V K P D E L V P L P G  S.t. PduG
481  S V Q F F P S P L P P T V F A R V C V V K P D E L V P L P G  pAK5 PduG

511  D L A L E K V R A I R R S A K E R V F V T N A L R A L R Q V  S.t. PduG
511  D L A L E K V R A I R R S A K E R V F V T N A L R A L R Q V  pAK5 PduG

541  S P T G N I R D I P F V V L V G G S S L D F E V P Q L V T D  S.t. PduG
541  S P T G N I R D I P F V V L V G G S S L D F E V P Q L V T D  pAK5 PduG

571  A L A H Y R L V A G R G N I R G S E G P R N A V A T G L I L  S.t. PduG
571  A L A H Y R L V A G R G N I R G T E G P R N A V A T G L I L  pAK5 PduG

601  S W H K E F A H G Q                                         S.t. PduG
601  S W Y K A F A H G K                                         pAK5 PduG
```

D) Reaktivierungsfaktor Diol-Dehydratasen: β Untereinheit

```
1    M D S N H S A P A I V I T V I N D C A S L W H E V L L G I E  S.t. PduH
1    M E S N L S A P A I V I F T L G D C T S L W N D V L L G I E  pAK5 PduH

31   E E G I P F L L Q H H P A G D I V D S A W Q A A R S S P L L  S.t. PduH
31   E E G I P F V I R E S H S T D T I H S A W L A A C Q S P L L  pAK5 PduH

61   V G I A C D R H S L V V H Y K N L P A S A P L F T L M H H Q  S.t. PduH
61   V G I G C N Q E Q L V V H Y K N L P T S A P L F T L T Y Q Q  pAK5 PduH

91   D S Q A Q R N T G N N A A R L V K G I P F G I S M L N H R R  S.t. PduH
91   D S H A R R S I G N N A A R L V K G I P F - - - - - - - R E  pAK5 PduH

121  T A V                                                       S.t. PduH
114  C H S                                                       pAK5 PduH
```

3.3.3.2 Komplementation der unvollständigen Dehydratase-Gene und Subklonierung in Expressionsvektoren

Um die Genprodukte der unvollständig klonierten Dehydratase-Gene (pAK3-5) ebenfalls in die biochemische Charakterisierung einbeziehen zu können, wurde eine Komplementation dieser Gene angestrebt. Es wurde versucht, die fehlenden Teile der Gene durch die entsprechenden Abschnitte aus dem nächsten Verwandten mit Hilfe von PCR-Techniken zu ersetzen. Der bei pAK3 fehlende Bereich von *dhaB* sollte somit durch *dhaB* aus *C. freundii* ersetzt werden. Für die Gene *pduC* und *pduE* von pAK4 und pAK5 war eine Vervollständigung mit den entsprechenden Genbereichen aus *S. typhimurium* vorgesehen.

Zu diesem Zweck wurde eine sogenannte „Megaprime“-PCR durchgeführt (s. Abb. 21). Durch diese Technik lassen sich überlappende DNA-Fragmente von einer Größe von mehr als 1000 Bp zusammensetzen (BARIK und GALINSKY, 1997). Am Beispiel der Komplementation von pAK3 soll dies im Folgenden verdeutlicht werden. Die Methode beruhte auf dem Einsatz von vier verschiedenen Oligonukleotiden (CF-1, CF-2, pAK3-1 und pAK3-2, s. 2.1, Tab.3) zur Amplifikation zweier unterschiedlicher PCR-Fragmente. Das 3´-Oligonukleotid des 5´-gelegenen Fragments (CF-2) und das 5´-Oligonukleotid des anderen PCR-Fragments (pAK3-1) wiesen dabei einen komplementären Bereich von mehr als 20 Nukleotiden auf.

Zunächst wurden zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen durchgeführt, um die zwei Einzelfragmente zu amplifizieren (s. Abb. 21B und C). Mit den Oligonukleotiden CF-1 und CF-2 wurde ein ca. 1,1 kBp-großes Fragment aus *dhaB* von *C. freundii* amplifiziert (s. Abb. 22), als Template diente das Plasmid pGEX2T/dhaB (RÖSKENS, 1997).

Anschließend wurden mit Hilfe der Oligonukleotide pAK3-1 und pAK3-2 die unvollständig klonierten Dehydratase-Genregionen aus pAK3 auf einem ca. 1,6 kBp-großen PCR-Produkt amplifiziert (s. Abb. 22). Beide PCR-Reaktionen wurden mit einer DNA-Polymerase durchgeführt, die PCR-Produkte ohne die für die *Taq*-DNA-Polymerase typischen A-Überhänge bildete.

Die PCR-Produkte wurden gereinigt und dann in einen weiteren PCR-Schritt eingesetzt (Abb. 21D). Hier dienten sie dann sowohl als Matrize der Reaktion als auch als Primer für die DNA-Polymerase. Die denaturierten Einzelstränge banden an die komplementäre Sequenz des Überlappungspartners und fungierten so als Mega-Primer.

In den ersten Zyklen der PCR entstehen so zunächst einzelne komplettierte Dehydratase-Genregionen. Um eine exponentielle Amplifikation zu gewährleisten, wurden diesem Ansatz noch die Oligonukleotide CF-1 und pAK3-2 hinzugefügt, die am 5´- und 3´-Ende des Komplettfragments banden. Diese Reaktion wurde mit der Herculase enhanced DNA-Polymerase durchgeführt.

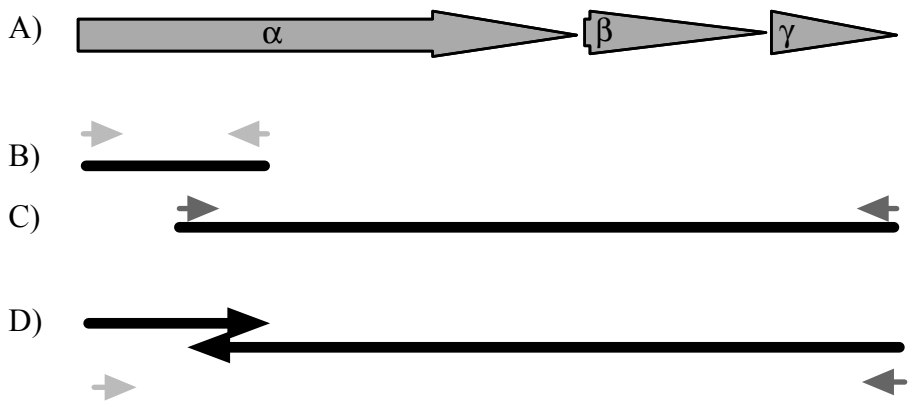


Abbildung 21: Schematische Darstellung der sog. „Megaprime“-PCR zur Komplementation der unvollständig klonierten Glycerin- und Diol-Dehydratasen auf pAK3, pAK4 und pAK5
In A) ist die genetische Organisation der Glycerin- und Diol-Dehydratasen dargestellt. Die kurzen hell- und dunkelgrauen Pfeile markieren die Position der verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation der beiden Einzelfragmente (B und C) bzw. zur exponentiellen Amplifikation des Gesamtkonstruktes (D).

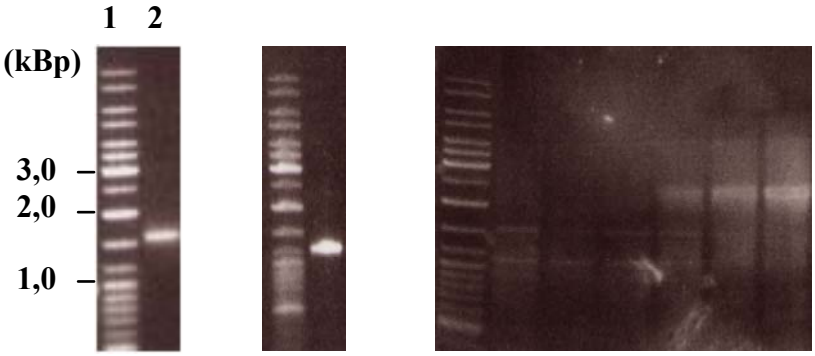


Abbildung 22: Amplifizierte Einzelfragmente und das zusammengesetzte Produkt der „Megaprime"-PCR
In Spur 1 ist jeweils der Längenstandard aufgetragen. Spuren 2 und 3: Amplifizierte Einzelfragmente aus *C. freundii* und pAK3; Spuren 4 – 9: Ergebnisse der PCR-Reaktionen zur Amplifikation des Cf/pAK3-Hybrid-Fragments bei verschiedenen Annealing-Temperaturen im Gradienten-Cycler.

Analog zu dem beschriebenen Verfahren wurden Ergänzungs-Fragmente für pAK4 und pAK5 aus dem entsprechenden Genbereich von *S. typhimurium* bzw. *K. oxytoca* hergestellt. Alle verwendeten Oligonukleotide und die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 5 (s. 2.12.1) zusammengestellt. Für pAK5 konnte mit dieser Strategie ebenfalls ein Komplettfragment erhalten werden, für pAK4 war die Methode trotz Variation der Reaktionsbedingungen leider nicht erfolgreich.

Die vollständig klonierten Strukturgene der Dehydratasen, die auf pAK2 und pAK7 kodiert waren, wurden ebenfalls in einer PCR-Reaktion amplifiziert (s. Tab. 5). Alle erhaltenen PCR-Produkte sollten anschließend in die Expressionsvektoren pET100/D-TOPO oder pET101/D-TOPO kloniert werden (s. 2.3.4.1). Um eine gerichtete Klonierung in diese Vektoren zu erreichen, besaßen die 5´-Oligonukleotide der Gesamtfragmente die Erkennungssequenz 5´-CACC-3`, die auf den Vektoren komplementär als Einzelstrangüberhang vorhanden war. Für eine spätere Reinigung der gebildeten Proteine war auf den Vektoren außerdem ein Fusions-His_6-Tag kodiert, der bei Produktion der auf dem Plasmid kodierten Proteine am N- oder am C-Terminus angehängt wurde. Nach der Ligation der PCR-Produkte in die Vektoren wurden die rekombinanten Plasmide in *E. coli* DH5α transformiert und die Transformanten auf LB-Ampicillin-Agar selektioniert. Die erhaltenen Klone wurden zur Überprüfung des Klonierungserfolges einer Plasmidpräparation und einem Restriktionsverdau unterzogen. So konnten die Größe der Plasmide und die Orientierung des Inserts im

Vektor überprüft werden. Die Plasmidkonstrukte wurden entsprechend der ursprünglich identifizierten Plasmide mit pAK2.1, pAK3.1, pAK5.1 und pAK7.1 bezeichnet und im Weiteren für Expressionsversuche der Diol- und Glycerin-Dehydratasen herangezogen.

3.3.3.3 Heterologe Expression und Reinigung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen

Die heterologe Expression der Dehydratase-Gene aus pAK2.1, pAK3.1, pAK5.1 sowie pAK7.1 erfolgte durch Transformation der konstruierten Plasmide in dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3) und Anzucht in DYT-Medium (s. 2.2.2). Die Genexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert (s. 2.3.4).

Nach der Induktion trat eine Wachstumsverzögerung ein und die Analyse durch SDS-PAGE zeigte mit fortschreitender Inkubationsdauer das Auftreten von drei Proteinbanden mit den Molekularmassen von 60, 21 und 16 kDa in den Rohextrakten von *E. coli* BL21/pAK2.1 und BL21/pAK7.1 sowie von 69 , 24 und 19 kDa in den Rohextrakten von *E. coli* BL21/pAK5.1 (Daten nicht gezeigt). Diese Banden sind typisch für die drei Untereinheiten der Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- bzw. Diol-Dehydratasen. Bei den Rohextrakten von *E. coli* BL21/pAK3.1 waren diese Banden nicht festzustellen, außerdem war im Gegensatz zu den anderen untersuchten Extrakten keine Dehydratase-Aktivität nachweisbar. Aufgrund dessen konnten im Folgenden nur die Enzyme, die von den rekombinanten Plasmiden pAK2.1, pAK5.1 und pAK7.1 kodiert waren in eine biochemische Charakterisierung einbezogen werden.

Die Reinigung der Dehydratasen erfolgte über den bei der Klonierung angehängten His_6-Tag durch eine Affinitätschromatographie an Ni^{2+}-NTA-Agarose (s. 2.17.1 und Abb. 23). Die Reinigung erfolgte entgegen dem Herstellerprotokoll mit K^+-haltigen Puffern (statt Na^+), da für die bekannten B_{12}-abhängigen Dehydratasen aus *Lactobacillus*, *Klebsiella* und *Citrobacter* eine signifikante Verringerung der Enzymaktivität in Gegenwart von Na^+-Ionen beschrieben worden ist (SMILEY und SOBOLOLOV, 1962; SCHNEIDER und PAWELKIEWICZ, 1966; TORAYA und FUKUKI, 1977; SEYFRIED, 1996).

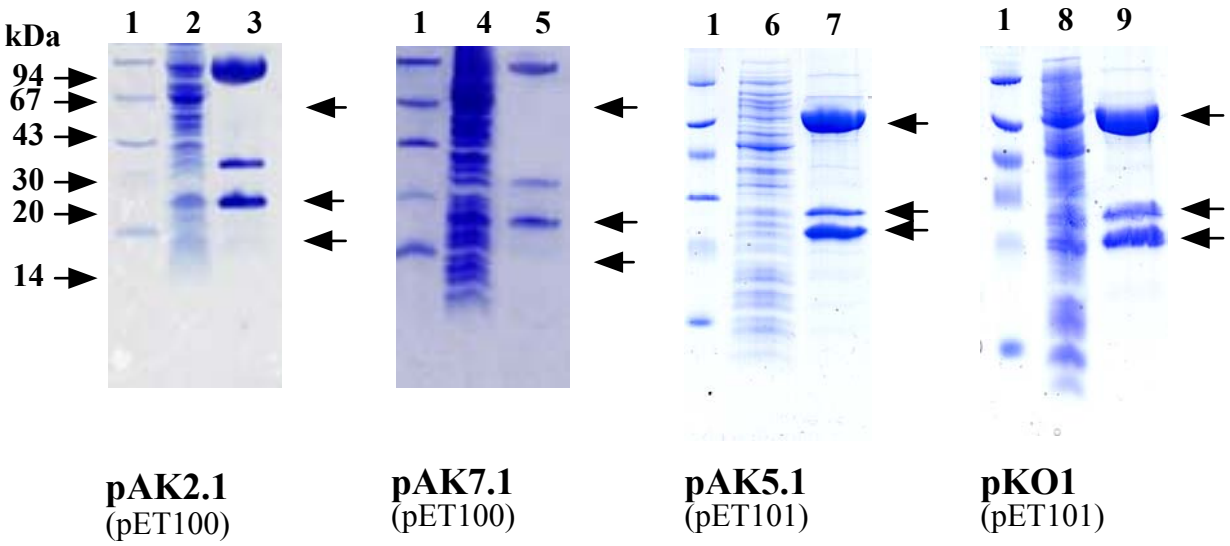


Abbildung 23: SDS-PAGE-Analyse der heterologen Produktion und Reinigung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus pAK2.1, pAK5.1 und pAK7.1
Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Ni^{2+}-NTA-Agarose (s. 2.17.1) und wurde mittels SDS-PAGE (s. 2.10.1) und anschließender Färbung mit Coomassie-Blau (s. 2.20.1) analysiert.
Spur 1: Markerproteine
Spur 2: Rohextrakt von *E. coli* BL21/pAK2.1
Spur 3: Eluat nach Reinigung von *E. coli* BL21/pAK2.1
Spur 4: Rohextrakt von *E. coli* BL21/pAK7.1
Spur 5: Eluat nach Reinigung von *E. coli* BL21/pAK7.1
Spur 6: Rohextrakt von *E. coli* BL21 (DE3)/pAK5.1
Spur 7: Eluat nach Reinigung von *E. coli* BL21/pAK5.1.

Zur Reinigung der Dehydratasen wurden die Rohextrakte auf eine mit Zellaufschlußpuffer äqulibrierte Ni^{2+}-NTA-Agarose-Säule (Bettvolumen 4 ml) aufgetragen. Nach einer Inkubation für 1 h bei 4 °C wurde die Säule mit 10 bis 12 ml Zellaufschlußpuffer gewaschen. Nach einem weiteren Waschschritt mit 10 bis 12 ml Puffer I (enthält 20 mM Imidazol) erfolgte die Elution des Proteins mit 2 bis 4 ml eines Puffers, der 250 mM Imidazol enthielt. Das Imidazol führte dabei zu einer kompetitiven Verdrängung des Histidins und damit zur Elution von Proteinen mit His_6-Tag. Die nachfolgende Analyse der Reinigung durch eine SDS-PAGE zeigte, dass auf diese Weise nahezu homogene Proteine erhalten wurden (s. Abb. 23). In allen drei untersuchten Eluaten konnten wieder drei Proteinbanden mit den für die Untereinheiten der Glycerin- und der Diol-Dehydratasen typischen Molekularmassen erhalten werden.

Dabei war zu beachten, dass die Diol-Dehydratase aus pAK5.1 den His_6-Tag sowie das V5-Epitop (s. Vektorkarte Abb. 4) am N-Terminus der γ-Untereinheit besaß, so dass die γ-Untereinheit um ca. 3 kDa größer war und somit signifikant höher im Gel lief (s. Abb. 23). Die Glycerin-Dehydratasen dagegen besaßen die zusätzlichen Aminosäuren für den His_6-Tag und das Xress-Epitop (s. Vektorkarte, Abb. 4) am C-Terminus der α-Untereinheit, dies führte jedoch aufgrund der Gesamtgröße des Proteins nur zu geringen Veränderungen des Laufverhalten in der SDS-PAGE.

Im Rahmen dieser Experimente wurde ebenfalls die Coenzym B_{12}-abhängige Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* produziert und gereinigt, um eine Kontrolle für die anschließenden biochemischen Untersuchungen der gereinigten Dehydratase zur Verfügung zu haben. Die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* ist in den vergangenen Jahren ausführlich in unserem Labor charakterisiert worden (DANIEL et al. 1992, SEYFRIED et al. 1996, SEIFERT et al. 2001). Das rekombinante Plasmid pCS120 (SEIFERT et al. 2001), das die 3 Strukturgene *dhaBCE* zusammen mit einer für einen His_6-Tag kodierenden Sequenz kolinear zum T7-Promotor von pBluescript SK^+ enthält, konnte als Ausgangsmaterial für die Expression eingesetzt werden. Das Plasmid pCS120 wurde in *E. coli* JM109 transformiert. Die Expression der *dhaBCE*-Gene und die Reinigung der Dehydratase aus *C. freundii* erfolgten wie oben beschrieben.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Reinigung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus *E. coli* BL21/pAK2.1, *E. coli* BL21/pAK5.1, *E. coli* BL21/pAK7.1 und *C. freundii* (pCS120)

Plasmid/ Anreicherungsschritt	Protein [mg/ml]	Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung
pAK2.1				
Rohextrakt	15,7	14,7	100	1,0
Ni^{2+}-NTA-Agarose	0,13	119,5	65	8,1
pAK5.1				
Rohextrakt	9,5	8,7	100	1,0
Ni^{2+}-NTA-Agarose	0,50	96,4	37	11,1
pAK7.1				
Rohextrakt	15,8	14,1	100	1,0
Ni^{2+}-NTA-Agarose	0,62	111,8	47	7,9
pCS120 (*C. freundii*)				

Rohextrakt	12,7	9,7	100	1,0
Ni^{2+}-NTA-Agarose	0,34	134,1	41	13,8

Die Bilanz der Anreicherung aller Dehydratasen durch die beschriebenen Expressionsversuche und Reinigungsschritte ist in Tabelle 15 zusammengefasst. Es konnten Anreicherungsfaktoren zwischen 7,8 und 13,8 erhalten werden. Somit konnten die Dehydratasen in ausreichender Menge für die folgenden biochemischen Untersuchungen produziert und gereinigt werden.

3.3.3.4 Bestimmung der Molekularmassen der Glycerin- und Diol-Dehydratasen durch Aktivitätsfärbung

Zur Bestimmung der nativen Molekularmasse der Glycerin- und Diol-Dehydratasen wurde eine Aktivitätsfärbung nach TOBIMATSU et al. (1995) (s. 2.20.2) durchgeführt. Die Färbung beruhte darauf, dass das bei Dehydratisierung von 1,2-Propandiol gebildete Propionaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin ein gelbes Präzipitat bildete. Für die Aktivitätsfärbung wurden Rohextrakte der rekombinanten *E. coli*-Stämme JM109/pCS120, BL21(DE3)/pAK2.1, BL21(DE3)/pAK5.1 und BL21(DE3)/pAK7.1 einer nativen Gradienten-PAGE (s. 2.19.2) unterzogen. Die Aktivitätsfärbung wurde wie unter 2.20.2 beschrieben unmittelbar nach der elektrophoretischen Auftrennung durchgeführt. Dazu wurden die Gele in Reaktionspuffer, der 1,2-Propandiol und Coenzym B_{12} enthielt für 15 min bei 37 °C inkubiert. Proteinbanden, die eine Dehydratase-Aktivität aufwiesen, konnten anschließend durch Anfärbung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin identifiziert werden. Die Ergebnisse der Aktivitätsfärbungen sind in Abbildung 24 dargestellt.

Die von *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 produzierten Dehydratasen zeigten wie das Enzym aus *C. freundii* die für die Glycerin-Dehydratasen typische Bande im Molekularmassenbereich von 190 kDa. Die Hybrid-Diol-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK5.1 besaß eine größere Molekularmasse von ca. 230 kDa. Auch die Größe der angefärbten Diol-Dehydratase von ca. 230 kDa stimmte gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten überein. Die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* besitzt ebenfalls eine Molekularmasse von ca. 230 kDa (TOBIMATSU et al., 1995).

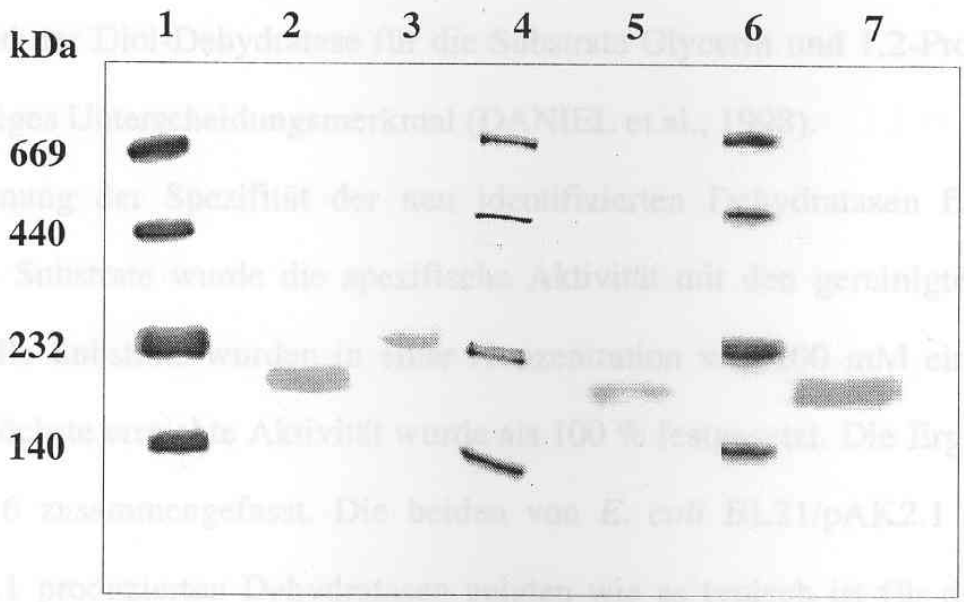


Abbildung 24: Aktivitätsfärbung der heterolog exprimierten Glycerin- und Diol-Dehydratasen nach Auftrennung von Rohextrakten durch native Gradienten-PAGE
Die Rohextrakte der rekombinanten *E. coli*-Stämme JM109/pCS120, BL21(DE3)/pAK2.1, BL21(DE3)/pAK5.1 und BL21(DE3)/pAK7.1 wurden wie unter 2.14 beschrieben hergestellt und einer nativen Gradienten-PAGE unterzogen. Anschließend wurde die Aktivitätsfärbung nach TOBIMATSU et al. (1995) durchgeführt (s. 2.20.2).
Spur 1: Markerproteine
Spur 2: Rohextrakt von *E. coli* JM109/pCS120
Spur 3: Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pAK5.1
Spur 4: Markerproteine
Spur 5: Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pAK2.1
Spur 6: Markerproteine
Spur 7: Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pAK7.1

3.3.3.5 Bestimmung der Substratspezifität der Glycerin- und Diol-Dehydratasen

Alle bisher beschriebenen Glycerin- und Diol-Dehydratasen katalysieren die Coenzym B_{12}-abhängige Umwandlung von Glycerin, 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol zu den entsprechenden Aldehyden (PAWELKIEWICZ und ZAGALAK, 1965; SMILEY und SOBOLOV 1962; SEYFRIED et al. 1996). Die unterschiedlichen Spezifitäten der

Glycerin- und der Diol-Dehydratase für die Substrate Glycerin und 1,2-Propandiol gilt als ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal (DANIEL et al., 1998).

Zur Bestimmung der Spezifität der neu identifizierten Dehydratasen für die oben aufgeführten Substrate wurde die spezifische Aktivität mit den gereinigten Proteinen bestimmt. Alle Substrate wurden in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt und die jeweils höchste erreichte Aktivität wurde als 100 % festgesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die beiden von *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 produzierten Dehydratasen zeigten wie es typisch ist für diese Gruppe von Dehydratasen, die höchste Aktivität mit Glycerin als Substrat. In Gegenwart von 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol lag die relative Aktivität bei 31 und 21 % sowie bei 7 und 2 %. Diese Werte stimmen gut mit denen überein, die für die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* bestimmt wurden (SEYFRIED et al. 1996).

Tabelle 16: Substratspezifität der Dehydratasen aus *E. coli* BL21/pAK2.1, pAK5.1, pAK7.1 und *C. freundii*
Die Aktivitätsbestimmung wurde wie unter 2.16 beschrieben durchgeführt. Die getesteten Substrate lagen jeweils in einer Konzentration von 100 mM im Testansatz vor. Die jeweils höchste gemessene Aktivität wurde als 100 % gesetzt. Die jeweils höchsten spezifischen Aktivitäten entsprachen den denen in Tab. 15 angegebenen Werten.

Quelle der Dehydratase	**Relative Aktivität [%]**		
	Glycerin	**1,2-Propandiol**	**1,2-Ethandiol**
pAK2.1	100	31	7
pAK5.1	96	100	41
pAK7.1	100	21	2
C. freundii *	100	30	16

* Daten übernommen von SEYFRIED et al. (1996).

Das als Diol-Dehydratase eingestufte Enzym aus *E. coli* BL21/pAK5.1 zeigte erwartungsgemäß die höchste spezifische Aktivität mit dem Substrat 1,2-Propandiol. Im Gegensatz zu den anderen Diol-Dehydratasen trat mit Glycerin kein großer Aktivitätsabfall im Vergleich zu 1,2-Propandiol auf. Keine der untersuchten Dehydratasen zeigte Aktivität in Abwesenheit des Kofaktors Coenzym B_{12}.

3.3.3.6 Inaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen durch Glycerin

Alle in der Literatur beschriebenen und auch die im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen waren in der Lage Glycerin, 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol zu den entsprechenden Aldehyden umzusetzen. Die beiden nahe miteinander verwandten Enzymklassen wurden ausführlich bei den Enterobacteriaceae untersucht. Es ist bekannt, dass die Katalysereaktion über einen radikalischen Mechanismus unter Einbeziehung des Coenzyms B_{12} abläuft. Die Interaktion zwischen Apoenzym und Coenzym bewirkt eine Aktivierung der Co-C-Bindung des Coenzyms B_{12}. Das hat die Homolyse dieser Bindung zur Folge und es kommt zur Bildung von Cob(II)alamin und einem Adenosyl-Radikal. Das Adenosyl-Radikal abstrahiert anschließend ein H-Atom vom Substrat. Das so gebildete Substrat-Radikal rearangiert zum Produkt-Radikal durch einen Hydroxylgruppentransfer von C2 zu C1. Das Resultat ist die Bildung des Produkt und die Regeneration des Coenzyms.

Gemeinsam ist den B_{12}-abhängigen Dehydratasen auch, dass sie bei Inkubation mit Glycerin als Substrat einer irreversiblen Inaktivierung unterliegen (DANIEL et al., 1998; TORAYA 2000). Die sogenannte „Suicide“-Inaktivierung der Dehydratasen in Gegenwart von Glycerin wird durch eine irreversible Spaltung der Co-C-Bindung hervorgerufen, dabei entsteht 5´-Desoxyadenosin und eine unbekannte Cobalaminspezies (BACHOVCHIN et al., 1977 und 1978; TORAYA 1998). Diese unbekannte Cobalaminspezies bindet mit hoher Affinität an die Dehydratase und inaktiviert diese irreversibel (POPPE und RETEY, 1997).

Die neu identifizierten Glycerin- und Diol-Dehydratasen wurden auf diese Eigenschaft hin untersucht. Innerhalb der ersten Minute erfolgte in Gegenwart von Glycerin bei allen Dehydratasen noch kein signifikanter Aktivitätsverlust (s. Abb. 25). Deutliche Unterschiede traten dann nach ca. 3 min Inkubation auf. Die von *E. coli* BL21/pAK5.1 produzierte Diol-Dehydratase wies hier noch fast 70 % ihrer Ausgangsaktivität auf. Auch die Dehydratase aus *C. freundii* lag noch bei etwa 60 % der zu Beginn gemessenen Aktivität. Die von *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 dagegen hatten einen Aktivitätsverlust von 60 bis 70 % zu verzeichnen. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten betrugen die gemessenen Aktivitäten der Glycerin- und Diol-Dehydratasen zwischen 12 und 45 % der Anfangsaktivität. Nach 42 min

konnte bei allen untersuchten Enzymen nur noch eine geringe Restaktivität von 0,4 bis 2 % detektiert werden.

Inkubiert man die Dehydratasen anstelle von Glycerin mit 1,2-Propandiol als Substrat, ist diese rasche Inaktivierung der Enzyme nicht zu beobachten. Die Glycerin-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK7 blieb sogar über den gesamten Meßzeitraum von 42 min zu 100 % stabil (s. Abb. 25C). Zum Vergleich zeigten die Messungen bei den Dehydratasen aus *C. freundii* (pCS120) und *E. coli* BL21/pAK2.1 einen Aktivitätsverlust von 5 bzw. 20 % nach 42 min. Ähnliche Werte wurden auch für die Diol- und Glycerin-Dehydratasen aus *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* durch die Arbeitsgruppen TORAYA et al. (1976) und POZNANSKAYA et al. (1977) publiziert. Auffällig sind die deutlichen Aktivitätseinbußen während der Messungen mit der Dehydratase aus pAK5.1. Zunächst zeigte sich auch dieses Enzym stabil, nach 21 min liegt die relative Aktivität noch bei 94 %. Danach kommt es jedoch zu einem deutlichen Verlust, so dass nach 42 min nur noch 48 % Aktivität zu detektieren sind.

Ein direkter Vergleich der Inaktivierungskurven aller untersuchter Dehydratasen bei Inkubation mit Glycerin zeigte keine einheitliche Trennung zwischen Diol- und Glycerin-Dehydratasen. Die geringste Inaktivierung innerhalb der ersten 3 min verzeichneten die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* (pCS120) und die Hybrid-Diol-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK5.1 mit ca. 40 % Verlust. Deutlich sensitiver waren die Glycerin-Dehydratasen aus *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 mit Restaktivitäten von nur 40 bzw. 17 % nach 3-minütiger Katalysereaktion.

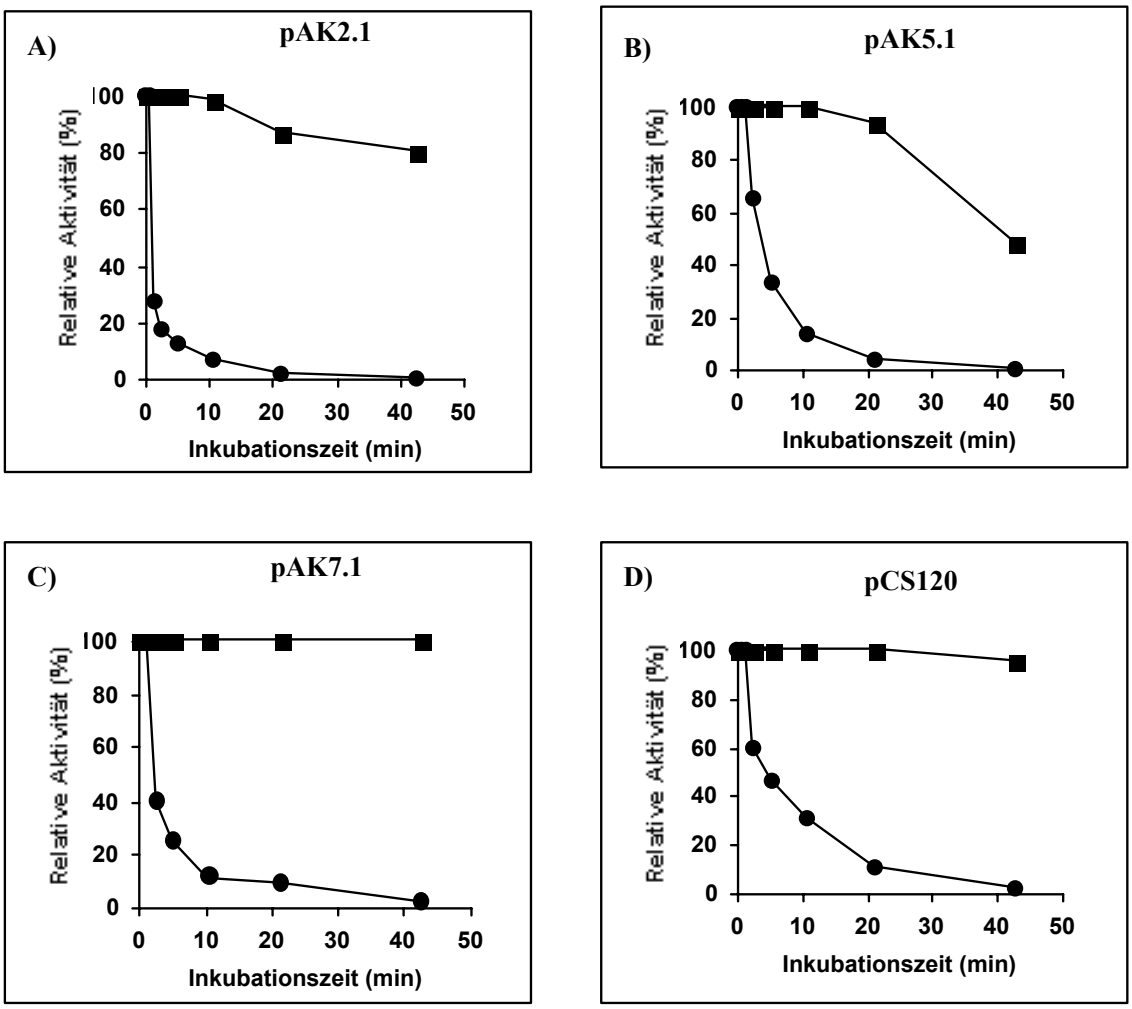


Abbildung 25: Inaktivierung der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* und aus pAK2.1 bzw. pAK7.1 sowie der Diol-Dehydratase aus pAK5.1
Dargestellt sind die relativen Aktivitäten der aus *E. coli* BL21/pAK2.1 (A), *E. coli* BL21/pAK5.1 (B) *E. coli* BL21/pAK7.1 (C) und *E. coli* JM109/pCS120 (D) gereinigten Dehydratasen im Verlauf der Umsetzung mit Glycerin (●) bzw. 1,2-Propandiol (■). Die Aktivitätsbestimmungen wurden wie unter 2.16.1 beschrieben durchgeführt. Die Konzentration der Substrate betrug 100 mM. Die Aktivität wurde relativ zur Anfangsaktivität berechnet, die als 100 % festgesetzt wurde. Die für die Messungen einsetzten, gereinigten Enzyme zeigten folgende spezifischen Aktivitäten:
pAK2.1: 119,5 U/mg für Glycerin und 37,9 U/mg für 1,2-Propandiol
pAK5.1: 32,8 U/mg für Glycerin und 34,1 U/mg für 1,2-Propandiol
pAK7.1: 111,0 U/mg für Glycerin und 24,3 U/mg für 1,2-Propandiol
pCS120: 97,5 U/mg für Glycerin und 28,1 U/mg für 1,2-Propandiol.

Betrachtet man den Katalyseverlauf bei einer Glycerinkonzentration von nur 1 mM ergibt sich ein deutlich verändertes Bild (Daten nicht gezeigt). Unter diesen

Bedingungen, die im Bezug auf die Substratkonzentration den physiologischen Gegebenheiten in einer Zelle recht nahe kommt, zeigen alle untersuchten Enzyme eine sehr viel höhere Stabilität. Nach 5-minütiger Katalyse war bei alle Dehydratasen außer der aus *E. coli* BL21/pAK7.1 noch kein Aktivitätsverlust zu beobachten. Am stabilsten war die Diol-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK5.1. Diese zeigte sogar nach 10 Minuten Inkubation noch 90 % ihrer Ausgangsaktivität. Die Tatsache, dass die Glycerin-Dehydratasen in diesem Zeitraum schneller an Aktivität verloren (Restaktivität nach 10 min Inkubation zwischen 9 und 42 %), war möglicherweise nicht nur auf die fortschreitende Inaktivierung des Enzyms durch den Katalysemechanismus zurückzuführen, sondern auch auf die schnellere Umsatzrate dieser Enzyme. Nach 5 Minuten Reaktionszeit waren hier schon zwischen 100 und 300 µM des Substrats Glycerin verbraucht, was wahrscheinlich eine deutliche Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge hatte. Ein direkter Vergleich der Reaktionsverläufe ist jedoch kritisch, da nicht die exakt gleichen Enzymmengen eingesetzt wurden. Des Weiteren müßten die Versuche bei konstanter Glycerinkonzentration wiederholt werden.

3.3.3.7 Reaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen durch den Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii*

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die neu isolierten Glycerin- und Diol-Dehydratasen einer „Suicide“-Inaktivierung durch das natürliche Substrat Glycerin unterliegen. Dies wurde zuvor ebenfalls für alle bisher bekannten B_{12}-abhängigen Dehydratasen beschrieben. Frühere Untersuchung haben gezeigt, dass diese Inaktivierung mit dem radikalischen Katalysemechanismus der Enzyme in Zusammenhang steht. (TORAYA et al. , 1976; BACHOVCHIN et al., 1977 und 1978; POZNANZKAYA et al., 1977). Für die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* und die Glycerin-Dehydratasen aus *K. pneumoniae*, *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* konnten in den vergangenen Jahren Protein-Komplexe identifiziert werden, die die Glycerin-inaktivierten Enzyme reaktivieren konnten (TORAYA und MORI, 1999; SEIFERT, 2001; SEIFERT et al., 2001). In *Klebsiella* besteht der Komplex aus den Proteinen DdrA und DdrB. Die entsprechenden Gene liegen stromabwärts der Dehydratase-Gene und werden mit ihnen kotranskribiert. In *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* konnten

ebenfalls zwei Proteine identifiziert werden, die mit DhaF und DhaG bezeichnet wurden. Im dha-Regulon von *C. feundii* befindet sich *dhaF* stromabwärts von *dhaE*, der γ-Untereinheit der Dehydratase. Dagegen liegt *dhaG* stromabwärts von *dhaT*, dem für die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase kodierenden Gen. SEIFERT et al. 2001 konnten zeigen, dass der DhaFG-Komplex in Anwesenheit von Mg^{2+} und ATP eine Inaktivierung der Dehydratase aus dem eigenen Organismus verhinderte und außerdem in der Lage war, das Glycerin-inaktivierte Enzym zu reaktivieren. Untersuchungen der Spezifität Reaktivierungsfaktors zeigten, dass er ebenfalls in der Lage war, die Glycerin-Dehydratase aus *K. pneumoniae* zu reaktivieren. Eine Reaktivierung der Diol-Dehydratasen von *K. oxytoca* und *S. typhimurium* konnte bei Untersuchungen in Rohextrakten nicht beobachtet werden.

Im Weiteren wurde überprüft, inwieweit der gereinigte Reaktivierungsfaktor DhaFG aus *C. freundii* in der Lage war, die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Dehydratasen nach Inaktivierung durch Glycerin zu reaktivieren. Zu diesem Zweck wurde DhaFG aus *C. freundii* nach der Methode von SEIFERT et al. (2001) heterolog produziert und gereinigt. Für die heterologe Expression des Reaktivierungsfaktors wurde das rekombinante Plasmid pCS111 (SEIFERT et al., 2001) herangezogen, welches beide Gene kolinear zum tac-Promotor des Expressionsvektors pKK223-3 trug (s. Abb. 26). Beide Gene besaßen am 3´-Ende eine Sequenz für einen His_6-Tag, der die spätere Reinigung der Proteine durch Affinitätschromatographie an Ni^{2+}-NTA-Agarose ermöglichte.

Abbildung 26: Schematische Darstellung von pCS111
Die grau dargestellten Bereiche bezeichnen den Vektor (pKK223-3). Sowohl *dhaF* als auch *dhaG* besaßen am 3´-Ende eine Sequenz für einen His_6-Tag. p*tac*, *tac*-Promotor, *dhaF* und *dhaG*, Untereinheiten des Reaktivierungsfaktors aus *C. freundii*.

Die heterologe Produktion der beiden Proteine erfolgte nach Transformation des Plasmids in *E. coli* JM109 und Anzucht des resultierenden *E. coli*-Klons in DYT-Medium (s. 2.2.2) bei 30 °C. Induziert wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Genexpression konnte durch Analyse der Rohextrakte durch SDS-PAGE

verfolgt werden. Nach der Induktion traten mit fortschreitender Inkubationsdauer deutlich 2 Banden mit den Molekularmassen von 64 und 14 kDa auf, die den aus den Proteinsequenzen abgeleiteten Molekularmassen für DhaF und DhaG entsprachen (Daten nicht gezeigt). Unter nativen Bedingungen bildeten die koexprimierten Proteine einen dimeren Komplex aus $\alpha_2\beta_2$ mit einer Molekularmasse von ca. 150 kDa (SEIFERT et al., 2001).

Die Reinigung des DhaFG-Komplexes erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Ni^{2+}-NTA-Agarose. Die aus den Expressionsversuchen erhaltenen Zellen wurden in KP-Puffer (100 mM, pH 7,0) aufgenommen und mit der French-Presse aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation wurde der erhaltene Rohextrakt auf eine mit dem Zellaufschlußpuffer äquilibrierte Ni^{2+}-NTA-Agarose-Säule aufgetragen und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die nachfolgenden Wasch- und Elutionsschritte wurden entsprechend der Reinigung der Dehydratasen durchgeführt. Auf diese Weise konnte der Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii* in ausreichender Menge für die nachfolgenden Experimente produziert und gereinigt werden.

Zur Untersuchung der Reaktivierung wurden die gereinigten Dehydratasen aus *E. coli* BL21/pAK2.1, *E. coli* BL21/pAK7.1 und *E. coli* BL21/pAK5.1 wie bei SEIFERT et al. beschrieben, durch eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C in Gegenwart von 30 % Glycerin und 50 µM Coenzym B_{12} inaktiviert. Durch eine Gelfiltration an einer PD10-Säule (s. 2.17.2) wurde anschließend ungebundenes Coenzym B_{12} und Glycerin abgetrennt. Die Enzyme wiesen danach nahezu keine meßbare Aktivität mehr auf und wurden für die folgenden Reaktivierungsversuche eingesetzt. Zur Bestimmung der Reaktivierungsraten wurde in den nachfolgenden Versuchen 1,2-Propandiol als Substrat eingesetzt, da die Enzyme während der Umsetzung dieser Substanz keiner signifikanten Inaktivierung unterliegen (s. Abb. 27) und somit keine antagonistischen Effekte zu erwarten waren. Die Ansätze enthielten zwischen 0,8 und 1,6 µg inaktiviertes Enzym und ca. 10 µg des Reaktivierungsfaktors. Zusätzlich wurde ATP/$MgCl_2$ und Coenzym B_{12} zugefügt, da Untersuchungen von TORAYA und MORI (1999) zum Reaktivierungsfaktor DdrAB der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* und von SEIFERT et al. (2001) im Bezug auf DhaFG gezeigt hatten, dass die Aktivität der Proteinkomplexe von der Anwesenheit dieser Komponenten abhängig war. Die Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert, und nach 10, 20 und 30 min wurden Proben entnommen und die gebildete Aldehydmenge wurde bestimmt. Durch Zugabe des Proteinkomplexes DhaFG konnten

sowohl die Glycerin-Dehydratasen aus *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 als auch die Diol-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK5.1 reaktiviert werden (s. Abb. 27). Die Rate der Produktbildung lag nach Zugabe der Reaktivierungsfaktors bei 1,5 bis 4,5 nmol/min bei den verschiedenen Ansätzen.

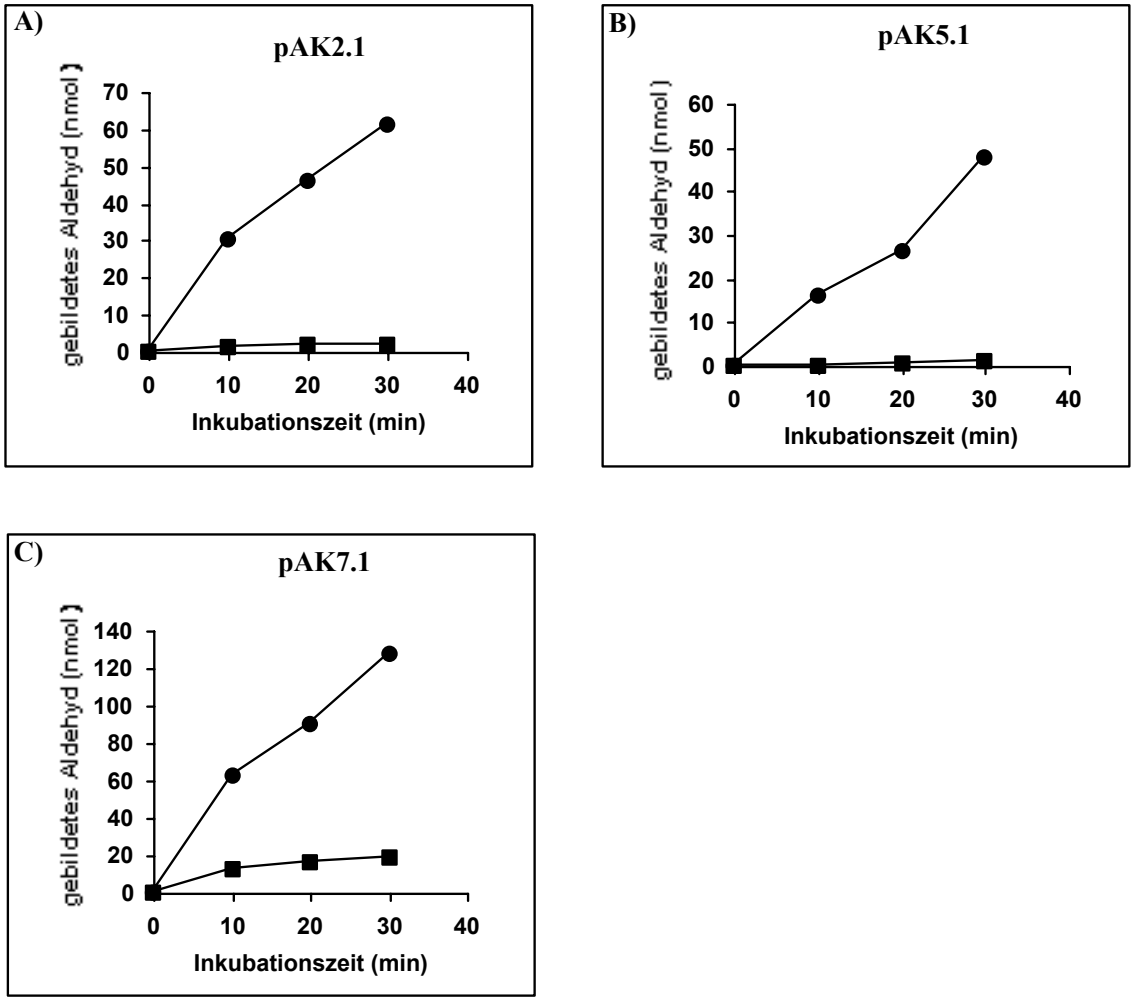


Abbildung 27: Reaktivierung der Glycerin-inaktivierten Dehydratasen aus *E. coli* BL21/pAK2.1 (A), *E. coli* BL21/pAK5.1 (B) und *E. coli* BL21/pAK7.1 (C) durch den Reaktivierungsfaktor DhaFG aus *C. freundii*

Die Dehydratasen wurden wie unter 2.18 beschrieben inaktiviert. Die Reaktivierungsexperimente wurden in HEPES-Puffer mit 100 mM 1,2-Propandiol, 21 µM Coenzym B_{12} sowie $MgCl_2$/ATP in einem Volumen von 200 µl durchgeführt. Die eingesetzten Proteinmengen lagen bei 1,2 µg für pAK2.1, 0,8 µg für pAK5.1 und 1,6 µg für pAK7.1. Die inaktivierten Dehydratasen wurden mit ca. 10 µg des DhaFG-Komplexes inkubiert, und die Bestimmung der gebildeten Aldehydmenge erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten in Gegenwart des Reaktivierungsfaktors (●). Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Zugabe des Reaktivierungsfaktors (■)

Zur Ermittlung der Reaktivierungsraten wurden die erreichten spezifischen Aktivitäten vor der Inaktivierung und nach der Zugabe von DhaFG bestimmt. Die Hybrid-Diol-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK5.1 wurde auf die beschriebene Weise zu 62 %, die Glycerin-Dehydratasen aus *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 zu 81 bzw. 85 % reaktiviert (s. Tab. 17). Die Ergebnisse für die Glycerin-Dehydratasen stimmen gut mit den Werten überein, die für die Reaktivierung des Enzyms aus *C. freundii* bestimmt wurden (SEIFERT et al., 2001). Neu dagegen ist die Reaktivierung der Diol-Dehydratasen mit einem Reaktivierungsfaktor einer Glycerin-Dehydratase.

Tabelle 17: Reaktivierungsraten der Glycerin-inaktivierten Dehydratasen aus *E. coli* BL21/pAK2.1, *E. coli* BL21/pAK5.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 mit dem Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii*

Dehydratase aus:	Reaktivierungsrate mit DhaFG
E. coli BL21/pAK2.1	81 %
E. coli BL21/pAK5.1	62 %
E. coli BL21/pAK7.1	85 %

3.3.3.8 Inaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen durch 1,3-Propandiol

Bei der biotechnologischen Produktion von 1,3-Propandiol mit Hilfe eines rekombinanten *E. coli*-Produktionsstammes werden 1,3-Propandiol-Konzentrationen im Bereich von 2 M erreicht (CHOTANI et al., 2000). Der Einfluß des Endprodukts der Glycerin-Fermentation auf die Aktivität der Dehydratasen ist in der Literatur bisher nur unzureichend analysiert worden. POZNANSKAYA et al. (1979) konnten eine kompetitive Hemmung der Dehydratase-Aktivität mit Glycerin und 1,2-Propandiol als Substrate durch 1,3-Propandiol feststellen.

Zur Untersuchung der Wirkung von 1,3-Propandiol auf die Aktivität der Glycerin- und Diol-Dehydratasen wurden die gereinigten Enzyme aus *C. freundii*, *E. coli* BL21/pAK2.1, *E. coli* BL21/pAK5.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 eingesetzt. Es erfolgte eine Inkubation für die Dauer von 10 min mit 1,2-Propandiol in Gegenwart

unterschiedlicher 1,3-Propandiol-Konzentrationen im Bereich von 250 mM bis 2 M (s. Abb. 28).

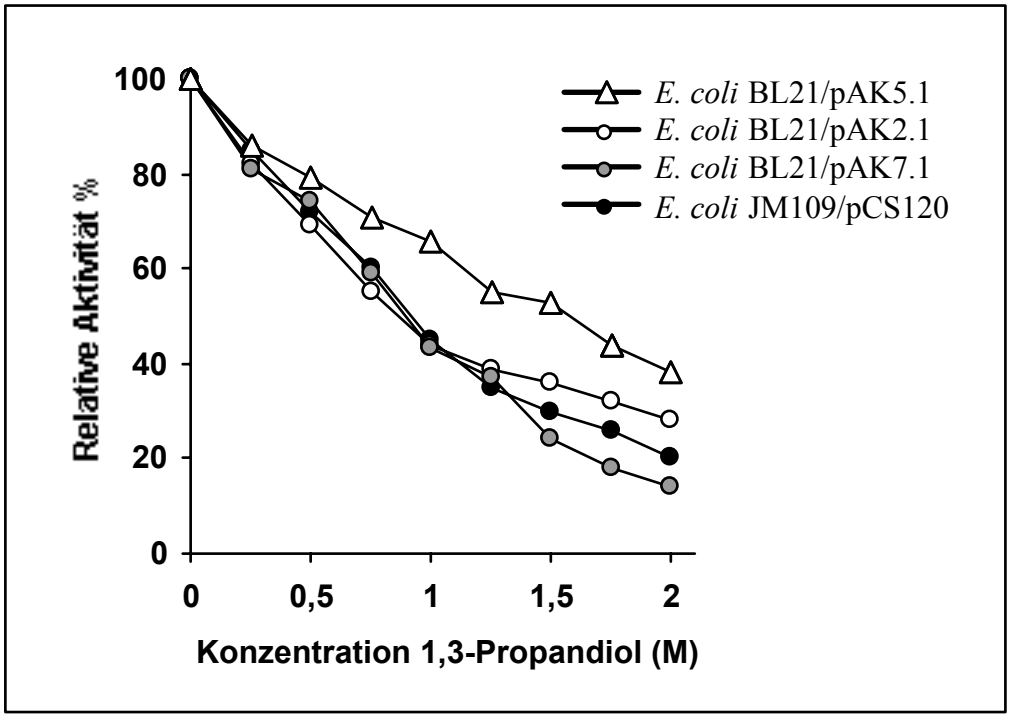


Abbildung 28: Inaktivierung der Glycerin- und Diol-Dehydratasen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentration von 1,3-Propandiol
Die Inaktivierungsversuche wurden in HEPES-Puffer (80 mM, KOH; pH 8,2) mit Coenzym B_{12} und 1,2-Propandiol (100 mM) als Substrat durchgeführt. 1,3-Propandiol wurde in Konzentrationen von 250 mM bis 2 M eingesetzt. Die gereinigten Enzyme wiesen folgende Volumenaktivitäten auf: pAK2.1: 14,0 U/ml, pAK5.1: 28,3 U/ml, pAK7.1: 26.1 U/ml, pCS120: 28,1 U/ml.

Bereits bei einer 1,3-Propandiol-Konzentration von 250 mM im Testansatz kam es bei allen untersuchten Dehydratasen zu einer Hemmung von 11 bis 18 %. Wurde 1,3-Propandiol in einer Konzentration von 1 M zugesetzt, sank die Aktivität bei den Glycerin-Dehydratasen schon unter 50 %, bei 2 M war lediglich eine Restaktivität zwischen 14 und 28 % detektierbar. Deutlich resistenter gegenüber der Inaktivierung zeigte sich die Hybrid-Diol-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK5.1, die bei 1 M 1,3-Propandiol noch 70 % der Ausgangsaktivität zeigte. Die Unterschiede zwischen den Glycerin- und Diol-Dehydratasen machte auch die Bestimmung der K_i-Werte für 1,3-Propandiol deutlich (s. Tab. 18). Für die in *E. coli* BL21/pAK5.1 heterolog produzierte Dehydratase wurde ein Wert von 1,36 M bestimmt, die Werte der Glycerin-Dehydratasen lagen bei 0,93 M (*C. freundii* und pAK7.1) bzw. 0,85 M (pAK2.1).

Vergleichbare Werte wurden bei der Verwendung von Glycerin als Substrat erhalten (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 18: **K_i-Werte der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii*, *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 sowie der Diol-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK5.1 bei Inkubation mit 1,3-Propandiol**
Reaktionsbedingungen siehe Legende Abb. 28.

Dehydratase aus:	**K_i-Wert**
C. freundii	0,93 M
E. coli BL21/pAK2.1	0,85 M
E. coli BL21/pAK5.1	1,36 M
E. coli BL21/pAK7.1	0,93 M

Die durchgeführten biochemischen Untersuchungen der aus den Metagenombanken identifizierten Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen haben deren enge Verwandtschaft mit den bisher bekannten Enzymen dieser Klasse bestätigt. Im Bezug auf einen industriellen Einsatz der Enzyme in einem rekombinanten Produktionsstamm zeigte die von *E. coli* BL21/pAK5.1 produzierte Hybrid-Diol-Dehydratase die besten Eigenschaften. Besonders gegenüber einer Inaktivierung durch Glycerin bzw. durch 1,3-Propandiol zeigte sie sich deutlich resistenter als die untersuchten Glycerin-Dehydratasen.

3.4 Durchmusterung der Metagenombanken auf Gene für Polyol-verwertende Oxidoreduktasen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Genen aus Metagenombanken, die eine Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität in *E. coli* vermitteln und die Erstellung einer Genbank für diese Art von Biokatalysatoren. Alkohol-Oxidoreduktasen katalysieren Redoxreaktionen und sind an der Umwandlung von Alkoholen, Aldehyden und Ketonen in einer Vielzahl von essentiellen mikrobiellen Reaktionen beteiligt. Die bisher bekannten Alkohol-Oxidoreduktasen stellen im

Vergleich zu den Glycerin- und Diol-Dehydratasen eine sehr heterogene Gruppe mit unterschiedlichen Kofaktor-Bedürfnissen dar. REID und FEWSON (1994) haben folgende Einteilung in 3 Gruppen etabliert: Man unterscheidet die $NAD(P)^+$-abhängigen Dehydrogenasen (Typ I, Typ II und Typ III), die $NAP(P)^+$-unabhängigen Dehydrogenasen (mit Kofaktoren wie FAD, PQQ oder F_{420}) und die Oxidasen.
Wie auch die Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen sind auch diese Enzyme und dabei besonders die Gruppe der $NAP(P)^+$-abhängigen Dehydrogenasen in der Biotechnologie von großem Interesse. Sie besitzen zumeist eine hohe Enantioselektivität und sind somit hervorragend für die Synthese von chiralen Alkoholen, Hydroxysäuren und Aminosäuren geeignet (HUMMEL, 1997 und 1999).
Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Identifizierung von Genen für Alkohol-Oxidoreduktasen, welche in der Lage sind kurzkettige (C2 bis C4) Polyole mit benachbarten Hydroxylgruppen zu den entsprechenden Carbonylverbindungen umzusetzen. Zu diesem Zweck wurden wiederum die Anreicherungs-Metagenombanken SLA, GEA, ZRA und GIIA (s. 3.1) durchmustert. Zusätzlich konnten noch die Genbanken FN, WN und ZB genutzt werden, die zuvor in unserer Arbeitsgruppe erstellt worden waren (HENNE, 2000). Für diese Genbanken war die chromosomale DNA direkt, ohne einen speziellen Anreicherungsschritt, aus den Umweltproben isoliert worden.
Um eine möglichst große Anzahl von rekombinanten Klonen testen zu können, wurde ein auf Enzymaktivität basierendes Testverfahren eingesetzt (s. 3.4.1).

3.4.1 Prinzip der Durchmusterung auf Gene, die Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität vermitteln

Bei der Umsetzung von kurzkettigen Alkoholen durch Oxidoreduktasen entstehen Carbonylverbindungen. Diese Tatsache wurde zur Identifizierung der Zielgene in einem auf Enzymaktivität basierenden Plattentest genutzt.
Der verwendete Indikatoragar (s. 2.2.5) enthielt neben Komplexbestandteilen, die allen Klonen das Wachstum ermöglichen und dem Testsubstrat eine Mischung aus Pararosanilin und Na-bisulfid. Diese beiden Substanzen bildeten zusammen ein Schiff´sches Reagenz, ein primäres Amin, das bei der Reaktion mit Carbonyl-Verbindungen als Kondensationsprodukt eine rot gefärbte Schiff´sche Base

(Azomethin) bildete (CONWAY et al., 1987; s. Abb. 7). Für das Screening wurden die Plasmide der Metagenombanken in *E. coli* transformiert. Kolonien von positiven Klonen waren aufgrund ihrer Rotfärbung und der Ausbildung eines roten Hof leicht zu identifizieren (s. Abb. 29).

Als Testsubstrate wurden 1,2-Ethandiol, 2,3-Butandiol oder ein Gemisch aus 1,2-Propandiol und Glycerin in einer Konzentration von 1 % eingesetzt. Um während der Durchmusterung der Metagenombanken eine starke Hintergrundfärbung der Agars durch die Glycerin-Dehydrogenase-Aktivität von *E. coli* zu verhindern, wurde die Glycerin-negative *E. coli*-Mutante ECL707 (SPRENGER et al., 1989) als Wirtsstamm verwendet. Die Platten mit den *E. coli*-Klonen wurden unter Lichtausschluß bei 30 oder 37 °C inkubiert. Ein Auswertung war maximal bis zu einer Woche nach dem Ausplattieren möglich, da mit fortschreitender Inkubationsdauer zumeist eine Rotfärbung der gesamten Platte auftrat.

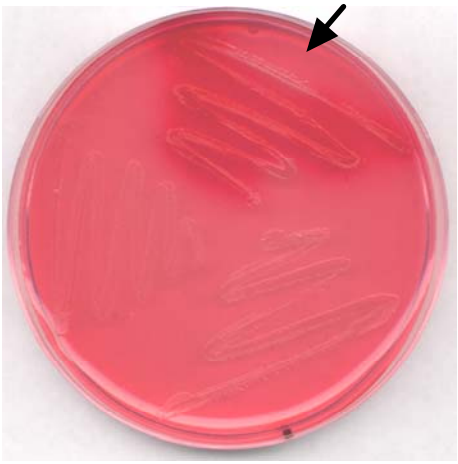


Abbildung 29: Phänotyp von Carbonyl-produzierenden *E. coli*-Klonen auf Indikatorplatten
Der Pfeil markiert einen Carbonyl-produzierenden *E. coli*-Klon.

Zur Überprüfung des Screeningsystems wurden zunächst die rekombinanten Cosmide pRD1 (DANIEL und GOTTSCHALK, 1992) und pFL1 (LUERS et al., 1997) in *E. coli* ECL707 transformiert und die erhaltenen Transformanten auf dem Indikatormedium inkubiert. Die beiden Cosmide tragen die Gene für die NAD^+-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen von *C. freundii* und *Cl. pasteurianum* von denen bekannt ist, dass sie die eingesetzten Testsubstrate oxidieren können (DANIEL und GOTTSCHALK, 1992;

LUERS et al., 1997). Kolonien der beiden rekombinanten Stämme zeigten im Gegensatz zu *E. coli* ECL707 die erwartete intensive Rotfärbung und die Ausbildung eines roten Hofes auf dem Indikatormedium. Somit war das Testsystem für die Detektion von Carbonyl-produzierenden *E. coli*-Klonen geeignet.

3.4.2 Durchmusterung der Anreicherungsgenbanken SLA, GEA, ZRA und GIIA

Für die Konstruktion der Genbanken SLA, GEA, ZRA und GIIA waren Boden- und Sedimentproben aus dem Solar Lake, dem Golf von Eilat, einem Zuckerrübenfeld und dem Fluss Grone verwendet worden (s. 3.1). Nach einer kurzen Anreicherungsphase mit den Substraten Glycerin und 1,2-Propandiol wurde die chromosomale DNA direkt aus dem jeweiligen Standortmaterial isoliert. Die erhaltenen Genbanken waren somit ebenfalls gut geeignet für eine Suche nach Genen für Alkohol-Oxidoreduktasen, die in der Lage waren diese und ähnliche C-Quellen zu oxidieren.

Um Gene für neuartige Alkohol-Oxidoreduktasen in den beschriebenen Metagenombanken zu identifizieren, wurden die rekombinanten Plasmide mittels Elektroporation in *E. coli* ECL707 transformiert und auf Indikatoragar-Platten (s. 2.2.5) mit 1,2-Ethandiol, 2,3-Butandiol oder einem Gemisch aus Glycerin und 1,2-Propandiol als Testsubstrate ausplattiert. Je Genbank und Substrat wurden ca. 100.000 rekombinante *E. coli*-Klone auf die Bildung von Carbonyl-Verbindungen überprüft. Im Rahmen des initialen Screening konnten 24 positive, rot gefärbte Klone erhalten werden (s. Tab. 19). Zur Bestätigung des Phänotyps und zum Nachweis, dass die Fähigkeit zur Produktion der Carbonyl-Verbindung plasmidkodiert war, wurden die enthaltenen Plasmide isoliert und in *E. coli* ECL707 retransformiert. Es folgte eine erneute Inkubation auf dem entsprechenden Indikatormedium. 16 der 24 rekombinanten Plasmide vermittelten einen stabilen Phänotyp in *E. coli* und wurden mit pAK101 bis pAK116 bezeichnet. Damit konnte 1 positiver Klon je 75000 getesteter Klone detektiert werden. Die größte Anzahl positiver Klone (zehn) wurde mit dem Substratgemisch

Glycerin/1,2-Propandiol erhalten. Mit 1,2-Ethandiol konnten zwei und mit 2,3-Butandiol vier , zur Carbonylbildung befähigte Klone identifiziert werden.

Tabelle 19: Durchmusterung der Metagenombanken SLA, GEA, ZRA und GIIA auf Gene für Alkohol-Oxidoreduktasen
Das Screening wurde durch Transformation mittels Elektroporation von je 1 µl Plasmidgenbank in den Stamm *E. coli* ECL707 durchgeführt. Je Genbank und Substrat wurden 100000 Klone getestet. Die Transformanten wurden bei 30 oder 37 °C unter aeroben Bedingungen auf Indikatormedium (s. 2.2.5) mit 1 % 1,2-Ethandiol, 2,3-Butandiol oder einem Glycerin/1,2-Propandiol-Gemisch als Substrat inkubiert.

Testsubstrat	Genbank	Positive *E. coli*-Klone nach initialem Screening	Positive *E. coli*-Klone mit stabilem Phänotyp	Bezeichnung der Aktivität-vermittelnden Plasmide
Glycerin/1,2-Propandiol	SLA	1	0	-
	GEA	1	1	pAK108
	ZRA	6	6	pAK111-116
	GIIA	5	3	pAK101-103
1,2-Ethandiol	SLA	0	0	-
	GEA	0	0	-
	ZRA	0	0	-
	GIIA	3	2	pAK106-107
2,3-Butandiol	SLA	4	2	pAK109-110
	GEA	0	0	-
	ZRA	1	0	-
	GIIA	3	2	pAK104-105

3.4.2.1 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten *E. coli*-Stämme pAK101 bis 116

Für die biochemische Charakterisierung der Genprodukte, die für die Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität der identifizierten *E. coli*-Klone verantwortlich waren, wurden die Plasmide pAK101-116 in *E. coli* DH5α transformiert, in 250 ml LB-Medium (s. 2.2.1) mit dem jeweiligen Testsubstrat angezogen. Anschließend wurden

aus den geernteten Zellen Rohextrakte hergestellt (s. 2.14). Zunächst wurden die Rohextrakte auf das Vorhandensein von Nikotinamid-abhängiger Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität getestet. Der Rohextrakt von *E. coli* DH5α/pBluescript SK^+ wurde als Referenz herangezogen. In den Rohextrakten der 8 *E. coli*-Stämme DH5α/pAK103-104, *E. coli* DH5α/108-110, *E. coli* DH5α/112-113 und *E. coli* DH5α/116 konnte eine NAD^+-abhängige Oxidation einiger Testsubstrate nachgewiesen werden (s. Tab. 20). Eine $NADP^+$-vermittelte Substratumsetzung konnte in keinem der Extrakte nachgewiesen werden. In den Rohextrakten der 8 übrigen Klone konnte weder eine NAD^+- noch eine $NADP^+$-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität ermittelt werden. Die Carbonylbildung in diesen Klonen könnte daher auf die Aktivität von Enzymen anderer oder unbekannter Klassen zurückzuführen sein. Hier kommen z.B. Dehydratasen, Metalloxidasen, PQQ- oder FAD-abhängige Dehydrogenasen in Frage (FANG et al., 1995; HUMMEL, 1997; DANIEL et al., 1998).

Für die oben erwähnten NAD^+-abhängigen Enzyme wurde ein Substratspektrum mit verschiedenen, kurzkettigen Alkoholen erstellt (s. Tab. 20). Mit Ausnahme von *E. coli*/pAK116, der unter den gewählten Reaktionsbedingungen lediglich 1,2 Propandiol oxidierte, waren alle in der Lage mehr als eines der angebotenen Substrate zu oxidieren oder zu reduzieren. Die Enzyme zeigten zumeist die höchste Aktivität mit Substraten, in denen die Hydoxylgruppen an benachbarten C-Atomen vorlagen. Die bevorzugten Substrate waren Glycerin (pAK103), 1,2-Propandiol (pAK104, pAK108-110 und pAK112-113) und 1,2-Ethandiol (pAK116). Mit primären oder sekundären Alkoholen, die nur einzelne Hydroxylgruppen besaßen, konnte keine Reaktion beobachtet werden. Die Reduktionsreaktion war vergleichsweise spezifischer. Die untersuchten Enzyme zeigten die höchsten Aktivitäten mit Dihydroxyaceton (pAK104, pAK110, pAK112-113) oder Glykolaldehyd (pAK103, pAK109). Dagegen konnte mit den Substanzen Glyceraldehyd, Diacetyl, Acetaldehyd und Aceton keine signifikante Reduktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In den Extrakten von *E. coli* DH5α/pAK108 und *E. coli* DH5α/pAK116 konnte trotz vorhandener Oxidations-Aktivität keines der eingesetzten Aldehyde oder Ketone unter den gegebenen Testbedingungen reduziert werden.

Tabelle 20: **Spezifität der NAD(H)-abhängigen Dehydrogenase-Aktivtät in Rohextrakten von *E. coli* DH5α/pAK103 bis 104, *E. coli* DH5α/pAK108 - 110, *E. coli* DH5α/pAK112 - 113 und *E. coli* DH5α/pAK116**
Die Zellanzucht erfolgt in LB-Medium (s. 2.2.1) mit jeweils 1 % des beim Screening eingesetzten Substrats in einem Kulturvolumen von 250 ml. Die Herstellung der Rohextrakte und die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte wie unter 2.14 und 2.16.2 beschrieben. Die jeweils höchste gemessene Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt.

Reaktion und Substrat	Relative spezifische Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität (%)							
	pAK103	pAK104	pAK108	pAK109	pAK110	pAK112	pAK113	pAK116
Oxidation								
1,2-Ethandiol	-	-	-	-	-	5	-	100
1,2-Propandiol	81	100	100	100	100	100	100	-
2,3-Butandiol	-	22	50	31	44	32	43	-
Glycerin	100	35	91	36	40	44	68	-
1,2,4-Butantriol	46	14	27	26	27	16	36	-
Reduktion								-
Dihydroxyaceton	76	100	-	78	100	100	100	-
Hydroxyaceton	9	39	-	41	70	-	-	-
Glycolaldehyd	100	19	-	100	93	-	53	-
Methylglyoxal	33	-	-	-	-	-	-	-

[a], [b] Die spezifischen Aktivitäten in den Oxidations- und Reduktionsreaktionen wurden relativ zu den jeweils höchsten angegeben. Oxidation: pAK103, 0,024 U/mg; pAK104, 0,033 U/mg; pAK108, 0,022 U/mg; pAK109, 0,039 U/mg; pAK110, 0,048 U/mg; pAK112, 0,057 U/mg; pAK113, 0,028 U/mg; pAK116, 0,040 U/mg. Reduktion: pAK103, 0,054 U/mg; pAK104, 0,080 U/mg; pAK109, 0,044 U/mg; pAK110, 0,137 U/mg; pAK112, 0,032 U/mg; pAK113, 0,068 U/mg.

3.4.2.2 Molekulare Analyse der Plasmide pAK101 bis pAK116

Die Plasmide pAK101 bis 116 wurden durch das „Göttingen Genomics Laboratory“ (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) nach der Methode von SANGER (1977) in beiden Orientierungen sequenziert. Die Sequenzierung ergab Insertgrößen im Bereich 651 Bp für pAK108 bis zu 8249 Bp für pAK106 (s. Abb. 30 und Tab. 21). Die GC-Gehalte der klonierten DNA-Fragmente lagen zwischen 39 % (pAK101) und 70 % (pAK106) (s. Tab. 21). Die eingehende Analyse der vorhandenen offenen Leserahmen mit Hilfe des Programms DNA Strider 1.2 und der Vergleich mit den in den Datenbanken der NCBI zur Verfügung stehenden Sequenzen zeigte, dass auf den Inserts insgesamt 38 komplette und 16 unvollständige potentielle Gene kodiert waren (s. Tab. 22 und Abb. 30). 51 davon wiesen Ähnlichkeiten zu bekannten Genen aus Organismen auf, die zu einer Vielzahl von bakteriellen Gattungen gehörten wie z.B. *Salmonella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Thermoanaerobacter* und *Mesorhizhobium*. Die Mehrzahl der potentiellen Gene besaß Ähnlichkeiten zu Genen enterobakterieller Herkunft.

Die inserierten DNA-Fragmente aus pAK101 (1201 Bp), pAK105 (1266 Bp) und pAK108 (651 Bp) enthielten je nur einen möglichen offenen Leserahmen mit den Größen von 969, 1137 und 534 Basenpaaren. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des mit *orf1* bezeichneten Gens auf pAK101 zeigte weder eine signifikante Ähnlichkeit zu den bekannten Alkohol-Dehydrogenasen noch zu irgend einem anderen Genprodukt in den Datenbanken der NCBI. Die aus *orf5* (pAK105) und *orf12* (pAK108) abgeleiteten Proteine dagegen wiesen Übereinstimmungen zu verschiedenen Oxidoreduktasen anderer Organismen auf. Das *orf5*-Genprodukt zeigte 62 % Identität zu einer möglichen Monooxygenase/Oxidoreduktase aus *Sinorhizobium meliloti* auf, das Genprodukt von *orf12* war zu 31 % identisch mit einer NAD^+-abhängigen, Zink-haltigen Alkohol-Dehydrogenase (Typ I) aus *Mesorhzobium loti* (s. Tab. 22). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den gemessenen Enzymaktivitäten in den Rohextrakten der korrespondierenden *E. coli*-Klone überein, die in beiden Fällen eine signifikante Oxidation mit den getesteten Polyolen gezeigt hatten (s. Tab. 20).

Tabelle 21: Insertgrößen und GC-Gehalte der Plasmide pAK101 bis 116

Plasmid	Insertgröße	GC-Gehalt
pAK101	1201 Bp	39 %
pAK102	4349 Bp	54 %
pAK103	2376 Bp	51 %
pAK104	3290 Bp	51 %
pAK105	1266 Bp	58 %
pAK106	8249 Bp	70 %
pAK107	1109 Bp	63 %
pAK108	651 Bp	52 %
pAK109	1369 Bp	55 %
pAK110	4522 Bp	47 %
pAK111	3593 Bp	49 %
pAK112	3423 Bp	48 %
pAK113	1979 Bp	56 %
pAK114	2255 Bp	52 %
pAK115	5131 Bp	54 %
pAK116	1982 Bp	51 %

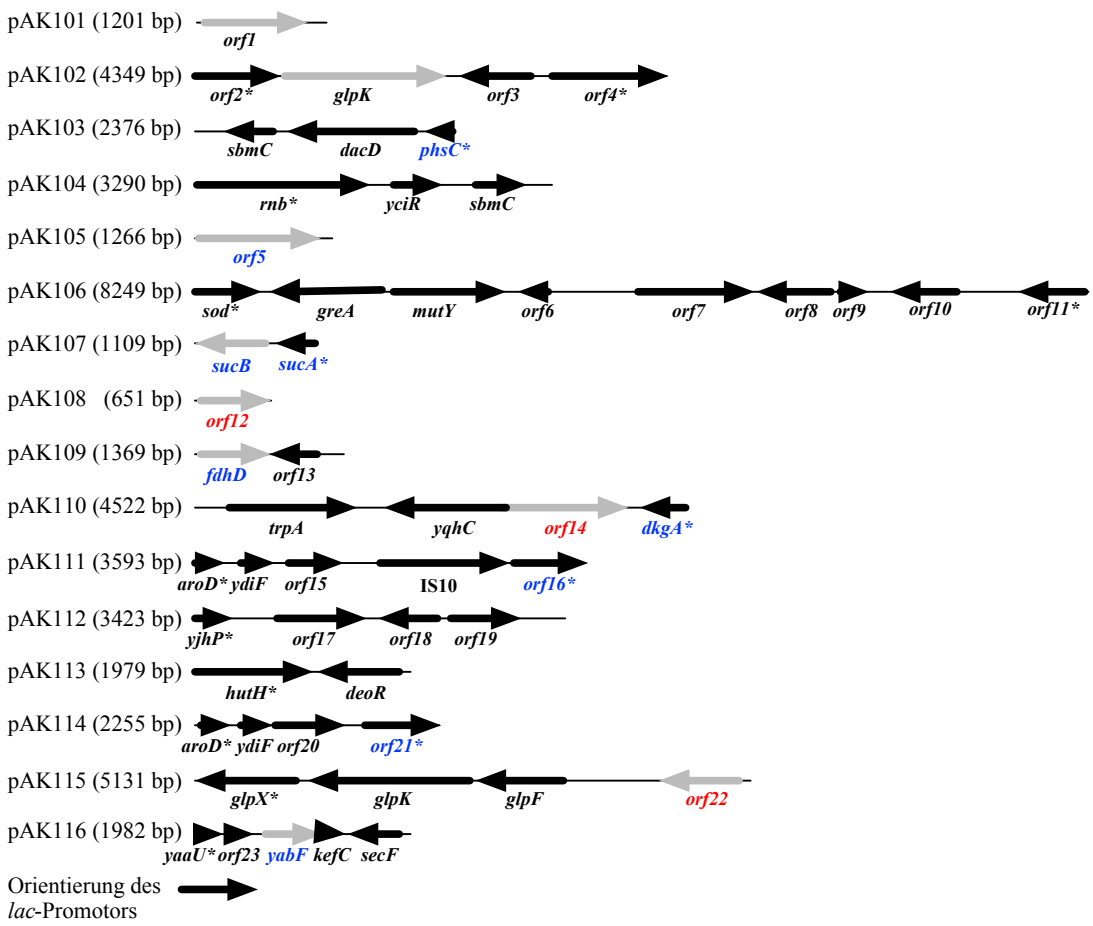


Abbildung 30: Genetische Organisation der Plasmide pAK101 bis pAK116
Die Pfeile markieren Länge und Orientierung von möglichen offenen Leserahmen. Die Sternchen zeigen unvollständige Gene an. Bezeichnungen von offenen Leserahmen, deren abgeleitetes Genprodukt Ähnlichkeiten zu Alkohol-Dehydrogenasen bzw. Oxidoreduktasen aus anderen Organismen aufweist, sind in Rot bzw. Blau dargestellt. Gene, die als verantwortlich für den Carbonyl-bildenden Phänotyp der *E. coli*-Klone identifiziert wurden, sind grau markiert.

Tabelle 22: **Identifizierte Gene auf den Plasmiden pAK101 bis pAK116, Accession-Nummern und Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen**

Die Identifizierung der verwandten Proteine zu den vorhergesagten Genprodukten sowie die Determinierung der Sequenzähnlichkeiten (in %) und des Score geschah mit Hilfe der BLAST-Programme der NCBI. Unvollständige Gene sind durch Sterne gekennzeichnet. Die Namen der Gene, die als verantwortlich für die Carbonylbildung identifiziert wurden, sind fettgedruckt.

Plasmid	Identifiziertes Gen	Verwandtes Protein	Organismus (Accession des verwandten Proteins)	Identität (%)	Region mit ähnlichen Aminosäuren	Score
pAK101	orf 1 (AF543467)	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK102	*orf2** (AF543469)	Hypothetisches Protein	*Yersinia pestis* (NP_406777)	77	268	424
pAK102	***glpK*** (AF543469)	Glycerin-Kinase	*Y. pestis* (NP-406778)	46	498	427
pAK102	*orf3* (AF543469)	Mögliche Acetyltransferase	*Y. pestis* (NP_405514)	44	222	201
pAK102	*orf4* (AF543469)	Konserviertes hypothetisches Protein	*Salmonella enterica* (NP_455160)	83	356	626
pAK103	*sbmC* (AF543472)	SbmC Protein, unbekannte Funktion	*E. coli* (NP_288514)	74	155	254
pAK103	*dacD* (AF543472)	Carboxypeptidase	*S. typhimurium* (NP_461007)	90	390	723
pAK103	*phsC** (AF543472)	Thiosulfat-Reduktase, Cyt.b-Untereinheit	*S. enterica* (NP_456611)	85	71	128
pAK104	*rnb** (AF543475)	RNase II	*S. typhimurium* (NP_460661)	88	536	957
pAK104	*yciR* (AF543475)	Hypothetisches Protein	*E. coli* (NP_415802)	66	106	152
pAK104	*sbmC* (AF543475)	SbmC Protein, unbekannte Funktion	*E. coli* (NP_288514)	74	155	254

Fortsetzung Tabelle 22

Plasmid	Identifiziertes Gen	Verwandtes Protein	Organismus (Accession des verwandten Proteins)	Identität (%)	Region mit ähnlichen Aminosäuren	Score
pAK105	*orf5* (AF543478)	Potentielle Monooxygenase/Oxidoreduktase	*Sinorhizobium meliloti* (T46818)	62	380	499
pAK106	*sodA** (AF543480)	Superoxid-Dismutase	*Thermotoga tengcongensis* (NP-622509)	34	184	91
pAK106	*greA* (AF543480)	Transkriptons-Elongationsfaktor	*Caulobacter crescentus* (NP_421644)	31	151	65
pAK106	*mutY* (AF543480)	Hypothetische Adenin-Glykosylase	*Ralstonia solancearum* (NP_518522)	45	365	286
pAK106	*orf6* (AF543480)	Hypothetisches Protein	*Pseudomonas aeruginosa* (NP_254046)	51	111	112
pAK106	*orf7* (AF543480)	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK106	*orf8* (AF543480)	Mögliche Aminopeptidase	*Agrobacterium tumefaciens*(NP_355456)	39	241	144
pAK106	*orf9* (AF543480)	Potentieller Response-Regulator	*R. solancearum* (NP_518671)	52	91	100
pAK106	*orf10* (AF543480)	Hypothetisches Protein	*Mesorhizobium loti* (NP_104373)	33	106	58
pAK106	*orf11** (AF543480)	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK107	***sucB*** (AF543482)	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, E2 Untereinheit	*Vibrio cholerae* (NP_231718)	60	225	251
pAK107	*sucA** (AF543482)	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, E1 Untereinheit	*V. cholerae* (NP_231719)	74	123	198
pAK108	***orf12*** (AF543483)	Mögliche Zink-abhängige Alkohol-Dehydrogenase	*M. loti* (NP_104464)	31	217	118
pAK109	***fdhD*** (AF543481)	Mögliches FdhD-Protein	*S. enterica* (NP_458012)	88	218	402

Fortsetzung Tabelle 22

Plasmid	Identifiziertes Gen	Verwandtes Protein	Organismus (Accession des verwandten Proteins)	Identität (%)	Region mit ähnlichen Aminosäuren	Score
pAK109	*orf13* (AF543479)	Mögliches Membranprotein	*Y. pestis* (NP_404224)	24	148	57
pAK110	*trrA* (F543479)	Möglicher Transkriptionsregulator	*Bacillus cereus* (CAB69794)	25	415	121
pAK110	*yqhC* (AF543479)	Regulator-Protein, ARAC-Typ	*E. coli* (NP_417483)	89	299	531
pAK110	***orf14*** (AF543479)	Eisen-haltige Alkohol-Dehydrogenas	*S. enterica* (NP_457557)	90	387	704
pAK110	d*kgA** (AF543479)	2,5-Diketo-D-Glukonsäure-Reduktase	*E. coli* (Q56857)	86	140	254
pAK111	*aroD** (AF543477)	3-Dehydroquinat-Dehydratase	*S. enteritidis* (Q9RN77)	88	90	157
pAK111	*ydiF* (AF543477)	Potentielles Membranprotein	*E. coli* (NP_416209)	85	103	182
pAK111	*orf15* (AF543477)	Sensor Histidin-Kinase, PleD homolog	*Synechocystis sp*. (NP_441080)	38	221	150
pAK111	*yedA* (AF543477)	IS10, Transposase	Plasmid R100 (NP_052934)	99	401	818
pAK111	*orf16* (AF543477)	Hypothetisches Protein	*P. aeruginosa* (NP_251460)	46	228	189
pAK112	*yjhP** (AF543476)	Mögliche Methyltransferase	*E. coli* (NP_418726)	93	114	225
pAK112	*orf17* (AF543476)	Hypothetisches Protein	*Y. pestis* (NP_405552)	84	277	498
pAK112	*orf18* (AF543476)	Mögl. transmembranes Efflux-Protein	*Streptomyces coelicolor* (NP_628101)	46	183	160
pAK112	*orf19* (AF543476)	Potentielles integrales Membranprotein	*Clostridium perfringens* (NP_560977)	95	221	403
pAK113	*hutH** (AF543474)	Histidin-Aminolyase	*S. typhimurium* (NP_459769)	83	361	606

Fortsetzung Tabelle 22

Plasmid	Identifiziertes Gen	Verwandtes Protein	Organismus (Accession des verwandten Proteins)	Identität (%)	Region mit ähnlichen Aminosäuren	Score
pAK113	*deoR* (AF543474)	Transkriptionsregulator	*S. typhimurium* (NP_459841)	88	252	454
pAK114	*aroD** (AF543473)	3-Dehydroquinat-Dehydratase	*S. enterica* (Q9RN77)	88	90	157
pAK114	*ydiF* (AF543473)	Potentielles Membranprotein	*E. coli* (NP_416209)	85	103	182
pAK114	*orf20* (AF543473)	Sensor Histidin-Kinase	*Synechocystis sp*. (NP_441080)	38	221	150
pAK114	*orf21** (AF543473)	Mögliche Oxidoreduktase	*Xanthomonas axonopodis (*NP_641091)	41	244	164
pAK115	*glpX** (AF543471)	Glycerin-Metabolismus, Funktion unbekannt	*S. typhimurium* (NP_462966)	94	308	561
pAK115	*glpK* (AF543471)	Glycerin-Kinase	*E. coli* (NP_290555)	92	502	952
pAK115	*glpF* (AF543471)	Glycerin-Facilitator-Protein	*S. enterica* (NP_457965)	86	281	490
pAK115	***orf22*** (AF543471)	Mögliche kurzkettige Alkohol-DH	*A. tumefaciens* (NP_396110)	55	241	243
pAK116	*yaaU** (AF543470)	Mögliches Transportprotein	*E. coli* (NP_414587)	78	66	109
pAK116	*orf23* (AF543470)	Mögliches Lipoprotein	*S. enterica* (NP_454690)	83	77	129
pAK116	***yabF*** (AF543470)	Mögl. NAD(P)H-Oxidoreduktase	*E. coli* (NP_414588)	89	176	355
pAK116	*secF* (AF543470)	Proteinexport-Protein	*E. coli* (AAB40165)	88	171	311

Die klonierten DNA-Regionen der anderen 13 Plasmide umfaßten jeweils mehre potentielle Gene. Zur Identifizierung der für die Carbonylbildung verantwortlichen Proteine in den entsprechenden *E. coli*-Klonen wurden intensive Analysen der Sequenzen vorgenommen und Subklonierungen durchgeführt.

Die Analyse des Inserts von pAK102 ergab vier potentielle offene Leserahmen, die mit *orf2*, *orf3*, *orf4* und *glpK* bezeichnet wurden (s. Abb. 30 u. 31). Der Vergleich mit den Datenbanken ergab für Orf2 und Orf4 Übereinstimmungen von 77 bzw. 83 % zu hypothetischen Proteinen aus *Y. pestis* und *S. typhimurium*, denen bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Orf3 zeigte 44 % Identität zu einer möglichen Acetlytransferase und das *glpK*-Genprodukt zu einer Glycerin-Kinase ebenfalls aus *Y. pestis*. Um das für den Carbonyl-bildenden Phänotyp verantwortliche Gen zu identifizieren wurden 3 Subklone konstruiert (s. Abb. 31). Das Plasmid pAK102.1 wurde durch Restriktionsverdau von pAK102 mit *Sal*I und anschließende Religation erhalten. Zur Konstruktion von pAK102.2 und pAK102.3 wurde ein Verdau mit *Sac*I durchgeführt, dabei wurde ein ca. 1,8 kb-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBluescript SK^+ kloniert, und das verbleibende Fragment von pAK102 religiert. Die drei Plasmide wurden mittels Elektroporation in *E. coli* ECL707 transformiert und anschließend mit Hilfe der Indikatorplatten (s. 2.2.5) auf ihren Carbonyl-bildenden Phänotyp hin überprüft. Lediglich pAK102.1, das das unvollständige *orf2*-Gen und das *glpK*-Gen enthielt, zeigte den gleichen Phänotyp wie das Ausgangsplasmid. Da das Gen *orf2* auf diesem Plasmid nicht vollständig kloniert wurde, ist es wahrscheinlich, das GlpK die Carbonylbildung aus den Substraten indirekt katalysiert. Möglicherweise wurden die Substrate durch die heterolog produzierte Glycerin-Kinase phosphoryliert und anschließend durch eine wirtseigene Dehydrogenase (z.B. Glycerin-3-Phophat-Dehydrogenase) oxidiert. Dies würde auch die fehlende NAD^+-abhängige Dehydrogenase-Aktivität des Klons erklären.

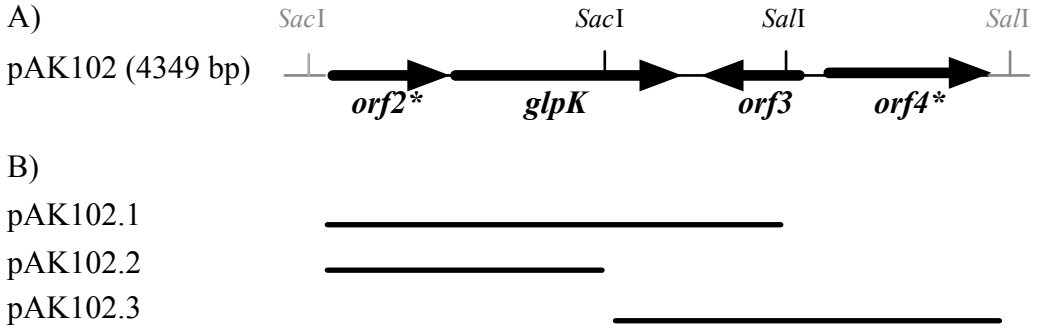


Abbildung 31: Darstellung der genetischen Organisation von pAK102 (A) und die Positionen der subklonierten Fragmente (B)
Die Pfeile markieren Länge und Orientierung von möglichen offenen Leserahmen. Die für die Subklonierungen relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Bereiche, die den Vektor pBluesriptSK+ darstellen sind grau unterlegt.

Interessanterweise war auch auf dem Plasmid pAK115 ein Genprodukt mit hohen Ähnlichkeiten zu einer Glycerin-Kinase aus *E. coli* kodiert (s. Abb. 30 u. 32). Mit *glpX* und *glpF* waren auf diesem Plasmid noch weitere Gene vorhanden, die dem Glycerin-Metabolismus zugeordnet werden konnten. Ebenso interessant im Bezug auf die Carbonylbildung des entsprechenden *E. coli*-Klons, war der mit *orf22* bezeichnete offene Leserahmen. Das 247 Aminosäuren lange Genprodukt war verwandt zu einer kurzkettigen, Typ II-Alkohol-Dehydrogenase aus *A. tumefaciens*. Die Mitglieder dieser Familie sind Proteine mit zumeist 250 bis 300 Aminosäuren Länge und enthalten außerdem das folgende typische Erkennungsmotiv: ([LIVSPADNK]-x(12)-Y-[PSTAGNCV]-[STAGNQCIVM]-[STAGC]-K-{PC}-[SAGFYR]-[LIVMSTAGD]-x (2)-[LIVMFYW]-x(3)-[LIVMFYWGAAPTHQ]-[GSACQRHM]). Das Motiv enthält zwei perfekt konservierte Reste, ein Tyrosin und ein Lysin, wobei das Tyrosin am katalytischen Mechanismus der Enzyme beteiligt ist (FALQUET et al., 2002). Dieses Sequenzmotiv war bis auf die erste Aminosäure ([LIVSPADNK]), die durch einen Cytosin-Rest ersetzt war, ebenfalls vollständig in Orf22 enthalten (Aminosäuren 143 bis 171). Die Subklonierung des Plasmids pAK115 durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *Hind*III erbrachte zwei neue Plasmide. pAK115.1 wurde durch Religation erhalten, pAK115.2 enthielt ein ca. 2,6 kBp-großes Fragment mit den Genen *glpF* und *orf22* (s. Abb. 32). Beide Plasmide wurden in *E. coli* ECL707 transformiert und die resultierenden rekombinanten Klone wurden auf den Carbonyl-Indikatorplatten

inkubiert. Es zeigte sich, dass sowohl *E. coli* ECL/pAK115.1 als auch *E. coli* ECL/pAK115.2 die typische Rotfärbung des Agars verursachten. Wiederum war die Glycerin-Kinase in der Lage, den Phänotyp auf indirektem Wege zu vermitteln. Andererseits ermöglichte auch das für eine Alkohol-Dehydrogenase kodierende Orf22-Gen die Carbonylbildung in *E. coli* auf den getesteten Substraten.

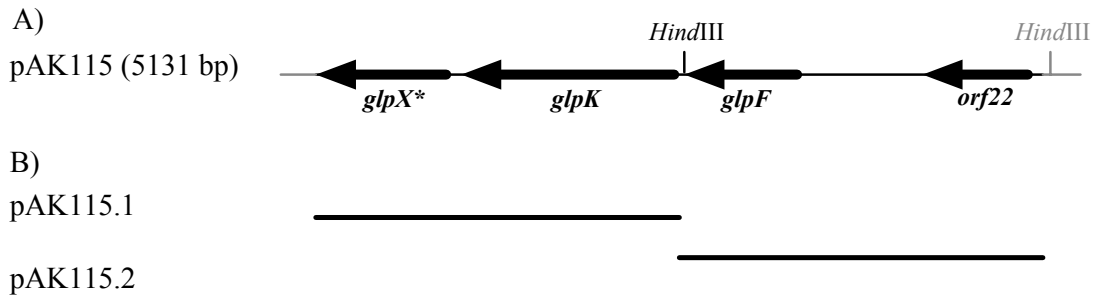


Abbildung 32: Darstellung der genetischen Organisation von pAK115 (A) und die Positionen der subklonierten Fragmente (B)
Die Pfeile markieren Länge und Orientierung von möglichen offenen Leserahmen. Die für die Subklonierungen relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Bereiche, die den Vektor pBluescript SK+ darstellen sind grau unterlegt.

Auf dem Plasmid pAK110 konnte ebenfalls ein Gen identifiziert werden, das für eine Alkohol-Dehydrogenase kodierte. Orf14 umfaßte 387 Aminosäuren und zeigte 90 % Identität zu einer möglichen Eisen-haltigen TypIII-Alkohol-Dehydrogenase aus *S. enterica* (s. Abb. 30). Zur Erkennung von Mitgliedern dieser Dehydrogenase-Familie sind in den PROSITE-Datenbanken zwei spezifische Motive vorhanden. Das erste ist [STALIV]-[LIVF]-x-[DE]-x(6,7)-P-x(4)[ALIV]-x-[GST]-x(2)-D-[TAIVM]-[LIVMF]-x(4)-E und das zweite lautet [GSW]-x-[LIVTSACD]-[GH]-x(2)-[GSAE]-[GSHYQ]-x-[LIVTP]-[GAST]-[GAS]-x(3)-[LIVMT]-x-[HNS]-[GA]-x-[GTAC]. Beide Motive waren vollständig im *orf14*-Genprodukt wiederzufinden (Aminosäuren 173 bis 201 und 264 und 284), ferner war der korrespondierende *E. coli*-Klon in der Lage ein Reihe von Polyolen umzusetzen (s. Tab. 20), die für die Typ III Alkohol-Dehydrogenasen typisch sind. Der experimentelle Nachweis, dass das Gen tatsächlich für den Phänotyp verantwortlich war, steht noch aus.

Bei der Subklonierung der Inserts von pAK107, pAK109 und pAK116 konnten weitere für die Carbonylbildung verantwortliche Gene identifiziert werden. Das Plasmid

pAK107 besaß mit 1109 Bp eine relativ kleines Insert, auf dem zwei mögliche offene Leserahmen identifiziert werden konnten (s. Abb. 30 u. 33). Die mit *sucA* und *sucB* bezeichneten Gene zeigten 74 bzw. 60 % Übereinstimmung zu den Untereinheiten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus *V. cholerae*. Die Subklonierung dieses Plasmids zeigte, dass lediglich das für 214 Aminosäuren kodierende SucB-Gen für die Umsetzung der Polyole durch *E. coli* notwendig war. Durch den Verdau des Plasmids mit *Kpn*I wurden wiederum 2 Plasmide konstruiert (s. Abb. 33). Nur pAK107.1, auf dem allein *sucB* vorhanden war, konnte in *E. coli* den zuvor beobachteten, rot färbenden Phänotyp vermitteln.

Die Analyse des Inserts von pAK109 ergab zwei potentielle offene Leserahmen, die mit *fdhD* und *orf13* bezeichnet wurden (s. Abb. 30 u. 34). Das von *fdhD* abgeleitete Genprodukt bestand aus 218 Aminosäuren und zeigte 88% Übereinstimmung zum FdhD-Protein aus *S. enterica*, das wahrscheinlich notwendig ist für die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase. In *X. campestris* und *M. loti* ist dieses Protein Teil der Formiat-Dehydrogenase. Um nachzuweisen, dass dieses Protein in *E. coli* die Carbonylbildung aus verschiedenen Polyolen ermöglichte, wurde das Plasmid pAK109 subkloniert. Es erfolgte ein Restriktionsverdau mit *Eco*O109I und die anschließende Religation. Das resultierende Plasmid pAK109.1 wurde in *E. coli* ECL707 transformiert und die entsprechenden Klone zeigten die typische Rotfärbung auf den Indikatorplatten (s. 2.2.5).

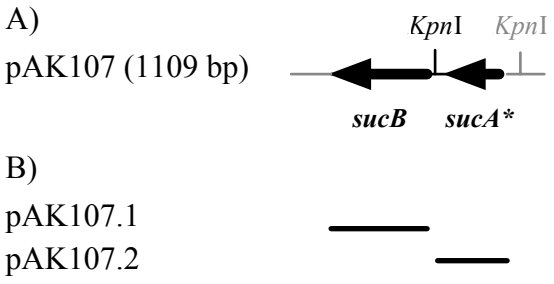


Abbildung 33: Darstellung der genetischen Organisation von pAK107 (A) und die Positionen der subklonierten Fragmente (B)
Die Pfeile markieren Länge und Orientierung von möglichen offenen Leserahmen. Die für die Subklonierungen relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Bereiche, die den Vektor pBluesriptSK+ darstellen sind grau unterlegt.

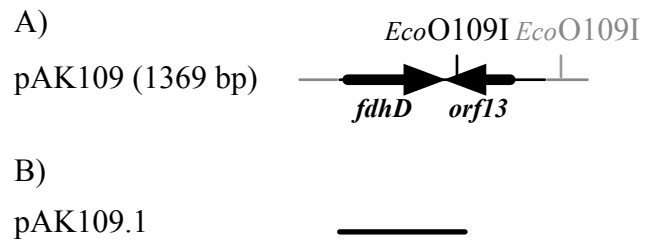


Abbildung 34: Darstellung der genetischen Organisation von pAK109 (A) und die Position des subklonierten Fragmentes (B)
Die Pfeile markieren Länge und Orientierung von möglichen offenen Leserahmen. Die für die Subklonierungen relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Bereiche, die den Vektor pBluesriptSK$^+$ darstellen sind grau unterlegt.

Das Plasmid pAK116 umfaßte 1982 Bp und beinhaltete fünf mögliche offene Leserahmen (s. Abb. 30). Drei der daraus abgeleiteten Proteine zeigten Ähnlichkeiten zu verschiedenen Transportproteinen und einem Lipoprotein. Für den Carbonyl-bildenden Phänotyp und die ADH-Aktivität des entsprechenden *E. coli*-Klons war wahrscheinlich das *yabF*-Genprodukt verantwortlich, welches aus 176 Aminosäuren besteht und 89 % Identität zu einer NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktase aus *E. coli* zeigte. Der experimentelle Nachweis, dass das Gen in *E. coli* den beschriebenen Phänotyp vermittelt, steht noch aus.

Die offenen Leserahmen *phsC* und *orf21* auf den Plasmiden pAK103 und pAK114 zeigten ebenfalls signifikante Ähnlichkeiten zu einer bekannten Oxidoreduktase bzw. einer Thiosulfat-Reduktase, beide Gene waren jedoch unvollständig kloniert. (s. Abb. 30 und Tab. 22).

Die verbleibenden Plasmide pAK104, pAK106 und pAK111-113 enthielten eine Anzahl von Genen und potentiellen Leserahmen, die einer Reihe von metabolischen Reaktionen zugeordnet werden konnten oder mit unbekannter Funktion. Ähnlichkeiten zu bekannten Genen für Alkohol-Oxidoreduktasen oder anderen Reduktasen traten nicht auf. Eine Identifikation der für den Phänotyp verantwortlichen Gene und Genprodukte war bisher weder durch die Sequenzanalyse noch durch Subklonierungsexperimente erfolgreich. Interessanterweise zeigten die Rohextrakte von *E. coli* DH5α/pAK103-104 und *E. coli* DH5α/pAK112-113 im Enzymtest deutliche NAD(H)-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität (s. Tab. 20). Die auf den Plasmiden kodierten Gene wiesen jedoch keinerlei Übereinstimmung mit Oxidoreduktasen der bekannten Typen auf.

Möglicherweise waren hier völlig neue Arten von Enzymen und Reaktionen beteiligt oder die heterolog in den rekombinanten *E. coli*-Stämmen produzierten Proteine vermittelten den Carbonyl-bildenden Phänotyp auf einem bisher unbekannten Weg.

3.4.3 Durchmusterung der nicht anreicherten Umweltgenbanken WN, FN und ZB

Für die Konstruktion der Genbanken WN, FN und ZB wurden Bodenproben einer Wiese, eines brachliegenden Feldes bei Northeim und eines Zuckerrübenfeldes bei Göttingen verwendet (HENNE, 2000). Die Isolierung der chromosomalen DNA wurde ohne einen speziellen Anreicherungsschritt vorgenommen, es handelt sich also um Metagenombanken aus natürlichen Habitaten. Die durchschnittlichen Insertgrößen der Plasmide lagen zwischen 3,5 und 4,4 kBp (s. Tab. 23), der Anteil der Insert-tragenden Plasmide bei ca. 80 % (HENNE, 2000). Die Genbanken umfaßten 342000, 360000 und 583000 rekombinanter Plasmide. Diese Werte lagen im Bereich für andere aus ähnlichen Bodenproben konstruierten Genbanken.

Tabelle 23: Eigenschaften der Umweltgenbanken aus den Umweltproben Wiese bei Northeim (WN), Feld bei Northeim (FN) und Zuckerrübenboden bei Göttingen (ZB), sowie die Anzahl der getesteten Klone
Die Angaben zur Anzahl der rekombinanten Plasmide und der durchschnittlichen Insertgrößen wurden von HENNE, 2000 übernommen.

Bezeichnung der Genbank	Anzahl rekombinanter Plasmide	∅ Insertgröße [kBp]	Anzahl getesteter *E. coli*-Klone je Substrat
WN	583000	4,4	500000
FN	324000	3,5	300000
ZB	360000	3,8	200000

Zur Identifizierung von neuartigen, Polyol-verwertenden Oxidoreduktasen wurden die Plasmide der Genbanken per Elektroporation in *E. coli* ECL707 transformiert und die resultierenden Klone auf Carbonyl-Indikatoragar (s. 2.2.5) ausplattiert. Analog zur Durchmusterung der Anreicherungsgenbanken wurden als Substrate 1,2-Ethandiol, 2,3-Butandiol oder ein Gemisch aus 1,2-Propandiol und Glycerin verwendet (s. Kap. 3.4.2). Auf diese Weise wurden 1.000.000 Klone je Substrat getestet, insgesamt 3 Millionen

Klone (s. Tab. 24). Beim initialen Screening konnten 24 Carbonyl-produzierende *E. coli*-Klone detektiert werden. Die enthaltenen Plasmide wurden isoliert und anschließend in den Wirtsstamm *E. coli* ECL707 retransformiert. 15 Plasmide vermittelten einen stabilen Phänotyp, sie wurden mit pAK201 bis pAK215 bezeichnet (s. Tab. 24). Wie auch bei der Durchmusterung der Anreicherungsgenbanken konnten auf dem Substrat-Gemisch aus Glycerin und 1,2-Propandiol die meisten positiven Klone erhalten werden (neun). Das Screening auf 1,2-Ethandiol und 2,3-Butandiol erbrachte jeweils drei positive Klone. Je 200000 getesteter Klone konnte ein positiver Klon identifiziert werden, die Trefferquote war somit deutlich geringer als bei der Durchmusterung der angereicherten Genbanken (1:75000).

Tabelle 24: Durchmusterung der Metagenombanken WN, FN und ZB auf Gene für Polyol-verwertende Oxidoreduktasen
Das Screening wurde durch Transformation mittels Elektroporation von je 1 µl Plasmidgenbank in den Stamm *E. coli* ECL707 durchgeführt. Die Transformanten wurden bei 30 oder 37 °C unter aeroben Bedingungen auf Indikatormedium (s. 2.2.5) mit 1 % 1,2-Ethandiol, 2,3-Butandiol oder einem Glycerin/1,2-Propandiol-Gemisch als Substrat inkubiert.

Testsubstrat	Genbank	Positive *E. coli*-Klone nach initialem Screening	Positive *E. coli*-Klone mit stabilem Phänotyp	Bezeichnung der Aktivität-vermittelnden Plasmide
Glycerin/1,2-Propandiol	WN	7	4	pAK201-203 & 207
	FN	5	3	pAK211-213
	ZB	3	2	pAK214-215
1,2-Ethandiol	WN	5	3	pAK206, 208 & 210
	FN	0	0	-
	ZB	0	0	-
2,3-Butandiol	WN	3	2	pAK204-205
	FN	0	0	-
	ZB	1	1	pAK209

Die rekombinanten Plasmide und ihre korrespondierenden *E. coli*-Klone ECL707/pAK201-pAK215 wurden anschließend eingehend charakterisiert. Dazu

gehörte eine biochemische Analyse, die Sequenzierung der Plasmidinserts und die Analyse der Sequenzdaten.

3.4.3.1 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten *E. coli*-Stämme pAK201 bis pAK215

Die Experimente zur biochemischen Charakterisierung der von den Plasmiden pAK201 bis pAK215 kodierten Genprodukte konzentrierte sich wiederum auf die Identifizierung von Proteinen, die eine Nikotinamid-abhängige Oxidation von kurzkettigen Polyolen und die Reduktion der korrespondierenden Carbonyle katalysierten. Zu diesem Zweck wurden die Plasmide in *E. coli* DH5α transformiert und in LB-Medium (s. 2.2.1) mit den entsprechenden Substraten angezogen. Die geernteten Zellen wurden in KP-Puffer aufgenommen und mittels French-Presse wurden Rohextrakte hergestellt (s. 2.14). Als Referenz diente analog zu den Messungen mit den Extrakten aus *E. coli* pAK101 bis pAK116 der Stamm *E. coli* DH5α/pBluescriptSK$^+$. Anschließend wurden mit Hilfe der unter 2.16.2 beschriebenen Enzymtests die spezifischen Aktivitäten der NAD(P)H-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen bestimmt (s. Tab. 25). Als Substrate in den Oxidationsreaktionen dienten 1,2-Propandiol, Glycerin, 1,2-Ethandiol, 2,3-Butandiol und 1,2,4-Butantriol. Zur Überprüfung der Spezifität der Reduktionsreaktionen wurden Dihydroxyaceton, Hydroxyaceton, Glykolaldehyd und Diacetyl eingesetzt. Eine NADP(H)-abhängige Aktivität konnte bei den gewählten Reaktionsbedingungen in keinem der untersuchten Rohextrakte festgestellt werden. Die Extrakte von *E. coli* DH5α/pAK204, *E. coli* DH5α/pAK206, *E. coli* DH5α/pAK208 und *E. coli* DH5α/pAK210-213 zeigten jedoch eine signifikante NAD$^+$-abhängige Oxidation sowie eine NADH-vermittelte Reduktion von einem oder mehreren Substraten. Die Werte in den Rohextrakten der anderen acht Klone lagen im Bereich der Negativ-Kontrolle. Daher waren auf diesen Plasmiden wahrscheinlich keine Nikotinamid-abhängige Enzyme kodiert. Wie zuvor beschrieben könnten hier andere Arten von Enzymen oder Reaktionen die Carbonylbildung in *E. coli* vermitteln. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die gewählten Expressions- und/oder Reaktionsbedingungen für einige der Enzyme nicht ideal waren.

Tabelle 25: **Spezifität der NAD(H)-abhängigen Dehydrogenase-Aktivtät in den Rohextrakten von *E. coli* DH5α/pAK204, *E. coli* DH5α/pAK206, *E. coli* DH5α/pAK208 und *E. coli* DH5α/pAK210 – 213**
Die Zellanzucht erfolgt in LB-Medium (s. 2.2.1) mit jeweils 1 % des beim Screening eingesetzten Substrats in einem Kulturvolumen von 250 ml. Die Herstellung der Rohextrakte und die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte wie unter 2.14 und 2.16.2 beschrieben. Die jeweils höchste gemessene Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt.

Reaktion und Substrat	**Relative spezifische Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität (%)**						
	pAK204	**pAK206**	**pAK208**	**pAK210**	**pAK211**	**pAK212**	**pAK213**
Oxidation[a]							
1,2-Ethandiol	27	-	-	-	-	-	100
1,2-Propandiol	100	100	100	100	100	100	-
2,3-Butandiol	54	19	35	31	65	23	-
Glycerin	62	26	45	31	65	46	-
1,2,4-Butantriol	24	29	26	39	43	31	-
Reduktion[b]							
Dihydroxyaceton	-	100	88	100	-	-	-
Hydroxyaceton	-	-	52	-	-	-	-
Glycolaldehyd	-	55	100	-	100	-	100
Diacetyl	-	-	-	-	-	-	30

[a], [b] Die spezifischen Aktivitäten in den Oxidations- und Reduktionsreaktionen wurden relativ zu den jeweils höchsten angegeben. Oxidation: pAK204, 0,071 U/mg; pAK206, 0,027 U/mg; pAK208, 0,031 U/mg; pAK210, 0,013 U/mg; pAK211, 0,023 U/mg; pAK212, 0,013 U/mg; pAK213, 0,044 U/mg. Reduktion: pAK206, 0,065 U/mg; pAK208, 0,066 U/mg; pAK210, 0,016 U/mg; pAK211, 0,019 U/mg; pAK213, 0,037 U/mg.

Die *E. coli*-Klone, die die Plasmide pAK204, pAK206, pAK208 und pAK210-212 beinhalteten, besaßen ein breites Substratspektrum bei der Oxidation der getesteten Polyole. Bevorzugtes Substrat war in allen Fällen 1,2-Propandiol. Lediglich *E. coli*/ pAK213 zeigte eine spezifische Reaktion mit 1,2-Ethandiol (s. Tab. 25). Des Weiteren konnte bei *E. coli*/pAK204 eine Umsetzung von primären und sekundären Alkoholen (Ethanol und 1-Propanol) beobachtet werden. Die relativen, spezifischen Aktivitäten lagen jedoch nur bei 6 bzw. 14 % (Daten nicht gezeigt).
Die Untersuchung der Reduktionsreaktion in den einzelnen Extrakten zeigte vergleichbar mit den Klonen aus den Anreicherungsgenbanken (s. Kap. 3.4.2.1) eine höhere Spezifität. Die höchsten Aktivitäten wurden mit Dihydroxyaceton (*E. coli*/pAK206 und *E. coli*/pAK210) und Glykolaldehyd (*E. coli*/pAK208, *E. coli*/pAK211 und *E. coli*/pAK213) erhalten. Eine Reduktion der Substrate Glyceraldehyd, Methylglyoxal und Aceton konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Für *E. coli*/pAK204 und *E. coli*/pAK212 konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen mit keinem der getesteten Substrate eine signifikante Umsetzung festgestellt werden.

3.4.3.2 Molekulare Analyse der Plasmide pAK201 bis 215

Die inserierten DNA-Fragmente der Plasmide pAK201 bis pAK215 wurden durch das „Göttingen Genomics Laboratory“ (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) nach der Methode von SANGER (1977) in beiden Orientierungen sequenziert. Die Sequenzierung erbrachte Insertgrößen von 794 Bp (pAK213) bis zu 5555 Bp (pAK208) (s. Tab. 26). Der GC-Gehalt lag bei den meisten Inserts in einem Bereich von 60 bis 69 %, lediglich für die Plasmide pAK214 und pAK215 wurden mit 38 und 44 % niedrigere Werte bestimmt (s. Tab. 26).

Tabelle 26: Insertgrößen und GC-Gehalte der Plasmide pAK201 bis 215

Plasmid	Insertgröße	GC-Gehalt
pAK201	2117 Bp	65 %
pAK202	2301 Bp	63 %
pAK203	2650 Bp	62 %
pAK204	1408 Bp	68 %
pAK205	2052 Bp	66 %
pAK206	2851 Bp	69 %
pAK207	3550 Bp	62 %
pAK208	5555 Bp	61 %
pAK209	2519 Bp	65 %
pAK210	1113 Bp	64 %
pAK211	2596 Bp	64 %
pAK212	1868 Bp	63 %
pAK213	794 Bp	60 %
pAK214	1784 Bp	38 %
pAK215	1427 Bp	44 %

Durch eine eingehende Analyse der DNA-Sequenzen mit dem Programm DNA Strider 1.2 und dem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit den in den Datenbanken der NCBI, von PROSITE und Pfam gespeicherten Proteinen konnten 40 potentielle Protein-kodierende Gene identifiziert werden. 26 davon lagen vollständig, 14 unvollständig kloniert vor (s. Abb. 35 und Tab. 27). 23 der identifizierten Gene zeigten Ähnlichkeiten zu Genen oder Genprodukten einer großen Anzahl unterschiedlicher Mikroorganismen. Dazu gehörten u. a. Vertreter der Gattungen *Sinorhizobium*, *Ralstonia*, *Chlorobium*, *Salmonella*, *Bacillus* und *Xanthomonas*. Das mit *orf17* bezeichnete Gen auf Plasmid pAK208 war außerdem verwandt zu einem Gen für ein hypothetisches Protein des methanogenen Archaeons *Methanosarcina mazei*. Eine Häufung der Ähnlichkeiten zu Genen aus Gattungen der Enterobakterien war im Vergleich zu den Plasmiden pAK101 bis pAK116 nicht festzustellen. Die restlichen 17

potentiellen offenen Leserahmen zeigten keinerlei Übereinstimmungen mit den in den Datenbanken erfaßten Gen- und Proteindaten.

Die Mehrheit der festgestellten Identitäten zu den bereits bekannten Genen lag unter 50 %. Dies und die Tatsache dass beinahe die Hälfte der vorhergesagten Gene keinem Homologen zugeordnet werden konnten, ließ die Schlußfolgerung zu, dass die verwendeten Genbanken, Gene aus einer großen Anzahl von Mikroorganismen enthielten, die bisher noch nicht untersucht oder noch nicht kultiviert worden sind.

Die weiteren Analysen der Gene und Genprodukte beschränkte sich im Wesentlichen auf die Plasmide pAK204, pAK206, pAK208 und pAK210-213, da diese eine signifikante NAD(H)-abhängige Alkohol-Deyhdrogenase-Aktivität in *E. coli* vermittelten (s. Tab. 25). Keines der Plasmide beinhaltete Gene, die Ähnlichkeiten zu den bekannten NAD(H)-abhängigen Enzymen dieser Klasse aufwiesen außer *orf27* auf pAK213. Dieses nur partiell klonierte Gen (426 Bp) war zu 26 % identisch zu der C-terminalen Region einer Aldehyd-Dehydrogenase aus *Brucella melitensis* (s. Tab. 27). Ob dieses Gen tatsächlich für den Carbonyl-produzierenden Phänotyp in *E. coli* verantwortlich war, muß noch durch Subklonierungsexperimente überprüft werden.

Die vorhergesagten Gene und Genprodukte auf den anderen 6 Plasmiden zeigten keinerlei Übereinstimmung mit den bisher untersuchten Alkohol-Dehydrogenasen oder zu anderen Oxidoreduktasen. In den meisten Fällen konnte keinerlei Verwandtschaft zu in den Datenbanken der NCBI gespeicherten Proteinsequenzen gefunden werden.

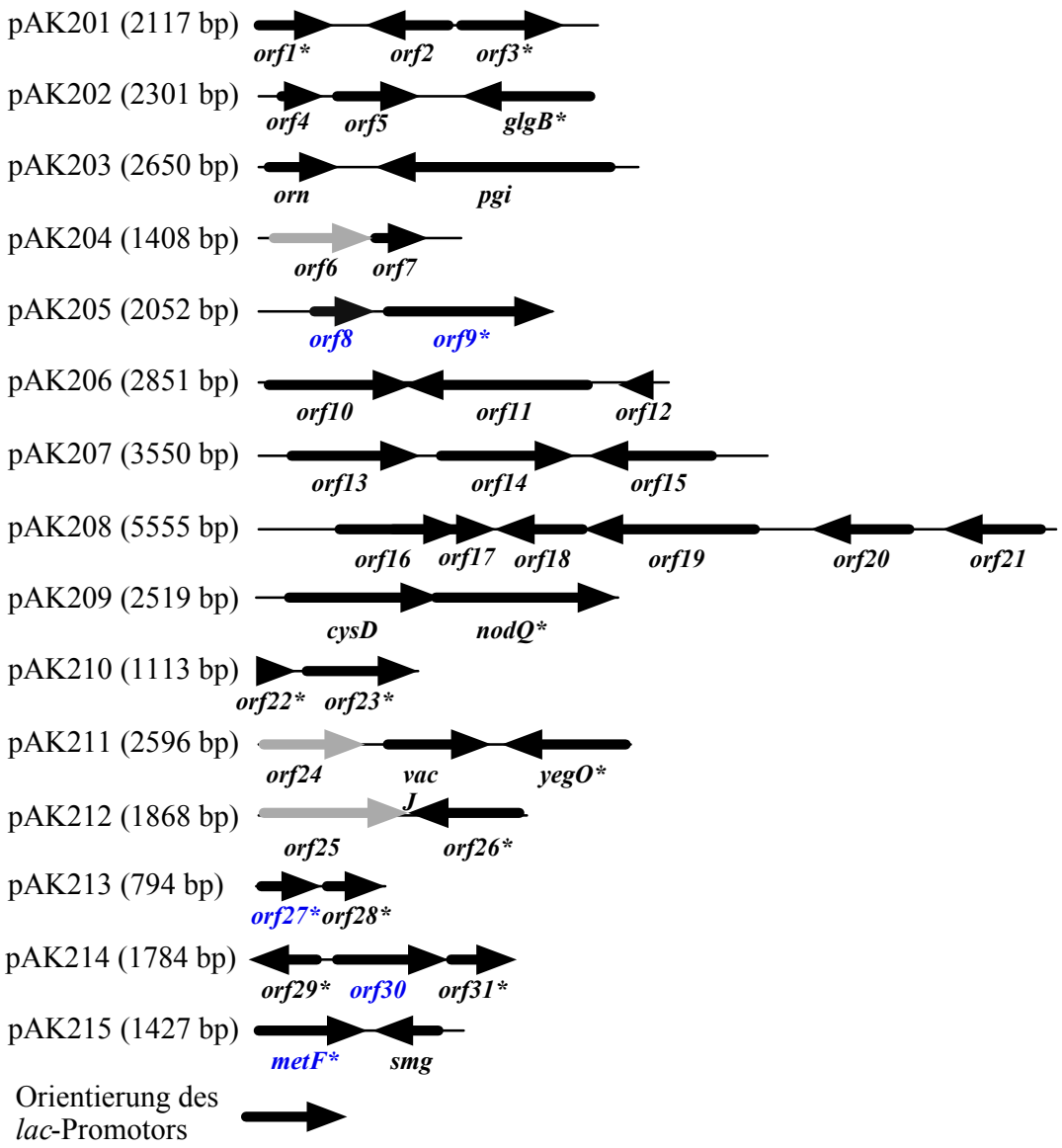


Abbildung 35: Genetische Organisation der Plasmide pAK201 bis pAK215
Die Pfeile markieren Länge und Orientierung von möglichen offenen Leserahmen. Die Sternchen zeigen unvollständige Gene an. Bezeichnungen von offenen Leserahmen, deren abgeleitetes Genprodukt Ähnlichkeiten zu Alkohol-Dehydrogenasen bzw. Oxidoreduktasen aus anderen Organismen aufweist, sind in Rot bzw. Blau dargestellt. Gene, die als verantwortlich für den Carbonyl-bildenden Phänotyp der *E. coli*-Klone identifiziert wurden, sind grau markiert.

Tabelle 27: **Identifizierte Gene auf den Plasmiden pAK201 bis pAK215, Accession-Nummern und Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen**

Die Identifizierung der verwandten Proteine zu den vorhergesagten Genprodukten sowie die Determinierung der Sequenzähnlichkeiten (in %) und des Score geschah mit Hilfe der BLAST-Programme der NCBI. Unvollständige Gene sind durch Sterne gekennzeichnet. Die Namen der Gene, die als verantwortlich für die Carbonylbildung identifiziert wurden, sind fettgedruckt.

Plasmid	Identifiziertes Gen	Verwandtes Protein	Organismus (Accession des verwandten Proteins)	Identität (%)	Region mit ähnlichen Aminosäuren	Score
pAK201	*orf1**	Potentielle transmembrane Hydrolase	*R. solanacearum* (NP_521794) *Y. pestis* (NP_405492)	32 33	176 154	89 86
pAK201	*orf2*	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK201	*orf3**	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK202	*orf4*	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK202	*orf5*	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK202	*glgB**	1,4-α-Glukan-spaltendes Enzym	*Aquifex aeolicus* (NP_213496) *S. typhimurium* (NP_462439)	48 48	307 300	314 291
pAK203	*orn*	Wahrscheinliche Oligoribonuklease	*R. solanacearum* (NP_519063)) *Neisseria meningitidis* (NP_283406)	62 53	174 174	248 218
pAK203	*pgi*	Glukose-6-phosphat-Isomerase	*Chlorobium tepidum* (NP_661881) *N. meningitidis* (NP_284321)	58 55	540 547	630 603
pAK204	*orf6*	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 27

Plasmid	Identifiziertes Gen	Verwandtes Protein	Organismus (Accession des verwandten Proteins)	Identität (%)	Region mit ähnlichen Aminosäuren	Score
pAK204	*orf7*	Hypothetisches Protein	*S. meliloti* (NP_437360) *M. loti* (NP_103287)	65 53	121 118	162 132
pAK205	*orf8*	CO-Dehydrogenase, kurze Kette	*Hydrogenophaga pseudoflava* (P11915) *Sulfolobus solfataricus* (NP_343786)	64 65	145 144	213 210
pAK205	*orf9**	CO-Dehydrogenase, lange Kette; mögliche Aldehyd oder Keton-Oxidoreduktase, große Untereinheit	*M. loti* (NP_102786) *Aeropyrnum pernix* (NP_147434) *Arthrobacter nicotinovorans* (CAC37487)	40 39 34	399 391 395	286 257 215
pAK206	*orf10*	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK206	*orf11*	Hypothetisches Protein	*R. solanacearum* (NP_522197) *S. coelicolor* (NP_628915)	56 57	401 399	412 405
pAK206	*orf12*	Hypothetisches Protein	*P. aeruginosa* (NP_250045)	70	51	72
pAK207	*orf13*	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK207	*orf14*	Mögliches Membranprotein	*E. coli* (NP_415890) Lambda (PO3764)	25 22	169 338	52 51
pAK207	*orf15*	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK208	*orf16*	Potentieller Transkriptionsregulator	*M. loti* (NP_107091) *R. solanacearum* (NP_519114)	42 41	99 101	84 79
pAK208	*orf17*	Hypothetisches Protein	*Methanosarcina mazei* (NP_63524) *Ms. acetivorans* (NP_618485)	47 45	150 153	135 132
pAK203	*orf18*	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 27

Plasmid	Identifiziertes Gen	Verwandtes Protein	Organismus (Accession des verwandten Proteins)	Identität (%)	Region mit ähnlichen Aminosäuren	Score
pAK208	*orf19*	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK208	*orf20*	Nodulin-verwandtes Protein	*M. loti (NP_107091)* *Caulobacter crescentus* (NP_419534)	43 43	225 224	182 171
pAK208	*orf21*	Alpha/beta-Hydrolase	*Bacillus anthracis* (NP_657047)	28	239	83
pAK209	*cysD*	ATP-Sulfurylase, kleine Untereinheit	*C. crescentus* (NP_420294) *P. aeruginosa* (NP_253133)	76 72	299 302	484 457
pAK209	*nodO**	ATP-Sulfurylase, große Untereinheit	*C. crescentus* (NP_420293) *Xantomonas campestris* (NP_638517)	73 66	425 414	622 550
pAK210	*orf22**	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK210	*orf23**	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK211	*orf24*	Hypothetisches Protein	*S. meliloti* (NP_436746)	56	231	259
pAK211	*vacJ*	Lipoprotein	*X. campestris* (NP_639546) *X. axonopodis* (NP-644638)	44 39	225 237	150 149
pAK211	*yegO**	Mögliches Resistenzprotein, Efflux-Transporter	*S. typhimurium* (NP_461073) *E. coli* (NP_288584)	52 52	237 237	242 241
pAK212	*orf25*	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK212	*orf26**	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK213	*orf27**	Aldehyd-Dehydrogenase	*Brucella melitensis* (NP_541260)	26	92	29
pAK213	*orf28**	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 27

Plasmid	Identifiziertes Gen	Verwandtes Protein	Organismus (Accession des verwandten Proteins)	Identität (%)	Region mit ähnlichen Aminosäuren	Score
pAK214	*orf29**	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK214	*orf30*	FeS-bindendes Protein, FeS-Oxidoreduktase	*B. halodurans* (NP_244669) *B. anthracis* (NP_653806)	44 44	261 258	220 212
pAK214	*orf31**	Kein ähnliches Protein	-	-	-	-
pAK215	*metF**	5.10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase	*R. solanacearum* (NP_518212) *P. aeruginosa* (NP_249129)	60 60	243 245	308 300
pAK215	*smg*	Mögliches Smg-Protein	*V. cholerae* (NP_229703) *X. axonopodis* (NP_644110)	30 30	157 156	96 93

Um die Gene zu identifizieren, die für die Carbonylbildung in den korrespondierenden *E. coli*-Klonen verantwortlich waren, wurden Subklonierungen durchgeführt. Diese Methode war erfolgreich für die Plasmide pAK204, pAK211 und pAK212 (s. Abb. 36).
Das Plasmid pAK204 wurde zum einen mit dem Restriktionsenzym *Not*I und zum anderen mit *Sal*I verdaut, die resultierenden Fragmente wurden religiert und mit pAK204.1 und pAK204.2 bezeichnet (s. Abb. 36B). Nach Transformation in *E. coli* ECL707 und Inkubation auf den Carbonyl-Indikatorplatten mit den Substraten 1,2-Propandiol/Glycerin, 1,2-Ethandiol oder 2,3-Butandiol vermittelte lediglich pAK204.2, das das mit *orf6* bezeichnete Gen enthielt, den gleichen Phänotyp wie das Ausgangsplasmid.
Die Subklonierung von pAK211 erfolgte ebenfalls durch den Einsatz von zwei Restriktionsenzymen. Das Plasmid pAK211.1 wurde nach Religation eines *Eco*RV-Verdaus erhalten, pAK211.2 trug das dabei ausgeschnittene Fragment in pBluescript SK^+. Das Plasmid pAK211.3 enthielt ein ca. 1,0 kb-großes *Acc*I-Fragment ebenfalls im Klonierungsvektor pBluescript SK^+ (s. Abb. 36D). Eine positive Reaktion im anschließenden Plattentest zeigten die *E. coli*-Klone pAK211.1 und pAK211.3, die beide *orf24* trugen.
Das 1868 Bp-große Insert von pAK212 beinhaltete die offenen Leserahmen *orf25* und *orf26*, die beide keine Homologien zu bisher bekannten Proteinen aufwiesen. Die Subklonierung erfolgte mit den Enzymen *Sma*I und *Sac*II. Der Verdau mit *Sma*I erbrachte nach Religation bzw. der Klonierung des ausgeschnittenen Fragmentes in pBluescript SK^+ die Plasmide pAK212.1 und pAK212.2. Für die Konstruktion von pAK212.3 wurde ein 1,3 kBp-großes *Sac*II-Fragment ebenfalls in pBluescriptSK^+ ligiert (s. Abb. 36F). Die Plasmide wurden zur Überprüfung des Phänotyps wiederum in *E. coli* ECL707 transformiert, dabei zeigten lediglich die Kolonien von *E. coli*/pAK212.3 die typische Rotfärbung. Der Carbonyl-bildende Phänotyp ist daher auf die Aktivität des *orf25*-Genprodukts zurückzuführen.

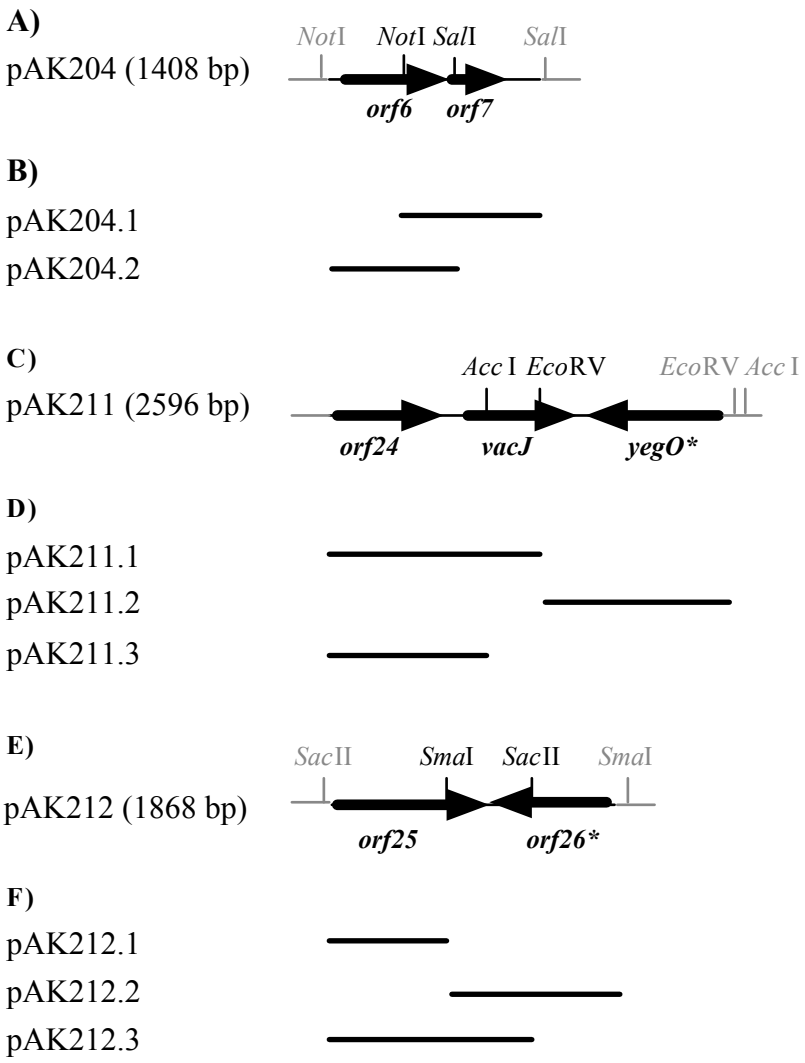


Abbildung 36: Darstellung der genetischen Organisation von pAK204 (A), pAK211 (C) und pAK212 (E) sowie die Positionen der subklonierten Fragmente (B, D und F)
Die Pfeile markieren Länge und Orientierung von möglichen offenen Leserahmen. Die für die Subklonierungen relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Bereiche, die den Vektor pBluesriptSK$^+$ darstellen sind grau unterlegt.

Alle drei identifizierten Gene *orf6*, *orf24* und *orf25* wiesen in der Nähe des Startkodons mögliche Ribosomenbindestellen auf. Das *orf6*-Gen (681 Bp) kodierte für ein Protein mit einer vorhergesagten molekularen Masse von 24590 Da, *orf25* (546 Bp) für eines mit 19101 Da. Beide Proteinsequenzen zeigten keinerlei signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen. Das Orf24-Gen kodierte für 269 Aminosäuren (29738 Da) und zeigte 56 % Übereinstimmung zu einem hypothetischen, bisher nicht charakterisierten Protein aus *S. meliloti*. (s. Tab. 27).

Einige der bekannten NAD(P)-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen besitzen in der Aminosäuresequenz Glycin-reiche Regionen, die an der Bindung des Kofaktors beteiligt sind. Die Bindemotive G-X-G-X-X-G (WIERENGA et al., 1985) und G-X-G-X-X-A (SCRUTTON et al., 1990) sind in nahezu allen Enzymen dieser Klassen konserviert (REID und FEWSON, 1994). Das zentralen Glycin erleichtert zusammen mit dem darauffolgenden Rest (Aspartat oder Glutamat) die Bindung des Nikotinamids (WIERENGA et al., 1985). Auch in den abgeleiteten Proteinsequenzen von *orf6* und *orf25* war dieses Motiv vollständig vorhanden. In Orf24 war die dritte konservierte Aminosäure (Glycin oder Alanin) durch ein Prolin ersetzt (s. Abb. 37). Dieser Austausch war auch im Bindemotiv der Glycerin-Dehydrogenase aus *C. freundii* (DANIEL et al., 1995) festgestellt worden. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse und der Enzymaktivität der drei Genprodukte mit verschiedenen Polyolen (s. Tab. 25) lassen die Schlußfolgerung zu, dass die Genprodukte Orf6, Orf24 und Orf25 neue Typen von Alkohol-Dehydrogenasen darstellen.

```
                                A
Motiv                 G X G X X G
Orf6        54    G C G G G N L A D M I G D V Y G G R    71
Orf24      161    A P G P G G K P V R F R V T L D G R   177
Orf25       54    L G G V G F P G G G R V C S R S L D    71
```

Abbildung 37: Aminosäure-Alignment von Orf6, Orf24 und Orf25 im Bereich des konservierten Bindemotivs für Nikotinamid-Kofaktoren
Die grau unterlegten Aminosäuren sind Bestandteile der Bindemotive GXGXXG oder GXGXXA, die von WIERENGA et al. (1985) und SCRUTTON et al. (1990) postuliert wurden. Mögliche Aspartatreste, die ebenfalls an der Bindung des Kofaktors beteiligt sind, sind fettgedruckt.

Die bisherigen Versuche, die für die Carbonylbildung verantwortlichen Gene in pAK206, pAK208 und pAK210 durch Subklonierung zu identifizieren, waren nicht erfolgreich.

Die Sequenzanalyse der übrigen acht Plasmide, für die keine NAD(H)-vermittelte Dehydrogenase-Aktivität in den Rohextrakten gemessen werden konnten, zeigte, dass drei davon (pAK205, pAK214 und pAK215) vollständige oder partiell klonierte Gene beinhalteten, die Ähnlichkeiten zu bekannten Oxidoreduktasen aufwiesen. Die mit *orf8* und *orf9* bezeichneten Gene auf pAK205 waren verwandt mit der kleinen und der

großen Untereinheit einer CO-Dehydrogenase und einer möglichen Aldehyd/Keton-Oxidoreduktase, die zur Familie der Xanthin-Oxidasen gehörten (RAMOA et al. 1995). Diese Proteine besitzen einen Molybdopterin-Kofaktor und zwei verschiedene [2Fe-2S]-Zentren. Die [2Fe-2S]-Bindedomäne ist in verschiedenen Enzymklassen verbreitet, dazu gehören auch die Dehydrogenasen und Oxidasen. Eine Überprüfung mit Hilfe der Pfam-Datenbank (BATEMAN et al., 2002) zeigte, dass die [2Fe-2S]-Bindedomäne vollständig in Orf8 und Orf9 konserviert war. Das Bindemotiv des Molybdopterin-Kofaktors war teilweise vorhanden.

Nachfolgende Pfam-Untersuchungen mit dem *orf30*-Genprodukt (20599 Da; pAK214) zeigten das Vorhandensein einer weiteren konservierten Domäne. Die DUF224-Dömane kommt in Heterodisulfid-Reduktasen, in Glykolat-Oxidasen und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen vor, bisher konnte ihr noch keine Funktion zugeordnet werden. Orf30 und MetF (pAK215) weisen Ähnlichkeiten zu FeS-Oxidoreduktasen und zu 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktasen auf (40 bzw. 60 %). Die Bildung von Carbonylen aus Polyolen ist für Enzyme dieser Klassen bisher nicht beschrieben worden. Es handelt sich also daher um neue Arten von Alkohol-Dehydrogenasen oder die heterolog gebildeten Proteine ermöglichen die Carbonyl-Bildung auf dem Indikatoragar (s. 2.2.5) auf eine bisher noch nicht verstandene Art und Weise.

4 DISKUSSION

4.1 Konstruktion von Metagenombanken

Böden und Sedimente sind sehr heterogene Lebensräume für Mikroorganismen. In einer enormen Anzahl von natürlichen Mikrohabitaten leben Bakterien, Pilze und Archaeaen in unterschiedlichen Gemeinschaften, vergesellschaftet mit anderen Mikroben, Pflanzen oder auch Tieren. Innerhalb dieser Gemeinschaften gibt es komplexe Wechselwirkungen und Regulationsnetzwerke. Ziel der Metagenom-Forschung ist einerseits ein besseres Verständnis der Struktur und Funktion dieser mikrobiellen Lebensgemeinschaften und andererseits die biotechnologische Nutzung der vorhandenen und bisher weitgehend unerschlossenen metabolischen und genetischen Diversität. Betrachtet man die kultivierten Bakterien als Indikator für die chemisch-metabolische und genetische Kapazität der unkultivierten Mikroorganismen, so kann man Habitate wie Böden oder Sedimente als eine nahezu unerschöpfliche Quelle für neuartige biologisch-aktive Substanzen und Biosynthesewege betrachten (BULL et al., 1992; BULL et al., 2000).

Molekularbiologische Techniken wie die DNA-DNA-Hybridisierung, die PCR-Technik und die Analyse von 16S rDNA-Sequenzen haben in den vergangenen Jahren dazu geführt, den Begriff der mikrobiellen Diversität zu revolutionieren. Eine Vielzahl an molekularen Untersuchungen unterschiedlichster Habitate auf der Basis von 16S rDNA-Sequenzen zur Determinierung ihrer mikrobiellen Zusammensetzung hat zur Identifizierung von einigen tausend bisher nicht-kultivierten Spezies geführt (z.B. WARD et al., 1990; GIOVANNONI et al., 1990; MUYZER et al., 1992; BORNEMANN et al., 1996; BORNEMANN und TRIPLETT, 1997; SCHLEPER und ECK, 2000). Der von WOESE im Jahr 1987 entwickelte Stammbaum, der 11 unterschiedliche Hauptgruppen in der Domäne der *Bacteria* umfaßte, wurde bereits 10 Jahre später auf 36 Phyla erweitert (HUGENHOLTZ et al., 1998). Mehr als ein Drittel davon wird nur durch 16S rDNA-Sequenzen unkultivierter Mikroorganismen repräsentiert. Mit Hilfe dieser molekularen Techniken konnte eine dritte Hauptgruppe in der Domäne der *Archaea* identifiziert werden, die zuvor in die Zweige der *Crenarcheota* und der *Euryarcheota* unterteilt war. Die als *Korarcheota* bezeichnete dritte Gruppe wurde bei der Analyse von ribosomaler DNA unkultivierter Organismen des Obsidian Pool (Yellow Stone Park, USA) nachgewiesen (BARNES et al., 1996).

Die geringe Kenntnis über das genetische und metabolische Potential natürlicher Mikroorganismen wird auch bei der Genomsequenzierung von kultivierten Organismen deutlich. So zeigten 70 % der im 2,2 MBp-großen Genom von *Pyrobaculum aerophilum* vorhergesagten offenen Leserahmen keinerlei Homologie zu bekannten, in den Datenbanken erfassten Sequenzen. Bei *Haemophilus influenza* konnten 40 % der aus den 1743 identifizierten offenen Leserahmen abgeleiteten Proteine in keine der 12 funktionellen Klassen eingeordnet werden (BULL et al., 2000). Trotz des starken Anstiegs der Anzahl der vollständig sequenzierten Organismen bleibt der Anteil der Gene und Proteine, die keinerlei Verwandtschaft mit bekannten Sequenzen aufweisen, bei etwa 40 %.

Die vorliegende Arbeit zeigt Möglichkeiten auf, das unerschlossene metabolische und genetische Potential von natürlichen Mikroorganismen durch die Konstruktion von komplexen Metagenombanken zu erforschen und auch für industrielle Anwendungen zugängig zu machen. Das Potential zur Nutzung der mikrobiellen Diversität in Umweltproben als Ressource für neue Biokatalysatoren und Wirkstoffe konnte in einer Reihe von Veröffentlichungen angedeutet werden (HENNE et al., 1999 und 2000; COTTRELL et al., 1999; RONDON et al., 2000; BRADY et al., 2001). Der verwendete Ansatz stellte eine Kombination der klassischen Anreicherungstechniken mit den Methoden zur Konstruktion von Metagenombanken dar. Zur Gewinnung von biotechnologisch-relevanten Genen und Genprodukten wurden Genbanken aus verschiedenen Umweltproben hergestellt, die eine kurze Anreicherungsphase in Mineralmedium mit Glycerin und 1,2-Propandiol als Kohlenstoffquellen durchlaufen hatten. Die zur Konstruktion der Genbanken verwendete DNA wurde anschließend direkt aus den Proben isoliert. Nachfolgend wurden die Metagenombanken mit Hilfe von unterschiedlichen Techniken auf die Existenz von Genen für Glycerin- und Diol-Dehydratasen sowie für Alkohol-Oxidoreduktasen durchmustert. Dabei wurden sowohl Aktivtäts-basierende und als auch Sequenz-abhängige Methoden verwendet. Ein weiterer Aspekt war der Vergleich der aus den angereicherten Genbanken erhaltenen Klone und Gene mit den gewünschten Eigenschaften mit denen aus Genbanken, die ohne einen Anreicherungsschritt erstellt wurden.

4.1.1 Isolierung und Reinigung von chromosomaler DNA aus Umweltproben

Eine wichtige Voraussetzung zur Konstruktion von Metagenombanken ist die Extraktion intakter, hochmolekularer und klonierbarer, genomischer DNA aus den Umweltproben. Die nachfolgende Abtrennung von Polymeren und anderer koextrahierter Hemmstoffe stellt eine weitere technologische Herausforderung dar.

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus Umweltproben wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Methoden in zahlreichen Variationen entwickelt (TORSVIK et al., 1980; OGRAM et al., 1987; TSAI und OLSON, 1991; JACOBSON und RASMUSSEN, 1992; ZHOU et al., 1996; HOLBEN, 1996; SANTOSA, 2001). Man unterscheidet dabei zwei verschiedene Ansätze, zum einen die direkte Lyse der Zelle in der Probe und zum anderen die sogenannte Fraktionierungsmethode, die eine initiale Abtrennung der Zellen von den umgebenden Matrixbestandteilen und eine daran anschließende DNA-Extraktion beinhaltet.

Zur Zellfraktionierung können z.B. Kationenaustauschermateriale oder verschiedene Filtersysteme (z.B. bei Meerwasserproben) genutzt werden (TORSVIK et al., 1980; JACOBSON und RASMUSSEN, 1992). Eine Alternative ist die Homogenisation der Umweltproben in einem Puffer und die Abtrennung der Bodenpartikel durch niedertourige Zentrifugation (HOLBEN, 1996). Die anschließende Zelllyse wird dann nach Standardprotokollen für die Isolierung von chromosomaler DNA aus Einzelorganismen durchgeführt (z.B. AUSUBEL et al., 1987). Diese Vorgehensweise eignet sich besonders für die DNA-Extraktion aus Proben mit geringer Biomasse (z.B. Wasserproben) oder einem hohen Anteil an störenden Fremdsubstanzen (z.B. Klärwerksproben). Bei dieser Methode der direkten Lyse wird sehr hochmolekulare und nur wenig verunreinigte DNA erhalten, die ohne weitere Reinigungsschritte für die Klonierung eingesetzt werden kann.

Dem gegenüber steht die Methode der direkten Lyse der Zellen ohne vorherige Zellextraktion, die zuerst von OGRAM et al. (1987) beschrieben wurde. Ebenfalls auf dieser Grundlage basieren die von TSAI und OLSON (1991) und die von ZHOU et al. (1996) publizierten Vorgehensweisen. Die Methode von OGRAM et al. (1987) beinhaltet eine Hitzebehandlung der Proben in Gegenwart von SDS und einer anschließenden Homogenisierung mit Glaskugeln in einem „Bead Beater“. TSAI und OLSON (1991) dagegen erreichen den Zellaufschluß durch die Zugabe von Lysozym und einer wiederholten Schockgefrierung der Proben bei -70 °C und anschließendem

Auftauen bei 65 °C. Ein wesentlicher Vorteil der Methode der direkten Lyse ist, dass hier sowohl die DNA aus fest an Bodenpartikeln gebundenen Mikroorganismen als auch die extrazellulär im Boden vorliegende DNA isoliert wird und somit die Ausbeute deutlich höher ist. Die extrazelluläre DNA wird in großen Mengen von toten oder absterbenden Zellen in die Umgebung abgegeben (REANNEY et al., 1983). Sie ist jedoch dem Abbau durch DNasen unterworfen, die ebenfalls von den Mikroorganismen sekretiert werden. Dieser Abbau ist nicht vollständig, denn durch die Bindung an Matrixpartikel wird die DNA vor Spaltung geschützt (AARDEMA, et al., 1983; LORENZ und WACKERNAGEL, 1987; TREVORS, 1996). ROMANOWSKI et al. (1991) haben gezeigt, dass an Sand adsorbierte DNA eine 100-fach stärkere Resistenz gegenüber DNaseI aufweist als ungebundene. Ebenso unterbindet die Anlagerung an Tonminerale die Wirkung der Nukleasen (GORING und BARTHOLOMEW, 1952; GREAVES und WILSON, 1969). Die Adsorption selbst und die Stärke der Bindung ist von verschiedenen Faktoren wie pH-Wert, Ionenkonzentration und von der Länge des DNA-Fragments abhängig (LORENZ und WACKERNAGEL, 1987). Eine Desorption andererseits kann durch den Einsatz von Chelatbildnern wie EDTA erreicht werden (LORENZ und WACKERNAGEL, 1987).

Ein direkter Vergleich zwischen Zellextraktionsmethode und der Methode der direkten Lyse zeigte eine 10-fach höhere Ausbeute bei der direkten Lyse (STEFFAN et al., 1988). Jedoch kommt es bei einigen der beschriebenen Methoden zu einer starken Scherung der DNA, die z.B. durch die Behandlung mit einem „Bead-Beater“ verursacht wird (OGRAM et al., 1987). Die Fragmente weisen dann lediglich eine Größe von 5 -10 kBp auf und sind somit für Klonierungsarbeiten nur bedingt geeignet. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode von ZHOU et al. (1996) tritt diese starke Fragmentierung nicht auf. Man erhält große Mengen (15 bis 28 µg/g Probe; s. Tab. 6) hochmolekularer DNA (> 23 kBp; s. Abb. 8). Die Methode beruht auf der Lyse mit einem Hochsalz-Extraktionspuffer (1,5 M NaCl) in Gegenwart von EDTA und Proteinase K sowie der Detergenzien SDS und CTAB. Das kationische Detergenz CTAB bewirkt bei NaCl-Konzentrationen über 0,6 M eine Komplexierung von Zellwandbestandteilen, denaturierten Proteinen und Polysacchariden (MÜLLER und BRUCHHAUS, 1997) und führt zusammen mit Proteinase K zur Deproteinisierung des DNA-Rohextraktes. Die Effizienz der DNA-Extraktion hängt im Wesentlichen vom Probentyp ab. Dies wurde auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlicht. Die DNA-Ausbeute bei den Sedimenten aus dem Solar Lake und dem Golf von Eilat sind

um ca. 40 % geringer als bei den beiden anderen Boden- und Sedimentproben (s. Tab. 6). Ein wesentlicher Unterschied, der die Effizienz der Zelllyse bei diesen Proben signifikant beeinflusst, ist die relativ hohe Salzkonzentration, entscheidend ist natürlich ebenso die vorhandene Zelldichte. Die Anzahl der in den Sedimenten angesiedelten Mikroorganismen ist different, und diese zeigen sich unterschiedlich empfindlich gegenüber dem eingesetzten Lyseverfahren. Die hier beschriebenen Verfahren führen hauptsächlich zur Extraktion prokaryotischer DNA, eukaryotische Zellen werden durch die verwendeten Lysemethoden nur wenig effizient aufgeschlossen. Bei der Fraktionierungsmethode ist der Anteil der eukaryotischen DNA vergleichsweise noch geringer, da bei der Zellabtrennung durch niedertourige Zentrifugation beispielsweise die schweren Eukaryoten zusammen mit der Probenmatrix sedimentiert werden (HOLBEN, 1996).

Ein Nachteil der direkten Lyse gegenüber der Zellextraktion ist die besonders bei Bodenproben einhergehende Kopräzipitation von Humin- und Fulvinsäuren (OGRAM et al., 1987; TSAI und OLSON, 1991; ZHOU et al., 1996; HENNE et al., 1999). Je nach Bodentyp können bis zu mehreren Mikrogramm huminer Substanzen pro Mikroliter DNA-Extrakt erhalten werden (TEBBE und VAHJEN, 1993). Die Huminsäuren inhibieren Restriktionsendonukleasen, Polymerasen und Ligasen und sind für eine Herabsetzung der Effizienz bei DNA-DNA-Hybridisierungen und Transformationen verantwortlich (TEBBE und VAHJEN, 1993). Für Klonierungsarbeiten ist die Abtrennung dieser inhibitorisch wirkenden Substanzen unumgänglich. Sie kann durch die unterschiedlichsten Methoden erreicht werden. So wird von ORGAM et al. (1987) und BRUCE et al. (1992) die Durchführung einer CsCl-Gradientenzentrifugation und/oder einer Hydroxyapatit-Chromatographie favorisiert. Diese Methoden sind jedoch sehr zeitaufwendig und führen oft zu hohen DNA-Verlusten. Eine andere Möglichkeit ist die Zugabe von Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP; STEFFAN et al., 1988; BERTHELET et al., 1996) und/oder die Reinigung der DNA über verschiedene Säulenmaterialien wie Sephadex G-200 und Sepharose 4B (TSAI und OLSON, 1992; JACKSON et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden die Verunreinigungen mit Hilfe von Silicagel-Säulen und einer nachfolgenden Anionenaustauschchromatographie weitgehend abgetrennt (HENNE et al., 1999 und 2000). Die so erhaltene hochmolekulare DNA konnte mit verschiedenen Restriktionsenzymen (z.B. *Bsp*143I oder *Bam*HI) verdaut (s. Abb. 8) und in

Ligationsreaktionen eingesetzt werden. Jedoch ist auch diese Methode mit einem DNA-Verlust von ca. 20 bis 30 % verbunden (ZHOU et al., 1996).
Keine der vorgestellten Methoden zur DNA-Extraktion ist für alle Arten von Proben geeignet. Es empfiehlt sich daher, bei der Isolierung von DNA aus neuen Standorten mehrere Protokolle parallel auf ihre Effizienz hin zu testen.

4.1.2 Klonierung der Umwelt-DNA

In den vergangenen Jahren wurde die aus Umweltproben isolierte, genomische DNA überwiegend zur Analyse der Diversität der Mikroorganismen ausgewählter Habitate genutzt. Die Fortschritte in der PCR-Technik und der DNA-Sequenzierung in großem Maßstab ermöglichten eine Detektion und Identifizierung von Bakterien und Archeaen in ihrer natürlichen Umgebung ohne eine vorherige Anreicherung und Vereinzelung (OLSEN et al., 1986; PACE et al., 1986). Im Rahmen einer Vielzahl von Untersuchungen wurden die für die 16S rRNA kodierenden Gene mittels PCR amplifiziert und anschließend kloniert oder direkt in Analyseverfahren wie die Restriktionsanalyse, die denaturierende Gradientengel-Elektrophorese (DGGE) oder die DNA-Sequenzierung eingesetzt (WARD et al., 1990; GIOVANNONI et al., 1990; MUYZER et al., 1993; FERRIS et al., 1996; TESKE et al., 1998). Auf diese Weise wurden phylogenetische Profile für unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaften erstellt, die deutlich zeigten, dass die bisher isolierten und kultivierten Organismen nicht annähernd die tatsächliche Diversität der Bakterien und Archeaen widerspiegeln. Die Analyse von rRNA-Genen allein ist jedoch nicht ausreichend zur Charakterisierung der Diversität von Mikroorganismen, geben sie doch keinerlei Hinweise auf ihre metabolischen und physiologischen Eigenschaften. Ebenfalls über den Zwischenschritt der PCR-Amplifikation führten eine Reihe von weiteren Forschungsarbeiten, bei denen mit speziellen, aus konservierten Genregionen abgeleiteten Oligonukleotiden Gene oder Genfragmente aus gut charakterisierten Enzymklassen amplifiziert wurden. ROSADO et al. (1998) untersuchten mit dieser Technik die Sequenz-Heterogenität von *nifH*-Genen in verschiedenen Bodenproben. Mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide konnten verschiedene *nifH*-Gene amplifiziert werden, die anschließend kloniert und sequenziert wurden. Eine ähnliche Vorgehensweise benutzten SEOW et al. (1997) zur Analyse von Genen für Typ II Polyketid-Synthasen aus Bodenproben. Zur Konstruktion von

Oligonukleotiden wurden Konsensus-Sequenzen genutzt, die die KS_{β}-Gene in bekannten Synthasen flankieren. BRUCE (1997) umging den Klonierungsschritt. Zur Erstellung eines Profils von *mer*-(mercury-resistence)-Genen in einem Quecksilber-verseuchten und in einem unverseuchten Habitat wurden ebenfalls auf Konsensus-Sequenzen beruhende Oligonukleotide benutzt, die von Sequenzen Archaea-typischer *mer*-Operons abgeleitet wurden. Nachteil dieser auf der PCR basierenden Methodik ist, dass nur bekannte oder zu bekannten Genen homologe Gene gefunden werden können, da die verwendeten Oligonukleotide auf konservierten Sequenzbereichen von Genen bereits untersuchter Enzymklassen beruhen. Eine neue Variante stellte der von STOKES et al. (2001) publizierte Ansatz dar, bei dem nicht die Gene selbst das Ziel der PCR waren, sondern konservierte flankierende Elemente. Viele bakterielle Gene werden durch horizontalen Gentransfer verbreitet, daran beteiligt sind mobile genetische Elemente wie Plasmide, Transposons oder Integrons. Die konservierten Bereiche in Integrons wurden in diesem Ansatz genutzt um Oligonukleotide zu konstruieren und mittels PCR ganze Gen-Kassetten zu amplifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen ein weitergehenden Ansatz verfolgt. Die aus den angereicherten Umweltproben isolierte genomische DNA wurde dazu genutzt um komplexe Metagenombanken zu konstruieren. Zu diesem Zweck wurden die gereinigten Nukleinsäuren mit dem Restriktionsenzym *Bsp*143I partiell verdaut, in den Expressionsvektor pBluescript SK^+ kloniert und in *E. coli* transformiert. Auf diese Weise wurden vier Genbanken mit 37300 bis 71050 rekombinanten Plasmiden erhalten, die durchschnittliche Insertgrößen zwischen 3,3 und 5,6 kBp aufwiesen (s. Tab. 28). Insgesamt entsprach dies mehr als 1 GBp klonierter Umwelt-DNA. Legt man für die Größe eines Gens durchschnittlich 1,0 kBp zugrunde, handelt es sich um mehr als 1 Million Gene. Eine solche direkte Klonierung der aus Umweltproben isolierten DNA führt zu Genbanken, die auch Sequenzen völlig unbekannter Gene enthalten. Außerdem sind einmal erstellte Genbanken universell einsetzbar. Für einige zuvor in unserer Arbeitsgruppe konstruierte Genbanken aus verschiedenen Bodenproben waren ähnliche Eigenschaften bestimmt worden. Die durchschnittliche Größe der inserierten DNA-Fragmente lag bei 3,3 bis 7,1 kBp und die Anzahl der erhaltenen Klone zwischen 50000 und 200000 (HENNE, 2001). Diese Genbanken waren erfolgreich zur Identifizierung von neuartigen Genen für 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen, Lipasen/Esterasen und $Na^+(Li^+)/H^+$-Antiportern genutzt worden (HENNE et al., 1999 und 2000; MAJERNIK et al., 2001). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Enzyme zeigten keine oder nur

sehr geringe Homologien zu den in den Datenbanken vorhandenen Sequenzen funktionell ähnlicher Proteine. Lediglich eine der gefundenen 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen wies eine deutliche Übereinstimmungen (76,7 %) zu der bekannten 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus *Ralstonia eutropha* auf (HENNE et al., 1999). Diese Ergebnisse bestätigten, dass die konstruierten Genbanken Gene einer großen Vielfalt von Mikroorganismen beinhalteten, die bis dahin noch nicht untersucht oder kultiviert wurden. Die Arbeit von WILKINSON et al. (2002) befasste sich ebenfalls mit der Konstruktion von Plasmidgenbanken aus Umweltproben. Alternativ wurde die aus geothermalen Sedimenten aus Island extrahierte DNA mechanisch geschert und nach einer anschließenden enzymatischen Modifikation der Fragmentenden mittels TA-Klonierung in den Vektor pCR-XL-TOPO inseriert. Vergleichbar mit der von uns verwendeten Methode wurde eine Genbank mit 37000 Klonen und ca. 5,0 kBp durchschnittlicher Insertgröße erhalten (s. Tab. 28). Ein wichtiger Vorteil bei der Nutzung von Plasmiden wie z.B. pBluescript SK^+ oder pCR-XL-TOPO zur Konstruktion von Genbanken ist die hohe Kopienzahl. Diese erlaubt auch die Detektion von schwach exprimierten Genen bei Screeningstrategien, die auf der biologischen Aktivität der Proteine beruhen. Denn zumeist ist die heterologe Expression von der Aktivität der nativen Promotoren abhängig. Ein Nachteil der Plasmide ist, dass nur relativ kleine DNA-Fragmente kloniert werden können. Die ermittelten durchschnittlichen Insertgrößen in den bisher publizierten Arbeiten lagen unter 8 kBp (s. Tab. 28). Dies bedeutet, dass eine sehr große Anzahl von rekombinanten Klonen auf die gewünschte Aktivität hin untersucht werden muß. Außerdem ist die Klonierung von größeren Genclustern in Plasmiden nicht möglich. Ebenso besteht die Gefahr, dass viele Gene nur unvollständig kloniert werden.

Eine Alternative ist daher die Klonierung von Umwelt-DNA in Cosmide, Fosmide und BAC (bacterial artificial chromosome)-Vektoren. STEIN et al. (1996) isolierten DNA aus marinem Pikoplankton, das aus 30 l Meerwasser aufkonzentriert wurde. Die gewonnenen Nukleinsäuren wurden partiell verdaut und in den Fosmidvektor pFOS1 ligiert. Die so erstellte Genbank mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 40 kBp (s. Tab. 28) wurde auf das Vorhandensein von archaeller (STEIN et al., 1996) und *Planctomycetales*-spezifischer DNA (VERGIN et al., 1998) durchsucht. Ein wesentlicher Unterschied zu der in dieser Arbeit verwendeten Methode besteht darin, dass die DNA aus angereicherten Zellen und nicht aus komplexen Sediment- oder Bodenproben isoliert wurde. Jedoch genau dies bringt erhebliche Schwierigkeiten mit

sich, die hauptsächlich auf die unter 4.1.1 beschriebene Kopräzipitation von Humin- und Fulvinsäuren zurückzuführen ist. Die Verunreinigungen können zwar weitgehend entfernt werden, so dass ein Restriktionsverdau vollständig möglich ist, die Effizienz bei Ligationsreaktionen ist jedoch häufig herabgesetzt gegenüber Ligationen mit DNA aus Reinkulturen.

Tabelle 28: Durchschnittliche Insertgrößen von in Plasmiden, Cosmiden oder BACs erstellten Metagenombanken

DNA-Quelle	Vektorart	Durchschnittliche Insertgröße [kBp]	Referenz
Anreicherungkulturen	Plasmid	3,0 bis 5,4	diese Arbeit
Boden	Plasmid	6 bis 8	HENNE et al., 1999
Boden	Plasmid	3,3 bis 7,1	HENNE et al., 2000
Süßwassersediment	Plasmid	5	WILKINSON et al., 2002
Salzwassersediment	Cosmid	23 und 25	KNIETSCH, 1999
Anreicherungkulturen	Cosmid	30 bis 40	ENTCHEVA et al., 2001
Pikoplankton	Fosmid	40	STEIN et al., 1996
Pikoplankton	BAC	80	BÉJÀ et al., 2000
Boden	BAC	27 und 44,5	RONDON et al., 2000

Die ersten Veröffentlichungen, die die Nutzung von BAC-Vektoren zur Klonierung von Genomfragmenten umfangreicher mikrobieller Gemeinschaften in *E. coli* beschrieben, stammen von BÉJÀ et al. (2000) und RONDON et al. (2000). BACs sind modifizierte Plasmide mit einem Replikationsursprung, der vom *E. coli* F-Faktor abgeleitet ist. Sie sind in der Lage, DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 600 kBp aufzunehmen und stabil in *E. coli* zu erhalten (ZIMMER und GIBBINS, 1997). Ähnlich wie bei STEIN et al. (1996) wurden hier Mikroorganismen aus Oberflächenwasser der Kalifornischen Küste angereichert und die enthaltene DNA isoliert. RONDON et al. (2000) dagegen verwendeten eine Bodenprobe aus Madison (Wisconsin, USA) als Ausgangsmaterial. Die erhaltenen Genbanken enthielten zwischen 3648 und 24576 rekombinanter *E. coli*-Klone mit inserierten DNA-Fragmenten in einem Größenbereich von 18 bis 155 kBp. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass auch große Gencluster isoliert und untersucht werden können. Eine auf der Expression der klonierten Gene basierende

Durchmusterung dieser Genbanken ist jedoch aufgrund der geringen Kopienzahl im Wirt *E. coli* (1 bis 2 Kopien pro Zelle) nur erschwert möglich.
Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Auswahl eines geeigneten Vektorsystems für die Herstellung von Metagenombanken im Wesentlichen abhängig von der anschließend vorgesehenen Anwendung ist. Wird eine Durchmusterung vorgenommen, die auf der Expression einzelner Gene abzielt, so sind Plasmidgenbanken aufgrund der hohen Kopienzahl von Vorteil. Ist man jedoch daran interessiert durch Sequenzierung großer DNA-Abschnitte mehr über die genetische Organisation und die metabolischen Zusammenhänge in einer mikrobiellen Gemeinschaft zu erfahren, empfiehlt sich die Konstruktion von Cosmid- oder BAC-Genbanken.
Die Gesamtgröße bisher veröffentlichter Genbanken variiert stark. Wie gut eine solche Genbank die Diversität einer Probe reflektiert, ist schwer zu bestimmen, denn trotz der enormen Fortschritte in der genetischen Analyse von Umweltproben ist die genaue mikrobielle Zusammensetzung eines Standorts bisher nicht determinierbar. Schätzungen gehen von ca. 5000 verschiedenen Spezies je Gramm einer Bodenprobe aus (TORSVIK et al., 1990). Bei einer durchschnittlichen Genomgröße von 4 MBp wären etwa 1 Million BAC-Klone mit eine Größe von jeweils 100 kBp notwendig, um eine 4-fache Redundanz dieses Mikrohabitats zu erreichen (SCHLEPER und ECK, 2000).

4.2 Aktivitäts- und Sequenz-basierende Durchmusterungs-verfahren

Zur Identifikation von neuen Genen und Genprodukten in Metagenomgenbanken sind zwei prinzipiell unterschiedliche Strategien möglich (s. Abb. 38). Die erste beruht auf der Ausnutzung von Sequenzähnlichkeiten oder konservierten Sequenzmotiven durch Hybridisierungsexperimente mit den entsprechenden Sonden oder durch PCR-Amplifikation der Zielgene. Dem gegenüber stehen Aktivtäts-basierende Screeningverfahren, die zumeist in Form von einfachen Plattentests durchgeführt werden können (s. Abb. 38 und Tab. 29). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden beide Möglichkeiten zur Identifizierung von neuen Genen für Coenzym B_{12}-abhängige Glycerin- und Diol-Dehydratasen genutzt. Zur Isolierung von Klonen, die Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität vermitteln, wurde ausschließlich ein auf Enzymaktivität basierendes Verfahren genutzt.

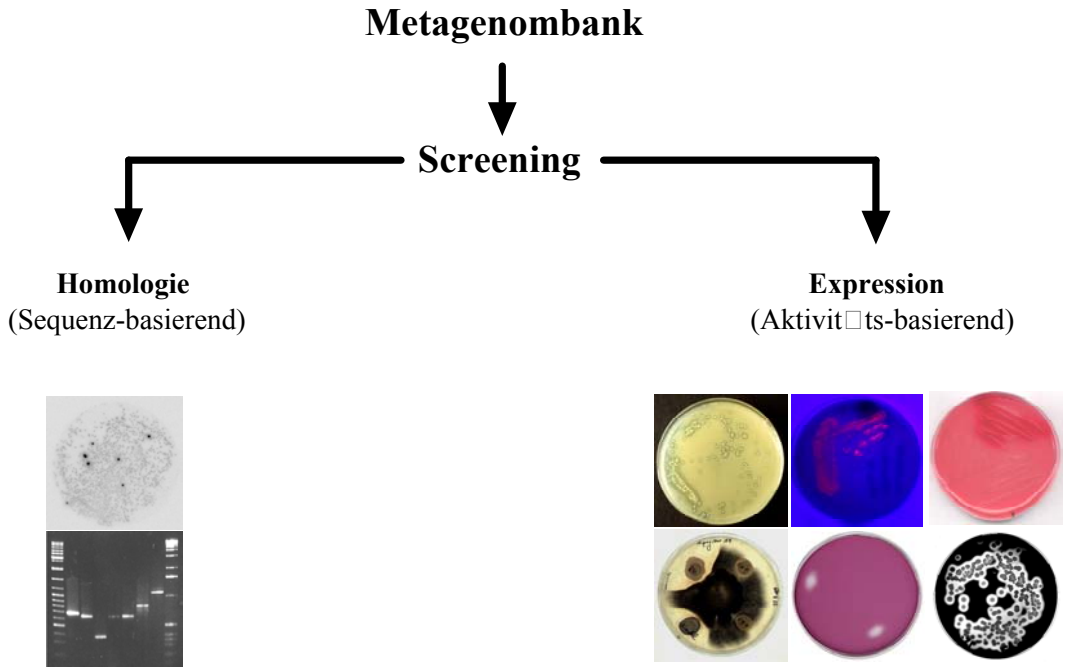


Abbildung 38: Strategien zur effizienten Durchmusterung von komplexen Metagenombanken

Der zuerst gewählte, auf Enzymaktivität basierende Ansatz zur Auffindung neuer Dehydratasen beinhaltete die Transformation der Plasmide der Metagenombanken in den speziell konstruierten Screening-Stamm *E. coli* ECL707/pAK1. Der verwendete Stamm trägt die Gene für die Glycerin-Dehydrogenase, die Dihydroxyaceton-Kinase und die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase auf dem Plasmid pAK1 (s. Abb. 13). Somit war er in der Lage, unter aeroben Bedingungen mit Glycerin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (KNIETSCH, 1999). Für das anaerobe Wachstum jedoch benötigte er ein Kosubstrat wie Na-Pyruvat als externen Akzeptor von Reduktionsäquivalenten oder mußte durch eine Glycerin- oder Diol-Dehydratase komplementiert werden. Die auf diese Weise identifizierten Klone wurden anschließend unter selektiven Bedingungen (anaerobes Millieu, Glycerin oder 1,2-Propandiol als Kohlenstoffquellen) auf das Vorhandensein der gewünschten Enzymaktivität untersucht. Die Komplementation eines solchen unter den gewählten Bedingungen Wachstums-defekten Stammes ist ein besonders vielversprechender, methodischer Ansatz. So führte z.B. die Komplementation der Na^+/H^+-Antiporter-negativen Mutante *E. coli* KNabc (NOZAKI et al., 1996) durch Umweltgenbanken zur Isolierung von neuartigen Genen, die für integrale Membranproteine kodierten (MAJERNIK et al.,

2001; s. Tab. 29). Ein solches Verfahren ist hoch selektiv für den gewünschten Phänotyp und es lassen sich auch bisher nicht bekannte Enzymaktivitäten oder -spezifitäten und Stoffwechselwege identifizieren.

Das für die Selektion der komplementierten *E. coli*-Stämme ausgewählte M9-Mineralmedium (s. 2.2.4) wurde leicht modifiziert, um auch die Detektion von Enzymen mit anderen Kofaktor-Bedürfnissen zu ermöglichen. Ein Hinweis auf die Existenz solcher Enzyme gibt die Identifizierung einer Coenzym B_{12}-unabhängigen Diol-Dehydratase aus *Clostridium glycolicum*, die in der Lage ist 1,2-Ethandiol und 1,2-Propandiol zu den korrespondierenden Aldehyden umzuwandeln (HARTMANIS und STADTMAN, 1986 und 1987). Das Enzym ist jedoch extrem O_2-empfindlich und benötigt die Zugabe von Reduktionsmitteln für maximale Aktivität. Aufgrund von durchgeführten EPR-Messungen und der Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Radikalfängern wie Hydroxyharnstoff wird ein bisher nicht identifiziertes Radikal im aktiven Zentrum vermutet (HARTMANIS und STADTMAN, 1987). Erst kürzlich konnte in *Clostridium butyricum* VPI1718 eine ebenfalls Coenzym B_{12}-unabhängige Glycerin-Dehydratase identifiziert werden. Das ebenfalls extrem O_2-empfindliche Enzym besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten und weist somit deutliche Differenzen zu den bekannten B_{12}-abhängigen Dehydratasen auf (MEYNIAL-SALLE, 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde zunächst einmal der Eisengehalt des Mediums erhöht, da dies zur Stabilisierung von Radikalen führt, die sehr wahrscheinlich auch bei der nicht Coenzym B_{12}-vermittelten Dehydratisierung von Glycerin und 1,2-Propandiol beteiligt sind. Außerdem wurden geringe Mengen verschiedender Vitamine (s. 2.2.9) und Spurenelemente (s. 2.2.7) zugesetzt. In vorangegangenen Untersuchungen war außerdem in einigen Ansätzen S-Adenosylmethionin als möglicher alternativer Kofaktor für neue Typen von Glycerin- und Diol-Dehydratasen dem Medium zugesetzt worden (KNIETSCH, 1999). S-Adenosylmethionin ist der Kofaktor der clostridialen Lysin-2,3-Aminomutasen (FREY, 1993; FREY et al., 1998), die die Interkonversion von Lysin und β-Lysin katalysieren. Dabei kommt es zu einem formal ähnlichen, radikalischen Reaktionsverlauf wie bei den Coenzym B_{12}-abhängigen Enzymen. Ein inaktiviertes Wasserstoff-Atom, das gebunden an das C3-Atom des Lysin vorliegt, tauscht dabei den Platz mit einer Aminogruppe am C2-Atom. Adenosylcobalamin und S-Adenosylmethionin sind in ihrem Aufbau sehr unterschiedliche Moleküle, besitzen jedoch beide einen 5´-Desoxyadenosyl-Anteil und durch EPR-Spektren wurde nachgewiesen, dass an der Aminomutase-Reaktion ebenfalls ein Substrat-Radikal

beteiligt ist (FREY, 1993). Vermutlich dienen also beide Moleküle in der Natur als Quellen für die sehr reaktiven 5´-Desoxyadenosylradikale (FREY et al., 1998). Leider war der gewählte Ansatz zur Identifizierung Coenzym B_{12}-unabhängiger Glycerin- und Diol-Dehydratasen nicht erfolgreich (KNIETSCH, 1999).

Weitere Möglichkeiten zur Aktivitäts-vermittelten Durchmusterung von Metagenombanken bieten Plattentests, bei denen der Abbau eines bestimmten Substrats direkt beobachtet werden kann. Zur Identifizierung von Enzymen mit lipolytischer Aktivität wurden von HENNE et al. (2000) LB-Tributyrin-Agarplatten eingesetzt (s. Tab. 29). War der rekombinante *E. coli*-Stamm in der Lage, das angebotene Substrat zu spalten, kam es zu einer Aufklarung des trüb-milchigen Agars rund um die wachsende Kolonie. Auch der Einsatz ungiftiger Farbstoffe oder unlöslicher bzw. chromatophortragender Derivate von Enzymsubstraten in Agarnährmedien ermöglicht eine leichte Detektion gewünschter metabolischer Fähigkeiten. Ein Beispiel für diese Vorgehensweise war die Verwendung des fluorogenen Chitin-Analogons 4-Methylumbelliferyl-β-D-N,N´-Diacetylchitobiosid zur Identifzierung von *E. coli*-Klonen, die Gene für Chitinasen tragen und exprimieren (COTTRELL et al., 1999; s. Tab. 29). Zur Identifizierung von neuartigen 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen wurden erfolgreich Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC)-Indikatorplatten eingesetzt (HENNE et al., 1999; s. Tab. 29). Die Oxidation des farblosen und wasserlöslichen Testsubstrats 4-Hydroxybutyrat führte zur Reduktion des Tetrazoliums. Dabei entstand die reduzierte Form, das wasserunlösliche, rote Formanzan, das in den Zellen präzipitierte. Auf einem ähnlichen Prinzip beruhte der Plattentest, der in der vorliegenden Arbeit zur Detektion von Genen genutzt wurde, die eine Alkohol-Oxidoredukase-Aktivität in *E. coli* vermittelten. Der im Testagar vorhandene Farbstoff Pararosanilin bildete mit dem ebenfalls zugefügten Natriumbisulfit ($Na_2S_2O_5$) ein farbloses Schiff´sches Reagenz. Bei der Oxidation der verwendeten Testsubstrate (1,2-Ethandiol, 2,3-Butandiol, 1,2-Propandiol oder Glycerin) entstanden Carbonylverbindungen, die mit dem Schiff´schen Reagenz ein rotgefärbtes Kondensationsprodukt, ein Azomethin bildeten (CONWAY et al., 1987). Daher waren die Kolonien von positiven Klonen aufgrund ihrer Rotfärbung und der Ausbildung eines roten Hofes leicht zu identifizieren (s. Abb. 29). Um während der Durchmusterung der Metagenombanken eine starke Hintergrundfärbung der Agars durch die Glycerin-Dehydrogenase-Aktivität von *E. coli* zu verhindern, wurde die Glycerin-negative *E. coli*-Mutante ECL707 (SPRENGER et al., 1989) als Wirtsstamm verwendet. Eine

wichtige Einschränkung ist bei der Betrachtung der Ergebnisse solcher Plattentestverfahren jedoch zum machen. In den meisten Fällen ist nur die Bildung eines bestimmten Produkts zu beobachten. Auf welchem Wege diese Produktbildung zustande kommt, ist zunächst nicht festzustellen. Möglich sind dabei auch Substrat-Umsetzungen, die auf indirektem Wege zustande kommen. Ein deutliches Indiz dafür ist die in *E. coli*/pAK102 aufgetretene Carbonylbildung durch die wahrscheinlich kombinierte Aktivität einer auf dem Plasmid kodierten Glycerin-Kinase (GlpK) und der wirtseigenen Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase. Ein ähnliches Zusammenwirken von eingebrachter Umwelt-DNA und dem Wirtsmetabolismus wären auch für andere positive Klone denkbar. Neben den Plattentestverfahren werden heute auch robotergestützte, „high-throughput"-Verfahren zur Durchmusterung von Metagenombanken entwickelt. Aufgrund der hohen Kosten ist der Einsatz solcher Verfahren bisher auf Metagenombanken beschränkt bei denen eine hohen Anzahl von Klonen mit den gewünschten Eigenschaften erwartet werden kann (DANIEL et al., 2002).

Tabelle 29: Übersicht über die Ergebnisse bisher publizierter Akivitäts-basierender Durchmusterungen von komplexen Metagenom-banken

DNA-Quelle	Zielgen	Anzahl positiver Klone	Referenz
Anreicherung	Cellulase	11	HEALY et al., 1995
	β-Galactosidase	1	
Boden	Hydroxybutyrat-DH	5	HENNE et al., 1999
Boden	Esterase/Lipase	4	HENNE et al., 2000
Boden	Na^+/H^+-Antiporter	2	MAJERNIK et al., 2001
Sediment	Amylase	3	WILKINSON et al., 2002
Pikoplankton	Chitinase	9	COTTRELL et al., 1999
Boden	Protease	3	SANTOSA, 2001
Anreicherung	Biotin-Synthese	7	ENTCHEVA et al., 2001
Boden	Antibakteriell	2	BRADY et al., 2001
Boden	Antibakteriell	2	RONDON et al., 2000
	DNase	1	
	Lipase	2	
	Amylase	8	
	Hemolytisch	29	

Zur Erhöhung der Trefferanzahl bei der Durchmusterung von Metagenombanken ist die Nutzung von Probenmaterial sinnvoll, das eine natürliche oder im Labor erzeugte Anreicherung der Organismen mit den gewünschten Eigenschaften durchlaufen hat. Zur Detektion von thermostabilen Enzymen wie Lipasen oder Proteasen, die in der Waschmittelindustrie eingesetzt werden, eignen sich daher besonders Proben als Ausgangsmaterial, die aus heißen Quellen entnommen wurden (VIEILLE und ZEIKUS, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Genbanken dagegen stammten aus den Sedimentproben des Solar Lake (SLA), des Golf von Eilat (GEA) und des Flusses Grone (GIIA) sowie der Probe eines Zuckerrübenfeldes (ZRA), in denen vor der DNA-Isolierung eine künstliche Anreicherung durchgeführt wurde (s. 3.1). Nach einer kurzen Inkubationsphase mit den C-Quellen Glycerin und 1,2-Propandiol, zwei möglichen Substraten der gesuchten Dehydratasen und Alkohol-Oxidoreduktasen, wurde die DNA aus den Proben isoliert und verarbeitet. Mit dem verwendeten Durchmusterungsverfahren konnten in diesen Genbanken 16 Plasmide (pAK101-116) identifiziert werden, die in *E. coli* Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität vermittelten. Dies entsprach einem positiven Klon je 75000 untersuchter Kolonien. Parallel dazu wurden Genbanken aus natürlichen Habitaten mit Hilfe der gleichen Methode durchsucht. Die Trefferquote war hier deutlich geringer. Die isolierten 15 Plasmide (pAK201-215) entsprachen einem Verhältnis von ca. 1:200000 (s. 3.2.2). Das verdeutlichte, dass die gewählte Kombination aus Anreicherung und direkter DNA-Isolierung eine Erhöhung der Trefferquote bei der Durchmusterung von Metagenombanken zur Folge hatte und somit eine nützliche Vorgehensweise zur Identifizierung einer großen Anzahl von Zielgenen ist. Allerdings ging der Anreicherungsschritt auch deutlich zu Lasten der erhaltenen Diversität in den Genen und Genprodukten. Die Mehrheit der vorhergesagten, von den Plasmiden pAK101-116 kodierten Proteine zeigten hohe Übereinstimmungen zu bekannten Proteinen mit vorwiegend enterobakterieller Herkunft. Die Genprodukte, die aus den auf den Plasmiden pAK201-215 lokalisierten Genen abgeleitet wurden, zeigten dagegen nur geringe oder gar keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen und stammten aus einer sehr viel breiteren Vielfalt an Mikroorganismen.

Die vorgestellten Screeningstrategien ermöglichen die Überprüfung einer sehr großen Anzahl von Klonen aus komplexen Metagenombanken mit relativ einfachen Methoden. Außerdem ermöglichen sie die Entdeckung von bisher völlig unbekannten, strukturell neuartigen Proteinen und Biokatalysatoren. Das Aktivitäts-basierende Screening hat

jedoch auch seine Grenzen, da für die Expression zumeist der native Promotor notwendig ist und dieser vom Wirtsstamm erkannt werden muß. In allen bisher publizierten Arbeiten auf diesem Gebiet wurde *E. coli* als Wirtsstamm eingesetzt. Ein wichtiger Vorteil ist, dass für diesen Organismus eine Vielzahl von Methoden und Werkzeugen auf molekularbiologischer und proteinchemischer Ebene bereits etabliert sind. Der Stamm wird deshalb häufig für industrielle Produktionsprozesse und Biofermentationen eingesetzt. Auf der Basis von Aktivitäts-abhängigen Durchmusterungsverfahren konnten unter anderem Gene, die für Amylasen, Lipasen oder Chitinasen kodierten, identifiziert werden (s. Tab. 29). Die Sequenzanalyse ergab, dass nahezu alle für neue Genprodukte kodierten, die oft nur geringe oder gar keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen mit gleicher Funktion aufwiesen.

Anders sieht dies bei Durchmusterungsverfahren aus, die auf Sequenzähnlichkeiten oder konservierten Genabschnitten beruhen. Die Mehrzahl der bis jetzt publizierten Sequenz-abhängigen Methoden dienten zur Isolierung von rRNA-Genen und somit zur phylogenetischen Charakterisierung der untersuchten Habitate (STEIN et al., 1996; VERGIN et al., 1998; BÉJÀ et al., 2000). Im Vergleich zu der üblichen Vorgehensweise, die 16S- oder 23S-rDNA direkt aus der isolierten Umwelt-DNA zu amplifizieren, ermöglicht die Verwendung von komplexen Genbanken auch eine Sequenzierung und Analyse der Gene in der Umgebung der rRNA-Gene. Man erhält so einen Zugang zu den metabolischen Eigenschaften des identifizierten Organismus. Des Weiteren können durch die sogenannte „random“-Sequenzierung von Metagenombanken wertvolle Hinweise auf die genetische Organisation, die Kodonverteilung und die Stoffwechselmöglichkeiten von unkultivierten Mikroorganismen erhalten werden. Durch die Sequenzierung der Insertenden von BAC-Genbanken und eine anschließende Ordnung der enthaltenen Genomfragmente konnten schon zusammenhängende Segmente von mehr als 200 kBp für bestimmte phylogenetische Gruppen gefunden werden (BÉJÀ et al., 2000), die u.a. Gene für den Zellstoffwechsel und für bisher unbekannte Enzyme enthielten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls auf Sequenzähnlichkeiten basierende Durchmusterungsverfahren zur Identifikation von biotechnologisch-relevanten Enzymen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden aus in allen bekannten Glycerin- und Diol-Dehydratasen konservierten Regionen degenerierte Oligonukleotide abgeleitet und dazu genutzt, die Genbanken auf das Vorhandensein dieser Gene hin zu überprüfen (s. Abb. 14). Dabei konnte die erwartete ca. 1,0 kBp-große Dehydratase-spezifische

Genregion in allen getesteten Genbanken amplifiziert werden. Anschließend wurden die amplifizierten Sequenzen als Sonden in Koloniehybridisierungsexperimente zur Durchmusterung der Metagenombanken eingesetzt. Alle auf diese Weise detektierten Dehydratase-Gene und die daraus abgeleiteten Genprodukte wiesen wie erwartet hohe Übereinstimmungen mit den schon bekannten Enzymen dieser Klasse auf. Einige der identifizierten Plasmide enthielten aber nur unvollständig klonierte Genbereiche. Dies erklärte auch, warum die entsprechenden Klone in dem Aktivitäts-basierenden Verfahren nicht gefunden wurden. Hierbei zeigten sich, wie bereist erwähnt, die Nachteile von Sequenz-abhängigen Durchmusterungen. Dazu gehört, dass keine völlig neuen Protein- und Enzymstrukturen gefunden werden können und außerdem die fehlende Selektivität für funktionelle Gene. Andererseits können auch geringe Variationen in Enzymen zu wesentlichen Veränderung in ihrer Aktivität und in ihrem Verhalten gegenüber Hemmstoffen führen. Dies ist beispielsweise der Fall wenn der Austausch von einzelnen Aminosäuren eine festere oder auch schlechtere Bindung des Substrats zur Folge hat oder eine Veränderung in der Struktur des Proteins bewirkt. In Mutageneseexperimenten mit der Chorisimat-Mutase aus *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, dass das in Position 90 befindliche Arginin absolut essentiell für die Aktivität des Enzyms ist. Der gezielte Austausch dieses Restes gegen die 20 anderen möglichen Aminosäuren führte in keinem Fall zu einem aktiven Protein (HILVERT et al., 2002). Dagegen konnte für das Cytochrom P450 aus *Pseudomonas putida* durch den Austausch einzelner Aminosäuren (Tyr96Ala- bzw. Tyr96Phe) eine verbesserte Styren-Bindung und –Oxidation sowie eine gesteigerte Kopplungseffizienz erreicht werden (CIRINO und ARNOLD, 2002).

Unabhängig von der ausgewählten Strategie hat die Durchmusterung von Metagenombanken Vorteile gegenüber der klassischen Anreicherung von Mikroorganismen bei der Identifizierung und Isolierung der gesuchten Produkte. Im Rahmen von traditionellen Screeningprogrammen tritt häufig (in fast 50 % der Fälle) das Phänomen der Refermentation auf (OSBURNE et al., 2000). Mikrobielle Kulturen, insbesondere aus Bodenproben angereicherte, zeigen bei der ersten Anzucht die gewünschten Eigenschaften, verlieren aber bei weiteren Anzuchten die Fähigkeit, diese Aktivität auszubilden oder zu wachsen. Diese Schwierigkeiten treten bei der Durchmusterung von Metagenombanken nur in wenigen Fällen auf. Außerdem liegt die DNA-Region, die für die gesuchte Eigenschaft kodiert, schon fertig kloniert vor. Dies ermöglicht eine schnelle Sequenzierung und Analyse der Gene.

4.3 Isolierung von RNA aus Umweltproben

In den Jahren 1983 bis 1994 basierten 39 % der neu zugelassenen Arzneimittel auf Naturstoffen, bei antibakteriellen und antitumoralen Medikamenten lag ihr Anteil sogar über 60 % (CRAGG et al., 1997). Die meisten dieser heute gebräuchlichen Anti-Infektiva wurden durch Kultivierung von Mikroorganismen gewonnen (HENTSCHEL et al., 2002). Dabei haben sich besonders niedere Pilze als reichhaltige Quellen für ökonomisch interessante Enzyme und biologisch-aktive Substanzen erwiesen. Dazu gehören verschiedene Antibiotika sowie Lipasen und Proteasen, die in der Waschmittelindustrie eingesetzt werden. In den bisher vorgestellten Ansätzen zur Erfassung und Nutzung der Metagenome natürlicher Habitate als Quelle für neue Enzyme und Wirkstoffe werden Gene und Genprodukte aus eukaryotischen Organismen wie Hefen und Pilze nicht erhalten. Auch wenn die konstruierten Umweltgenbanken teilweise klonierte DNA aus Eukaryoten aufweisen, so werden sie mit den verwendeten Screeningmethoden nicht detektiert. Wie zuvor beschrieben wird für die Durchmusterung der Genbanken hauptsächlich *E. coli* als Wirtsstamm genutzt. Das Bakterium ist jedoch nicht in der Lage eukaryotische Promotorstrukturen zu erkennen oder die gebildete mRNA zu prozessieren. Die überwiegende Mehrheit der Gene beinhaltet neben den Protein-kodierenden Sequenzen (Exons) eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen, sogenannte Introns. Das primäre RNA-Transkript enthält sowohl die Exons als auch die Introns und erst durch den Vorgang des Spleißen entsteht dann die verkürzte, für ein funktionelles Protein kodierende mRNA. *E. coli* und auch allen anderen Bakterienspezies besitzen den hierzu notwendigen Enzymapparat nicht.

Hier liegt das Potential der Isolierung von eukaryotischer mRNA aus Umwelthabitaten. Um das in Umweltproben vorhandene eukaryotische Potential für die Identifizierung von neuen Genen und Genprodukten nutzbar zu machen bietet die Isolierung von bereits prozessierter mRNA und die anschließende Erstellung von cDNA-Genbanken neue technische Möglichkeiten. Ein kritischer Punkt dabei ist die Isolierung von reiner und intakter RNA. Dies beinhaltet die effektive Lyse der Zellen in den Umweltproben, die Denaturierung von RNase-Aktivität und das Entfernen von kontaminierender DNA.

Die Analyse von mRNA um Strukturen und Aktivitäten von mikrobiellen Gemeinschaften zu untersuchen, wird noch nicht genutzt. Die meisten der bisher entwickelten Methoden zur RNA-Isolierung zielen wiederum auf phylogenetische

Studien ab (MORAN et al., 1993; FELSKE et al., 1996; DUARTE et al., 1998; MISKIN et al., 1999; GRIFFITH et al., 2000; HURT et al., 2001). Zur Lyse der Zellen werden analog zur DNA-Isolierung aus Umweltproben Methoden wie die alkalische Lyse, Behandlung mit Detergenzien, Hitzebehandlung, Ultraschall und „Bead beating“ in unterschiedlicher Art und Weise kombiniert. In einigen der publizierten Arbeiten werden mit den beschriebenen Methoden DNA und RNA koextrahiert (GIFFITH et al., 2000; HURT et al., 2001). Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz wurde in Anlehnung an die Methode zur DNA-Isolierung aus Umweltproben von ZHOU et al. (1996) entwickelt. Die wichtigsten Veränderungen im Vergleich dazu sind der auf 7,0 herabgesetzte pH-Wert des Hochsalzextraktionspuffers zur Stabilisierung der RNA und eine deutlich reduzierte Dauer der Hitzebehandlung (HURT et al., 2001). Die Trennung der koextrahierten DNA und RNA wurde mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen erreicht. Durch diese Vorgehensweise konnten zwischen 0,3 und 2,1 µg Gesamt-RNA pro g Probe (Nassgewicht) erhalten werden. Dies stimmte gut mit den von HURT et al. (2001) ermittelten Werten überein. Zur Selektion der eukaryotischen mRNA aus der isolierten Gesamt-RNA kann man sich die Tatsache zu Nutze machen, dass der Großteil dieser mRNA am 3´-Ende ein Poly(A)-Segment besitzt, das zwischen 50 und 150 Nukleotide lang ist. Die physiologische Rolle des Poly(A)-Schwanzes in der Translation ist nicht klar, in einigen Fällen wurden jedoch stabilisierende Effekte beobachtet (KOZAK, 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit der isolierten Gesamt-RNA eine Affinitätschromatographie an an Polystyren-Latex-Partikeln gebundenen dT-Oligomeren durchgeführt. Durch photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm konnten nur geringe Mengen mRNA nachgewiesen werden. Der Anteil der erhaltenen eukaryotischen Poly(A)-mRNA an der isolierten Gesamt-RNA-Menge war offensichtlich sehr klein und für den Einsatz in die cDNA-Synthese durch eine Reverse Transkriptase zu gering. Für weiterführende Arbeiten auf diesem Gebiet bedeutet das, dass zunächst die Lyseverfahren effizienter auf eukaryotische Zellen ausgerichtet werden müssen.

Für die dann mögliche Synthese von cDNA und die Herstellung von cDNA-Bibliotheken können kommerziell erhältliche Konstruktions-Kits genutzt werden, die eine gerichtete Klonierung in für *E. coli* geeignete Expressionsvektoren erlauben. Als Oligonukleotide für die cDNA-Synthese empfiehlt sich der Einsatz von Oligo(dT)-Oligonukleotiden, die an das Poly(A)-Ende der Transkripte binden können und von sogenannten „random“(Zufalls)-Hexameren.

4.4 Identifizierung und Charakterisierung von Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus Metagenombanken

Zur Identifizierung von neuen Glycerin- und Diol-Dehydratasen für einen möglichen Einsatz in der biotechnologischen Produktion von 1,3-Propandiol wurden sowohl Aktivitäts- als auch Sequenz-abhängige Durchmusterungsverfahren genutzt, die bereits in den vorangegangenen Kapitel diskutiert wurden. Insgesamt konnten auf diese Weise in den vier Anreicherungsgenbanken ZRA, GEA, SLA und GIIA sieben verschiedene Plasmide detektiert werden, die Gene für Glycerin- und Diol-Dehydratasen trugen (s. 3.3). Es wurde sowohl eine molekulare Analyse der klonierten Gene als auch eine biochemische Charakterisierung der korrespondierenden Genprodukte durchgeführt.
Schon nach den ersten Sequenzierungsschritten wurde deutlich, dass die auf den Plasmiden pAK6 und pAK8 kodierten Gene eine 100 %ige Übereinstimmung mit den Genen aus *C. freundii* aufwiesen. Beide Plasmide wurden daher in den weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt. Die Analyse der Sequenzdaten der in den Plasmiden pAK2-5 und pAK7 klonierten DNA-Abschnitte zeigte, dass die dort lokalisierten Glycerin- bzw. Diol-Dehydratase-Gene starke Ähnlichkeiten (77 bis 98 %) zu den entsprechenden Genen der Enterobakterien *C. freundii* bzw. *S. typhimurium* aufwiesen. In Abbildung 39 ist die verwandtschaftliche Beziehungen der abgeleiteten Proteinsequenzen für die Dehydratase-Untereinheiten zu denen der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* (DhaBCE) und der Diol-Dehydratase aus *S. typhimurium* (PduCDE) dargestellt. Es ist zu sehen, dass die auf den Plasmiden pAK2-3 und pAK7 kodierten Untereinheiten Cluster mit denen der Glycerin-Dehydratasen aus *C. freundii* bilden. Aufgrund der starken Ähnlichkeiten, die auch durch die geringen Abstände in den Verzweigungen deutlich werden, konnten die Enzyme in die Klasse der Glycerin-Dehydratasen eingeordnet werden. Die auf den Plasmiden pAK4-5 kodierten Untereinheiten bildeten dagegen eigene Cluster mit denen der Diol-Dehydratase aus *S. typhimurium*, was die Klassifizierung als Diol-Dehydratasen unterstützt.

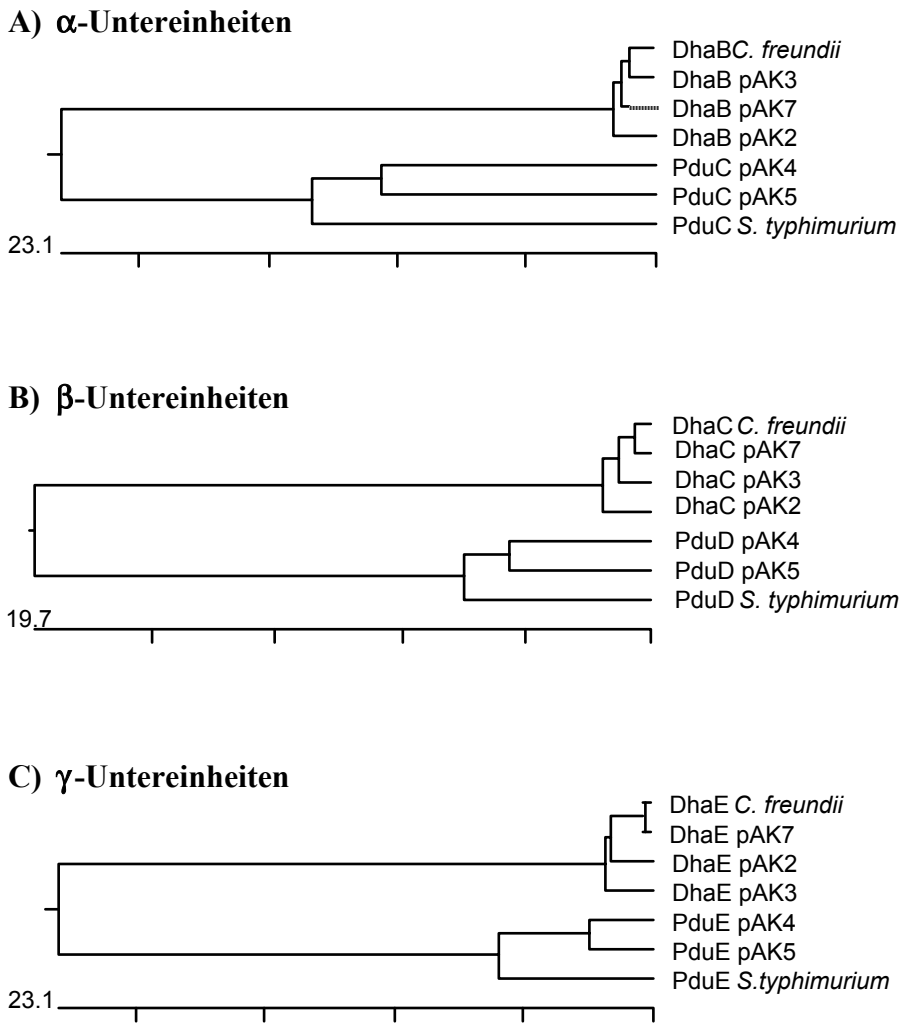


Abbildung 39: Phylogenetische Beziehungen der einzelnen Untereinheiten der aus den Metagenombanken identifizierten Glycerin- und Diol-Dehydratasen zu den entsprechenden Genprodukten aus *C. freundii* und *S. typhimurium*
Referenzen: Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*, SEYFRIED et al. (1996); Diol-Dehydratase aus *S. typhimurium*, BOBIK et al. (1997); Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus pAK2-5 und pAK7, diese Arbeit.

Die beobachteten Ähnlichkeiten waren jedoch nicht beschränkt auf die Sequenzübereinstimmungen der Proteine, sondern zeigten sich auch bei der genetischen Organisation der Untereinheiten und der darüber hinaus auf den Plasmiden klonierten Gene. In allen bisher näher untersuchten Glycerin- oder 1,2-Propandiol-fermentierenden Bakterien liegen die Gene für die entsprechenden Coenzym B_{12}-abhängigen Dehydratasen in sogenannten Operon- oder Regulon-Strukturen mit weiteren Genen für an der Fermentation beteiligter Enzyme vor (DANIEL et al., 1998). In Abbildung 40 ist

die genetische Organisation der Enzyme des reduktiven Zweiges der Glycerinfermentation in *C. freundii, K. pneumoniae* und *Cl. pasteurianum*, sowie für die des 1,2-Propandiol-Abbaus in *K. oxytoca* und *S. typhimurium* dargestellt. Auf dem in dem Plasmid pAK7 inserierten DNA-Abschnitt konnten zusätzlich zu den Glycerin-Dehydratase-Genen die Gene für die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase (*dhaT*), die Adenosyltransferase (*dhaHI*) und für Teile des Reaktivierungsfaktors (*dhaFG*) identifiziert werden. Das Plasmid pAK2 enthielt die Gene *dhaF* und *dhaI* sowie Teile von *dhaT*. Auf pAK3 war ein kurzer Abschnitt von *dhaF* vorhanden. Diese Gene sind in der gleichen Anordnung ebenfalls im *dha*-Regulon von *C. freundii* lokalisiert (s. Abb. 18 und 40). Analog dazu konnten auf dem Plasmid pAK5 zusätzlich zu den Genen für die Diol-Dehydratase-Untereinheiten die Gene *pduGH*, die für den Reaktivierungsfaktor kodieren und *pduJ* identifiziert werden, die ebenfalls zum *pdu*-Operon von *S. typhimurium* gehören (s. Abb. 18 und 40).

Die Herkunft von klonierten DNA-Fragmenten in Metagenombanken ist nicht feststellbar. Die hohen Identitäten der auf pAK2-3 und pAK7 lokalisierten Gene zu denen aus *C. freundii* deuten jedoch darauf hin, dass es sich möglicherweise um Spezies-Varianten dieses Organismus handeln könnte. Ein vergleichbares Ergebnis zum Auftreten von Spezies-Varianten hatte die Sequenzanalyse mehrerer Cosmide aus einer Genbank des unkultivierbaren Archaebakteriums *Cenarchaeum symbiosum* ergeben, der durch 16S rDNA-Analysen als Symbiont eines marinen Schwammes identifiziert worden war. Dabei isolierte, überlappende DNA-Fragmente wiesen leichte Sequenzvariationen auf, was zeigte, dass ein bakterieller Symbiont schon innerhalb seines spezifischen Wirtes erhebliche genetische Variationen ausbilden kann (SCHLEPER et al., 1998). Für die in pAK4 und pAK5 klonierten Genregionen trifft dies im Vergleich mit *S. typhimurium* nicht zu. Die Unterschiede in den Sequenzen sind hier wesentlich deutlicher und die auftretenden Differenzen im G+C-Gehalt (> 3 %) deuteten außerdem auf eine unterschiedliche Kodonnutzung der unbekannten Organismen hin.

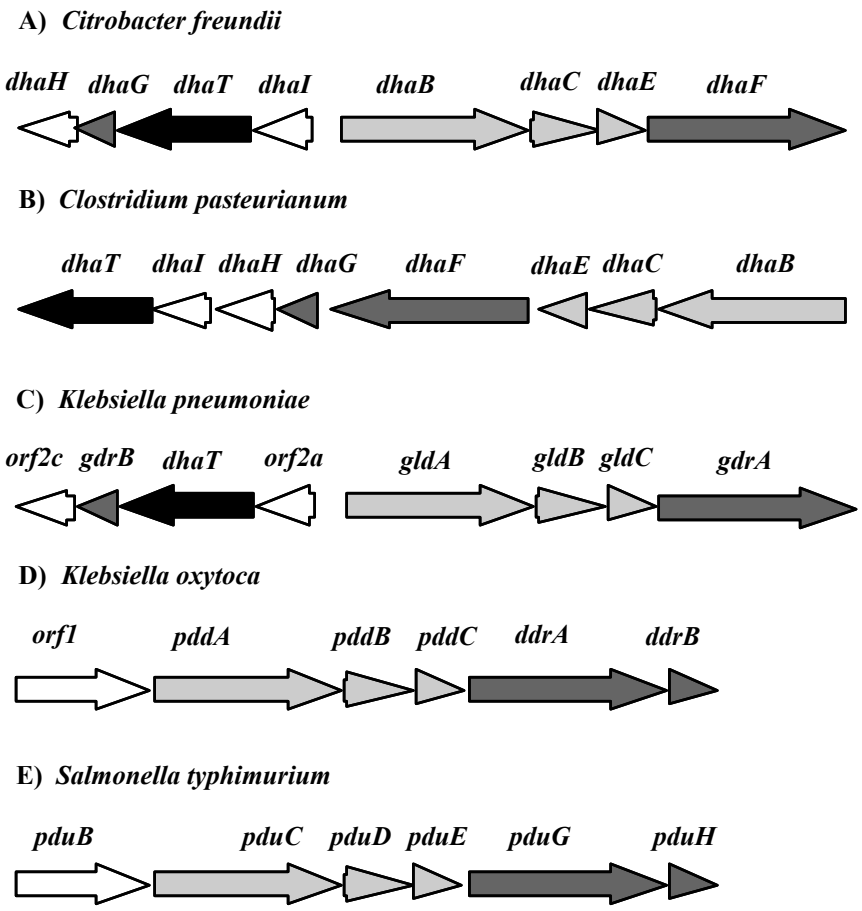


Abbildung 40: Genetische Organisation der Enzyme des reduktiven Zweiges der Glycerin-Fermentation in *C. freundii* (A), *Cl. pasteurianum* (B) und *K. pneumoniae* (C) sowie für die des 1,2-Propandiol-Abbaus in *K. oxytoca* (D) und *S. typhimurium* (E)
Pfeile und Pfeilspitzen repräsentieren die Länge, Position und Orientierung von möglichen Genen. Hellgraue und dunkelgraue Pfeile markieren die Gene für die Diol- bzw. Glycerin-Dehydratasen sowie die ihrer Reaktivierungsfaktoren. Schwarze Pfeile stehen für offene Leserahmen, die für die 1,3-Propandiol-Dehydrogenase kodieren.

Zur Identifizierung der Dehydratase-Gene tragenden Plasmide waren, wie zuvor beschrieben, sowohl Aktivitäts- als auch Sequenz-basierende Durchmusterungsverfahren angewandt worden. Ein auf Sequenzhomologien basierendes Verfahren beschränkt die Detektion von vorn herein auf Gene, die Ähnlichkeiten zu den bekannten Genen der untersuchten Enzymklasse aufweisen. Etwas überraschend war jedoch, dass auch bei der Aktivitäts-abhängigen Durchmusterung der Umweltgenbanken mit Hilfe des Stammes *E. coli* ECL707/pAK1 keine neuartigen

Strukturen identifiziert werden konnten, die eine Dehydratase-Aktivität vermittelten. Alle isolierten Plasmide trugen Gene, die hohe Ähnlichkeiten zu denen der Enterobakterien *C. freundii und S. typhimurium* zeigten. Zur Erklärung bieten sich hier mehrere Möglichkeiten an. Die durchgeführte Anreicherung mit M9-Mineralmedium und den Substraten Glycerin und 1,2-Propandiol bot offensichtlich einen Wachstumsvorteil für schnell wachsende, die angebotenen Substrate verwertende Mikroorganismen, wie Enterobakterien. Die Ergebnisse der Durchmusterung der gleichen Genbanken auf die Existenz von Alkohol-Oxidoreduktase-Gene bestätigt dies ebenso wie die Arbeiten von ENTCHEVA et al. (2001), die in ihren Anreicherungskulturen ebenfalls M9-Medium verwendet hatten. In beiden Fällen zeigten die identifizierten Gene hohe Übereinstimmungen mit Genen enterobakterieller Herkunft. Andererseits ist zu beachten, dass die bekannten Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen in sich homogene und hoch konservierte Enzymklassen darstellen. Sie weisen die Untereinheitenstruktur $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ auf und die Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen liegen zwischen 54 und 99 % (DANIEL et al., 1998). Dies deutet auf eine hohe Konservierung von Reaktionstyp und beteiligter Enzyme im Zuge der Evolution hin.

Zusätzlich zur molekularen Analyse der Dehydratasen aus den Metagenombanken wurden auch die korrespondierenden Proteine einer eingehenden Charakterisierung unterzogen. Zu diesem Zweck wurden die Gene, die auf pAK2 und pAK7 vorlagen in Expressionsvektoren subkloniert. Die unvollständig klonierten Dehydratase-Gene der Plasmide pAK3 und pAK5 konnten in einer sogenannten „Megaprime“-PCR durch entsprechende Teile aus dem nächsten Verwandten komplettiert und ebenfalls subkloniert werden. Die Hybrid-Glycerin-Dehydratase auf pAK3.1 zeigte jedoch nach Produktion in *E. coli* keine Aktivität und konnte somit nicht in die nachfolgenden Untersuchungen einbezogen werden (s. 3.3.3).

Die Rate, mit der die Substrate Glycerin, 1,2-Propandiol oder 1,2-Ethandiol umgesetzt werden, ist ein Unterscheidungsmerkmal für die zwei Klassen Coenzym B_{12}-abhängiger Dehydratasen. Die Glycerin-Dehydratasen bevorzugen Glycerin als Substrat, die Diol-Dehydratasen dagegen zeigen mit 1,2-Propandiol eine höhere spezifische Aktivität (TORAYA und FUKUI, 1977; POZNANAKAJA und KORSOVA, 1979; SEYFRIED et al., 1996). Weitere Kriterien für die Unterscheidung der Enzyme sind die Selektivität bei der Aktivierung durch monovalente Kationen, die Affinität für Coenzym B_{12} und die

differenten immunochemischen Eigenschaften (TORAYA et al., 1971; TORAYA und FUKUI, 1977; FORAGE und FOSTER, 1979; TORAYA et al., 1980).

Die beiden als Glycerin-Dehydratasen klassifizierten Enzyme, die von *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 gebildet wurden, zeigten das für diese Enzyme typische Substratspektrum und wiesen die höchste spezifische Aktivität mit Glycerin als Substrat auf (s. Tab. 16). Die relativen Aktivitäten mit 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol lagen bei 31 und 21 % bzw. 7 und 2 %. Auch dies stimmte gut überein mit Werten, die für andere Glycerin-Dehydratasen bestimmt wurden (SEYFRIED et al., 1996; MACIS et al., 1998). Die von *E. coli* BL21/pAK5.1 produzierte Hybrid-Diol-Dehydratase zeigte wie erwartet eine Präferenz für das Substrat 1,2-Propandiol. Aber auch mit Glycerin sank die Aktivität nur um 4 %, mit 1,2-Ethandiol konnten 41 % relative Aktivität festgestellt werden. Die Aktivität aller Enzyme war strikt von der Anwesenheit des Kofaktors Coenzym B_{12} im Reaktionsansatz abhängig. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse konnten somit bestätigt werden.

Die Molekularmassen der Dehydratasen konnten anhand ihres Laufverhaltens in einer Gradienten-PAGE unter nicht denaturierenden Bedingungen und eine daran anschließenden Aktivitätsfärbung bestimmt werden (s. 3.2.3.5). Hierzu wurde 1,2-Propandiol als Substrat verwendet, dass von allen bekannten Coenzym B_{12}-abhängigen Dehydratasen umgesetzt werden kann (DANIEL et al., 1998). Das dabei entstehende Propionaldehyd bildete mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin ein gelbes Präzipitat, was eine Zuordnung der Proteinbanden ermöglichte (s. Abb. 23). Für die von *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 produzierten Glycerin-Dehydratasen wurde eine Molekularmasse von ca. 190 kDa bestimmt. Dies stimmte gut mit den aus den Sequenzen abgeleiteten Molekularmassen und mit den in der Literatur beschriebenen Massen anderer Glycerin-Dehydratasen überein (SEYFRIED et al., 1996; MACIS et al., 1998; FORAGE und FOSTER, 1979). Bei der Aktivitätsfärbung der Hybrid-Diol-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK5.1 konnte eine Molekularmasse von ca. 230 kDa ermittelt werden. Für die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* war von POZNANZKAYA et al. (1979) durch Gelfitration und Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation der identische Wert ermittelt worden.

Nachfolgend wurden die Empfindlichkeit der neu isolierten Enzyme gegenüber der „suicide“-Inaktivierung mit Glycerin untersucht. Die inhibitorische Wirkung dieses Substrates ist sowohl für die Glycerin-Dehydratasen aus *K. pneumoniae* und *C. freundii* sowie für die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* beschrieben worden (TORAYA et al.,

1976; BACHOVCHIN et al., 1977; SEYFRIED et al., 1996). Die Dehydratasen gehören zur Klasse II der Coenzym B_{12}-abhängigen Enzyme, die das Cobalamin in der „base-on“-Form binden (SHIBATA et al., 1999). In Abbildung 41 ist die über einen radikalischen Mechanismus ablaufende Substratumsetzung zusammengefasst. Die Interaktion von Apoenzym und Coenzym aktiviert die Co-C-Bindung des Coenzyms. Es kommt zur Homolyse der Co-C-Bindung und zur Bildung von Cob(II)alamin und einem Adenosyl-Radikal. Das Adenosyl-Radikal abstrahiert ein Wasserstoffatom vom Substrat und anschließend rearrangiert das entstandene Substrat-Radikal zu einem Produkt-Radikal durch einen Hydroxylgruppentransfer von C2 zu C1. Das Produkt-Radikal überträgt ein Wasserstoffatom zurück auf das 5´-Desoxyadenosin. Das Resultat ist die Bildung des Endproduktes und die Regeneration von Coenzym B_{12}. Für die Reaktion mit Glycerin wird angenommen, dass das Substrat in zwei verschiedenen Konformationen im aktiven Zentrum der Dehydratasen gebunden werden kann, von denen die eine die Dehydratisierung, die andere hingegen die Inaktivierung begünstigt. Bei der Inaktivierung entsteht ein 5´-Desoxyadenosin und eine unbekannte Cobalaminspezies, die ein Spektrum ähnlich dem von Alkylcobalamin zeigt (BACHOVCHIN et al., 1977). Diese unbekannte Cobalaminspezies wird langsam in Hydroxy-B_{12} umgewandelt, bindet mit hoher Affinität an die Dehydratase und inaktiviert diese irreversibel. Alle aus den Metagenombanken isolierten Coenzym B_{12}-abhängigen Dehydratasen werden während der Reaktion mit Glycerin innerhalb von wenigen Minuten inaktiviert. Zum Vergleich mit den neu isolierten Dehydratasen wurde die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* mit Hilfe des rekombinanten Plasmids pCS120 ebenfalls in *E. coli* produziert und gereinigt (SEIFERT et al., 2001). Diese und das Hybrid-Enzym aus *E. coli* BL21/pAK5.1 zeigten sich am wenigsten empfindlich gegenüber der Glycerininaktivierung (s. Abb. 25). Die höhere Resistenz der Diol-Dehydratase im Vergleich mit den beiden Glycerin-Dehydratasen aus *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 ist überraschend, da für die Coenzym B_{12}-abhängigen Dehydratasen der *Klebsiella*-Stämme eine schnellere Inaktivierung der Diol-Dehydratasen etabliert ist (BACHOVCHIN et al., 1977; POZNANSKAYA et al., 1977). Diese wurde darauf zurückgeführt, dass die beiden Enzymtypen eine unterschiedliche Affinität zu den beiden (S)- und (R)-Isomeren des Glycerins aufweisen. Die Glycerin-Dehydratase zeigt eine in etwa gleichwertige Affinität zu beiden Isomeren, während die Diol-Dehydratasen das (S)-Isomer bevorzugen (YAMANISHI et al., 2002). Dabei ist der Enzym-(R)-Glycerin-Komplex vorwiegend

für die Produktbildung verantwortlich und der Enzym-(S)-Glycerin-Komplex verursacht die Inaktivierung. Die beobachtete geringere Präferenz für die inaktivierende Form des Substrats ist somit für die langsamere Inaktivierung der Glycerin-Dehydratasen verantwortlich (BACHOVCHIN et al., 1977; YAMANISHI et al., 2002). Die Ergebnisse der Untersuchung der Hybrid-Diol-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK5.1 zeigten, dass sich dieses Enzym in Bezug auf die Isomer-Präferenz wie eine Glycerin-Dehydratase verhält.

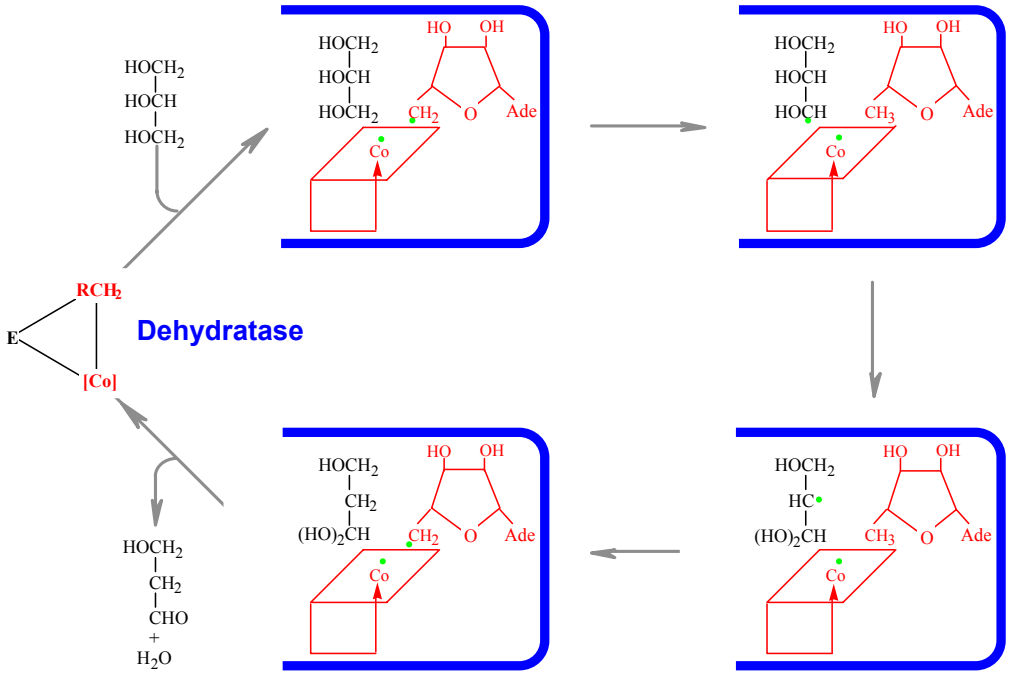


Abbildung 41: Vereinfachter Reaktionsmechanismus der Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen

Die Reaktivierung der Glycerin-inaktivierten Glycerin- und Diol-Dehydratasen ist für das anaerobe Wachstum auf dem Substrat notwendig, da die Enzyme essentiell für den Fermentationsprozess sind (TORAYA et al., 1980; BOENIGK et al., 1993; DANIEL et al., 1998; LUERS et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Glycerin-inaktivierte Dehydratasen durch den Austausch des modifizierten Coenzyms gegen intaktes Cobalamin reaktiviert werden können. Dieser Austausch wird durch einen als Reaktivierungsfaktor bezeichneten heterodimeren Proteinkomplex in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+}-Ionen vermittelt. Der von SEIFERT (2001) postulierte Reaktivierungsmechanismus ähnelt dem Chaperon-Zyklus aus *E. coli* (s. Abb. 42). Während der Dehydratisierung von Glycerin wird sowohl die Glycerin- als auch die

Diol-Dehydratase inaktiviert. Die Inaktivierung wird durch die irreversible Spaltung der Co-C-Bindung des Coenzyms B_{12} hervorgerufen. Das so modifizierte Coenzym bindet an die Dehydratase und inaktiviert diese. Der Reaktivierungsfaktor bindet anschließend an das inaktivierte Enzym, wodurch die Bindung des modifizierten Coenzyms zur Dehydratase geschwächt und dieses abgespalten wird. Durch die Bindung von ATP an den Reaktivierungsfaktor und der daraus resultierenden Konformationsänderung dissoziiert der Komplex aus Reaktivierungsfaktor und Dehydratase. Die Dehydratase kann nun erneut enzymatisch aktives Coenzym B_{12} binden und die Dehydratisierung von Glycerin katalysieren. Für *C. freundii* (DhaFG), *K. oxytoca* (DdrAB) und *K. pneumoniae* (GdrAB) konnten die als Reaktivierungsfaktor fungierenden Proteinkomplexe bereits identifiziert und charakterisiert werden (MORI et al., 1997; TORAYA und MORI, 1999; SEIFERT et al., 2001; KAJIURA et al., 2001). Gene, die für homologe Proteine kodieren, befinden sich in Nachbarschaft zu allen bekannten Glycerin- und Diol-Dehydratase-Genen. Auch auf den Plasmiden pAK2-3, pAK5 und pAK7 waren Teile dieser Gene vorhanden (s. Abb. 18). Alle hier untersuchten Umwelt-Dehydratasen konnten in Gegenwart von Coenzym B_{12}, ATP und $MgCl_2$ durch den Reaktivierungsfaktor DhaFG aus *C. freundii* reaktiviert werden. Die gemessenen Reaktivierungsraten lagen für die von *E. coli* BL21/pAK2.1 und *E. coli* BL21/pAK7.1 produzierten Glycerin-Dehydratasen bei 81 und 85 % (S. Tab. 18). Diese Werte stimmten gut mit dem für die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* erhaltenen Wert von 84 % überein (SEIFERT et al., 2001). Die Diol-Dehydratase aus *E. coli* BL21/pAK5.1 wurde zu 62 % reaktiviert (S. Tab. 18). Eine solche Kreuzreaktion eines Reaktivierungsfaktors einer Glycerin-Dehydratase mit einer inaktiven Diol-Dehydratase war bisher noch nicht beschrieben worden. Frühere Experimente zur Reaktivierung der Diol-Dehydratasen aus *K. oxytoca* und *S. typhimurium* mit DhaFG aus *C. freundii* waren nicht erfolgreich gewesen (SEIFERT et al., 2001). Die Untersuchungen waren jedoch nicht mit den gereinigten Enzymen durchgeführt worden, sondern mit Rohextrakten der jeweiligen Stämme. Die aufgrund dieser Ergebnisse gemachte Annahme der Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii* sei spezifisch für Glycerin-Dehydratasen, konnte somit im Rahmen dieser Arbeit widerlegt werden.

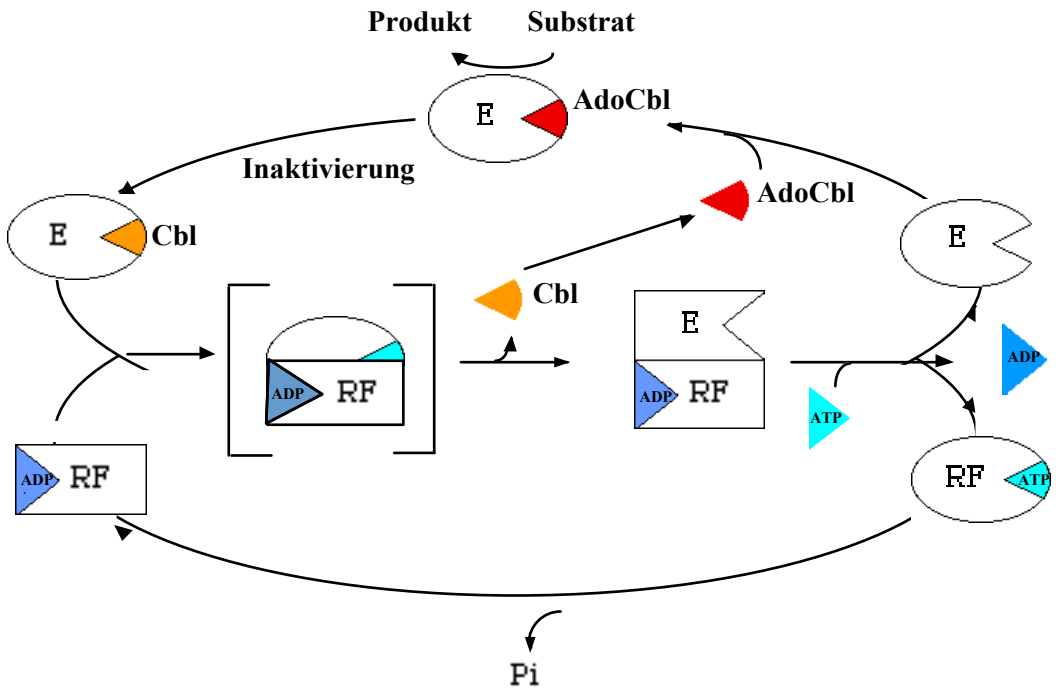


Abbildung 42: Von SEIFERT (2001) postulierter Mechanismus der Reaktivierung inaktivierter Glycerin- und Diol-Dehydratasen durch die entsprechenden Reaktivierungsfaktoren
E, Apo-Dehydratase; RF, Reaktivierungsfaktor; AdoH, 5´-Desoxyadenosin; Cbl, Cobalamin.

Erstmalig wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hemmung der Dehydratase-Aktivität durch 1,3-Propandiol, das Endprodukt der Glycerin-Fermentation intensiv untersucht. Dass eine solche Hemmung auftritt, war zuvor lediglich in einer Publikation von POZNANSKAYA und KORSOVA (1979) angedeutet worden. Bei der biotechnologischen Produktion treten 1,3-Propandiol-Konzentrationen von bis zu 2 M auf (CHOTANI et al., 2000). 1,3-Propandiol wird von den Dehydratasen nicht umgesetzt, wirkt aber als Inhibitor, der mit den Substraten um die Bindung an das Enzym konkurriert (POZANSKAYA und KORSOVA, 1979). Die geringste Sensitivität wies dabei die Hybrid-Diol-Dehydratase auf. Sogar in Gegenwart von 2 M 1,3-Propandiol war noch etwa 40 % der Ausgangsaktivität detektierbar, der K_i-Wert lag bei 1,36 M.

Betrachtet man sowohl die relative Stabilität bei der Inaktivierung durch Glycerin als auch die Unempfindlichkeit gegenüber der Hemmung durch 1,3-Propandiol so erscheint die von *E. coli* BL21/pAK5.1 produzierte Hybrid-Diol-Dehydratase am besten für einen Einsatz in der biotechnologischen Produktion von 1,3-Propandiol geeignet. Die Anwendbarkeit des Enzyms muss durch die direkte Integration der korrespondierenden

Gene in den *E. coli*-Produktionsstamm überprüft werden. Im Rahmen dieser Experimente sollte auch die Integration eines entsprechenden, Diol-Dehydratase-spezifischen Reaktivierungsfaktors vorgenommen werden, da die Untersuchungen zur Reaktivierung mit dem Reaktivierungsfaktor aus *C. freundii* eine deutlich verminderte Spezifität von DhaFG für die Hybrid-Diol-Dehydratase gezeigt hatten.

4.5 Identifizierung und Charakterisierung von Alkohol-Oxidoreduktasen in Metagenombanken

Die enzymatische Oxidation und Reduktion von Alkoholen bzw. Carbonylverbindungen ist an einer Vielzahl von metabolischen Prozessen in Tieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien beteiligt. Diese Redoxreaktionen werden von Oxidoreduktasen katalysiert (FANG et al., 1995; HUMMEL, 1997). Die bekannten Alkohol-Oxidoreduktasen lassen sich aufgrund ihrer Struktur, der benötigten Kofaktoren und der enthaltenen Metallionen in drei verschiedene Hauptgruppen unterteilen. Man unterscheidet die $NAD(P)^+$-abhängigen Dehydrogenasen (Typ I, Typ II und Typ III), die $NAD(P)^+$-unabhängigen Dehydrogenasen (mit Kofaktoren wie FAD, PQQ oder F_{420}) und die Alkohol-Oxidasen. Zu den natürlichen Substraten dieser Enzyme gehören sowohl primäre und sekundäre, verzweigte wie unverzweigte, aliphatische und aromatische Alkohole als auch die korrespondierenden Aldehyde und Ketone (MACINTOSH und FEWSON, 1987). Viele Mikroorganismen besitzen mehrere verschiedenen Alkohol-Dehydrogenasen, die zumeist unter verschiedenen Wachstumsbedingungen induziert werden und somit unterschiedliche Funktionen im Stoffwechsel ausüben. Der Schimmelpilz *Aspergillus nidulans* besitzt z.B. neun verschiedene NAD^+-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen, die sehr differente Substratspektren aufweisen und deren Bildung unterschiedlich reguliert ist (SEALY-LEWIS und FAIRHURST, 1995). In *Saccharomyces cerevisiae* finden sich drei Alkohol-Dehydrogenasen (REID und FEWSON, 1994). Diese drei Isoenzyme (zwei gehören zu den Zink-beinhaltenden und eines zur Gruppe der Eisen-aktivierten ADHs) unterscheiden sich nicht wesentlich in ihren V_{max}-Werten bei Oxidation und Reduktion, jedoch haben sie eine unterschiedlich hohe Affinität für ihr Hauptsubstrat Ethanol. Die Identitäten in den Aminosäuresequenzen liegen zwischen 78 und 94 % (WILLS, 1976).

In der industriellen Biotechnologie haben sich besonders die $NAD(P)^+$-abhängigen Enzyme als nützliche Katalysatoren bei der Synthese von chiralen Alkoholen bewährt (HUMMEL, 1999). Die dort eingesetzten Enzyme weisen hohe Aktivität, Stabilität und Enantioselektivität auf. Trotz bestimmter struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten stellen die bisher bekannten $NAD(P)^+$-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen eine sehr heterogene Enzymklasse dar. Ein Alignment von 47 Mitgliedern der Gruppe der Typ I NAD^+-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen hatte gezeigt, dass nur 9 Aminosäurereste konserviert waren. Die acht ermittelten konservierten Glycin-Reste und ein Valin-Rest spielten jedoch keine Rolle in der Katalyse, sie besaßen strukturelle Funktionen (SUN und PLAPP, 1992). Weit verbreitet dagegen sind bei vielen $NAD(P)^+$-abhängigen Dehydrogenasen die Glycin-reichen Motive GXGXXG (SCRUTTON et al., 1990) oder GXGXXA (WIERENGA et al., 1985), die an der Bindung des Nikotinamid-Kofaktor beteiligt sind.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Identifizierung und Charakterisierung von neuartigen Genen aus Umweltgenbanken, die diese Art von Reaktionen katalysieren und das Anlegen eines Klon- bzw. Gen-Pools für diesen Reaktionstyp. Ein solcher Pool mit einigen Hundert Klonen oder Plasmiden kann als Ausgangsmaterial für neue oder verbesserte Produktionsprozesse verwendet werden. Zur Detektion der Gene wurde ein einfacher Plattentest verwendet, der auf der Expression der eingebrachten Umweltgene und der Aktivität der gebildeten Proteine im Wirtsstamm *E. coli* basierte. Die Nachweismethode war zuvor erfolgreich von CONWAY et al. (1987) und JOHNSON et al. (2001) zur Detektion von Alkohol-Dehydrogenase- und Diol-Dehydratase-Aktivität verwendet worden. Die Glycerin-negative *E. coli*-Mutante ECL707 diente als Wirtsstamm. Als Ausgangsmaterial für die Durchmusterung wurden wiederum die Anreicherungsgenbanken aus den Sedimentproben des Solar Lake (SLA), des Golf von Eilat (GEA) und der Grone (GIIA) sowie der Bodenprobe des Zuckerrübenfeldes (ZRA) genutzt. Des Weiteren kamen hier die Umweltgenbanken FN, WN und ZB aus nicht angereicherten Bodenproben zum Einsatz. Als Testsubstrate wurden ein Glycerin/1,2-Propandiol-Gemisch, 1,2-Ethandiol oder 2,3-Butandiol verwendet. Es ist bekannt, dass eine ganze Anzahl von $NAD(P)^+$-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen in den Abbau von Substraten wie Glycerin und 1,2-Propandiol involviert sind. Die Mehrheit dieser Enzyme wie die Glycerin-Dehydrogenasen, 1,2-Propandiol-Dehydrogenasen und 1,3-Propandiol-Dehydrogenasen gehören zu den Eisen-haltigen Typ III Alkohol-Dehydrogenasen (SUGIURA et al., 1978; QUATTARA

et al., 1992; DANIEL et al., 1995). Sie sind bei einer ganzen Reihe von bakteriellen Spezies bekannt, dazu gehören u.a. *C. freundii*, *Cl. pasteurianum*, *Erwinia aroidea*, *Desulfovibrio* strain HDv, *Cellulomonas sp.*, *Lactobacillius reuteri* und *K. pneumoniae.* Auf der Basis der beschriebenen Durchmusterungsmethode konnten in den sieben verschiedenen Umweltgenbanken insgesamt 31 positive *E. coli*-Klone mit stabilem Phänotyp identifiziert werden. 16 dieser *E. coli* Klone enthielten Plasmide, die aus den „angereicherten" Metagenombanken ZRA, GEA, SLA und GIIA entstammten (s. 3.3.2). Die übrigen 15 Plasmide, die ebenfalls den gewünschten Carbonyl-bildenden Phänotyp vermittelten, entstammten den Umweltgenbanken FN, WN und ZB, die die natürliche Diversität ihrer Habitate repräsentierten (s. 3.3.3). Die verwendeten Anreicherungsgenbanken zeigten im Vergleich mit den nicht-angereicherten Genbanken eine etwa 3-fach höhere Trefferquote (s. Tab. 30).

Tabelle 30: Vergleich der Ergebnisse der Durchmusterung von angereicherten Metagenombanken und solchen aus unveränderten Habitaten zur Identifizierung neuartiger Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität vermittelnder Gene

Ergebnisse mit nicht-angereicherten Genbanken	Ergebnisse mit angereicherten Genbanken
▪ 15 positive *E. coli*-Klone bei 3000000 überprüften Klonen -> Verhältnis 1:200000	▪ 16 positive *E. coli*-Klone bei 900000 überprüften Klonen -> Verhältnis 1:75000
▪ 7 Plasmide vermittelten NAD(H)-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität	♦ 8 Plasmide vermittelten NAD(H)-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität
♦ 50 % der identifizierten Gene zeigten keinerlei Übereinstimmungen mit bekannten Genen ♦ 50 % der identifizierten Gene zeigten schwache Übereinstimmungen mit bekannten Genen	♦ 8 % der identifizierten Gene zeigten keinerlei Übereinstimmungen mit bekannten Genen ♦ 33 % der identifizierten Gene zeigten schwache Übereinstimmungen mit bekannten Genen ♦ 59 % der identifizierten Gene zeigten hohe Übereinstimmungen mit bekannten Genen
▪ 5 der identifizierten Gene zeigten Ähnlichkeiten zu Oxidoredukatase-kodierenden Genen ▪ keines war ähnlich zu bekannten Alkohol-Dehydrogenase-Genen	▪ 12 der identifizierten Gene zeigten Ähnlichkeiten zu Oxidoredukatase-kodierenden Genen ▪ 4 davon waren ähnlich zu bekannten Alkohol-Oxidoreduktase-Genen

Je 75000 überprüfter Kolonien konnte ein positiver Klon erhalten werden. Bei der Durchmusterung der nicht angereicherten Genbanken wurde ein Verhältnis von 1:200000 erzielt. Die identifizierten rekombinanten *E. coli*-Stämme und die enthalten Plasmide wurden einer eingehenden molekularen und biochemischen Analyse unterzogen. Tabelle 30 gibt eine Übersicht über die mit den unterschiedlichen Genbanktypen erzielten Ergebnisse. Die Analyse der Sequenzdaten aller erhaltener Plasmide zeigte zunächst, dass keines der Plasmide mehrfach isoliert worden war. Außerdem konnte eine enorme Diversität in den Genen und abgeleiteten Genprodukten festgestellt werden. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit den in den Datenbanken der NCBI gespeicherten Proteinen ergab Ähnlichkeiten zu Genprodukten, die einer ganzen Reihe unterschiedlicher mikrobieller Gattungen zuzuordnen sind. Dazu gehörten u. a. die Gattungen *Yersinia*, *Salmonella*, *Sinorhizobium*, *Thermotoga*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Bacillus* und *Methanosarcina*. Dies zeigte, dass die in den Metagenombanken klonierten Genregionen ebenfalls aus einer großen Anzahl unterschiedlicher und bisher unbekannter Mikroorganismen stammten.

Die Kombination aus Anreicherung und direkter DNA-Isolierung, die zur Isolierung der Plasmide pAK101 bis pAK116 führte, hat sich als eine effektive Methode zur Detektion einer großen Anzahl von Genen erwiesen, die den gewünschten Phänotyp vermittelten (s. 3.4.2). Acht der identifizierten Plasmide vermittelten eine NAD^+-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität, die mit verschiedenen Substraten im enzymatischen Test in den Rohextrakten der entsprechenden *E. coli*-Klone nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 20). Durch die Analyse der Sequenzdaten konnten auf den 16 Plasmiden insgesamt 38 vollständig klonierte und 16 unvollständige Gene vorhergesagt werden. Insgesamt 92 % der Gene und der daraus abgeleiteten Genprodukte wiesen signifikante Ähnlichkeiten zu bereits sequenzierten Genen aus anderen Organismen auf. Die übrigen 8 % zeigten dagegen keinerlei Übereinstimmungen mit den in den Datenbanken gespeicherten Sequenzen. Bei der Zuordnung der Genprodukte war eine deutliche Konzentration auf Proteine enterobakterieller Herkunft zu beobachten. Die Übereinstimmungen von einigen dieser offenen Leserahmen mit Genen der bereits sequenzierten Enterobakterien lagen in einem Bereich von über 90 %. Dazu gehörten z.B. *dacD* (pAK103), *fdhD* (pAK109), *orf14* (pAK110) sowie *glpX* und *glpK* (pAK115). Keines der Gene zeigte jedoch eine 100 %ige Identität und somit konnte auch keines der klonierten DNA-Fragmente einem schon bekannten Organismus zugeordnet werden.

Zwölf der identifizierten Gene (*phsC, orf5, sucA, sucB, orf12, fdhD, orf14, dkgA, aroD, orf21, orf22* und *yabF*) zeigten Übereinstimmungen mit bekannten Oxidoreduktase-Genen, die für Proteine mit recht unterschiedlichen Funktionen kodierten (s. Tab. 22 und Abb. 30). Drei davon konnten in die drei Gruppen der $NAD(P)^+$-abhängigen Alkohol-Oxidoreduktasen eingeordnet werden. Das *orf14*-Genprodukt, das auf pAK110 als verantwortlich für den gebildeten Phänotyp identifiziert wurde, wurde aufgrund der beobachteten Ähnlichkeiten zu einer Eisen-haltigen Alkohol-Dehydrogenase aus *S. enterica* in die Klasse der Typ III NAD^+-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen eingestuft. Orf12 war ähnlich zum Typ I und Orf22 zum Typ II der Nikotinamid-abhängigen Enzyme. Hier sind bereits einige Vertreter bekannt, die in der Lage sind mit verschiedenen Polyolen und den korrespondierenden Aldehyden und Ketonen zu reagieren. Abbildung 43 zeigt ein Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit bekannten und anderen hypothetischen Dehydrogenasen dieser Typen. Die übrigen für Oxidoreduktasen kodierenden Gene konnten in keine der drei beschriebenen Gruppen von Alkohol-Oxidoreduktasen eingeordnet werden. Es konnten jedoch u. a. Ähnlichkeiten zu einer bekannten Thiosulfat-Reduktase (PhsC), einer 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (SucA und SucB) und anderen möglichen Oxidoreduktasen festgestellt werden. Für keines dieser Enzyme ist bisher eine Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität beschrieben worden.

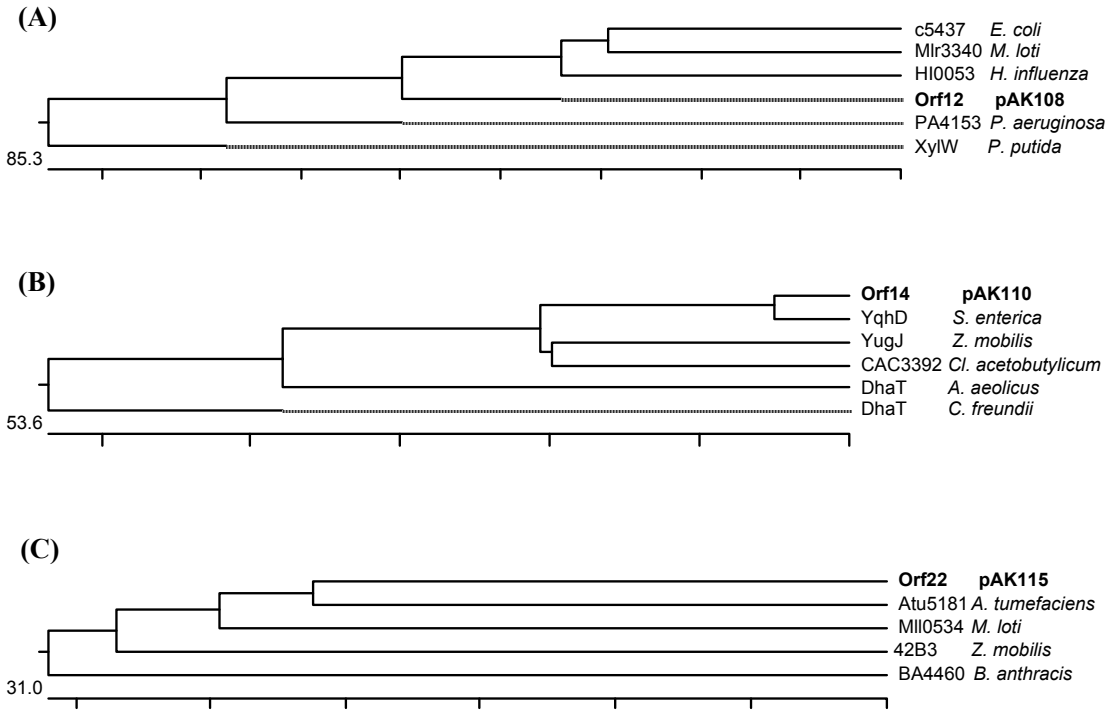


Abbildung 43: Phylogenetische Beziehungen der drei identifizierten NAD(P)$^{+-}$ abhängigen Alkohol-Oxidoreduktasen Orf12 (A), Orf14 (B) und Orf22 (C) zu bekannten und anderen hypothetischen Alkohol-Dehydrogenasen der Typen I, II und III

Die Durchmusterung der „natürlichen“ Metagenombanken FN, WN und ZB hatten zur Isolierung der Plasmide pAK201-215 geführt. Sieben dieser Plasmide vermittelten eine NAD^{+}-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität, die mit verschiedenen Substraten im enzymatischen Test in den Rohextrakten der entsprechenden *E. coli*-Klone nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 25). Die Sequenzierung der Plasmide zeigte ein weniger eindeutiges Bild. Die Hälfte der identifizierten 40 Protein-kodierenden Gene auf den 15 Plasmiden zeigte keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten in den Datenbanken gespeicherten Sequenzen (s. Tab. 30). Die anderen 50 % wiesen schwache Übereinstimmungen zu bereits sequenzierten Genen mit unterschiedlichen Funktionen auf. Keines dieser Gene oder der abgeleiteten Genprodukte war verwandt mit einer Alkohol-Dehydrogenase aus einem bekannten Mikroorganismus. Fünf der abgeleiteten Genprodukte (Orf8, Orf9, Orf27, Orf30 und MetF) zeigten Übereinstimmungen zwischen 26 und 64 % zu bekannten Oxidoreduktasen. Dazu gehörten eine Kohlenmonoxid-Dehydrogenase aus *H. pseudoflava* bzw. *M. loti*, eine Aldehyd-Dehydrogenase aus *B. melitensis*, eine FeS-bindende Reduktase aus *B. halodurans* und die 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase aus *R. solanacearum*. Für keines dieser

Enzyme ist bisher eine Umsetzung der eingesetzten Polyol-Substrate beschrieben worden. Durch Subklonierungsexperimente konnten für die Plasmide pAK204, pAK211 und pAK212 der für den Phänotyp verantwortliche Leserahmen determiniert werden. Die mit Orf6 (pAK204) und Orf25 (pAK212) bezeichneten Genprodukte konnten keinem in der Datenbank gespeicherten Homologen zugeordnet werden. Orf24 (pAK211) wies 54 % Identität mit einem hypothetischen Protein aus *S. meliloti* auf, dessen Funktion nicht bekannt ist. In allen drei Aminosäuresequenzen konnte jedoch das Nikotinamid-Bindemotive GXGXXG (SCRUTTON et al., 1990) oder GXGXXA (WIERENGA et al., 1985) identifiziert werden (s. Abb. 37). Dies und die gemessene NAD^+-abhängige Enzymaktivität in den Rohextrakten der entsprechenden *E. coli*-Klone (s. Tab. 25) sind Indizien dafür, dass es sich hier um neue Typen von Alkohol-Dehydrogenasen handelt.

Die Ergebnisse der Durchmusterung der verschiedenen Umweltgenbanken aus komplexen Habitaten sind typisch für Verfahren, die auf der Aktivität der heterolog gebildeten Proteine basieren. Der überwiegende Teil der gefundenen Gene und der daraus abgeleiteten Proteine sind völlig neu. Einige weisen Übereinstimmungen zu Genen mit unbekannter oder noch nicht nachgewiesener Funktion auf. Zumeist zeigen sie aber nur schwache oder gar keine Verwandtschaft mit den bekannten Enzymen, die die gesuchte Funktion ausüben. Dies verdeutlicht unter anderem, dass die Vielfalt der Enzyme, die eine bestimmte Reaktion katalysieren sehr groß sein kann und bisher weitgehend unbekannt ist, auch wenn die Anzahl der bekannten und gut charakterisierten Enzyme wie im Fall der Alkohol-Dehydrogenasen schon recht groß ist. Verglichen damit scheint die Dehydratase-Reaktion ein sehr viel stärker konservierter Prozess zu sein, da hier auch im Aktivitäts-basierenden Screening keine völlig neuartigen Protein gefunden wurden. Die große Bandbreite der im Rahmen dieser Arbeit neu-isolierten Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität vermittelnden Gene ist neben der Analyse von 16S rRNA-Genen ein weiterer Nachweis für die enorme phylogenetische und metabolische Diversität der bis heute nicht-kultivierbaren Prokaryonten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass mit einem einfachen Verfahren, das auf der Aktivität der Enzyme im Wirtsorganismus *E. coli* basiert, Gene identifiziert werden können, die nur geringe oder gar keine Verwandtschaft zu bereits bekannten Organismen zeigen. Die RNA-Polymerasen in *E. coli* sind offensichtlich in der Lage eine große Menge unterschiedlicher Promotoren zu erkennen und diese Gene zu transkribieren. Die Durchmusterung von Genbanken zur Identifizierung von

neuartigen 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen hatten dieses enorme Potential ebenfalls bestätigt. Die isolierten Gene wiesen Ähnlichkeiten zu Organismen auf, die phylogenetisch weit voneinander entfernt waren. Dazu gehörten *R. eutropha*, *Cl. acetobutylicum* und *Synechocystis* PCC6803 auf (HENNE et al., 1999).

Die biochemische Charakterisierung der zu den identifizierten Alkohol-Oxidoreduktase-Genen korrespondierenden Genprodukte beschränkte sich im Rahmen dieser Arbeit auf die Messung der NAD^+-abhängigen Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität. Dazu wurden verschiedene kurzkettige Polyole und die korrespondierenden Carbonylverbindungen als Substrate eingesetzt. Etwa die Hälfte der isolierten Plasmide hatten in *E. coli* eine solche Aktivität vermittelt. Dies waren pAK103-104, pAK108-110 pAK112-113, pAK116, pAK204, pAK206, pAK208 und pAK210-213. Die maximalen spezifischen Aktivitäten der Oxidationsreaktionen in den entsprechenden Rohextrakten von *E. coli* lagen zwischen 0,013 bis 0,071 U/mg Protein. Damit waren sie deutlich niedriger als die spezifischen Aktivitäten, die für einige $NAD(P)^+$-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen mit den gleichen oder ähnlichen Substraten in Rohextrakten bestimmt wurden (0,131 bis 0,45 U/mg) (JOHNSON und LIN, 1987; DANIEL et al., 1995; LUERS et al., 1997). Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die hier gewählten Anzucht- und Analysebedingungen nicht ideal für die heterologe Genexpression bzw. die Aktivität der untersuchten Enzyme war. Durch die Optimierung von Parametern wie Anzuchtmedium und –temperatur oder der Zusammensetzung und des pH-Wertes des Testpuffers könnten sehr wahrscheinlich höhere, den bekannten Enzymen entsprechende Aktivitäten erhalten werden.

Eine mögliche Abhängigkeit der restlichen heterolog gebildeten Enzyme von anderen Kofaktoren wurde bisher noch nicht überprüft. In Frage kommen hier Coenzyme wie FAD, PQQ oder F_{420} (REID UND FEWSON, 1994). Ebenso können noch keinerlei Aussagen über die Reaktionsmechanismen von Proteinen wie Orf6, Orf24 und Orf25 (kodiert auf pAK204, pAK211 und pAK212) gemacht werden, die zwar eine NAD^+-vermittelte ADH-Aktivität aufweisen, aber ansonsten keinerlei Ähnlichkeiten zu den bisher bekannten Enzymen dieser Klasse zeigen.

4.6 Ausblick

Die beschriebenen Untersuchungen haben eindrucksvoll gezeigt, dass die mikrobielle Diversität in natürlichen Habitaten ein riesiges Potential als Quelle für neuartige Biokatalysatoren und andere biologisch-aktive Substanzen besitzt. Die vorgestellten Methoden verschafften einen kleinen Einblick in diese bisher weitgehend unerforschte Welt. Weiterhin eröffnen die vielfältigen Ergebnisse interessante Aspekte für weiterführende Arbeiten auf diesem Gebiet. In der Diskussion der Arbeit wurden bereits einige zusätzliche Experimente und Möglichkeiten erwähnt, andere werden nachfolgend kurz dargestellt.

Die neu-isolierten Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität vermittelnden Plasmide trugen Gene, die zumeist völlig neuartig waren oder nur geringe Verwandtschaft zu Genen und Genprodukten bekannter Organismen zeigten. Eine wichtige und interessante Aufgabe ist nun die Charakterisierung der darunter vorhandenen neuen Typen von Alkohol-Oxidoreduktasen (z.B. Orf6, Orf24, Orf25). Hier wären zunächst Experimente zur Determinierung der Größe der nativen Enzyme und von einzelnen Untereinheiten denkbar. Von großem Interesse wären anschließend die Ermittlung der unterschiedlichen Bedürfnisse an Kofaktoren, die Substratspektren und die Aufklärung der ablaufenden Reaktionsmechanismen. Erste Experimente dazu wurden bereits begonnen. Ein weiteres Ziel ist die Identifizierung der für den Phänotyp verantwortlichen Gene für alle Plasmide. Durch anschließende Subklonierung, heterologe Expression und Reinigung der heterolog gebildeten Genprodukte könnten die kodierten Proteine eingehend biochemisch charakterisiert werden.
Im Bezug auf die isolierten und ausführlich charakterisierten Glycerin- und Diol-Dehydratasen steht als nächstes die Frage im Vordergrund, ob eine oder auch mehrere für einen Einsatz in dem von Dupont und Genencor entwickelten Produktionsstamm in Frage kommen und ob sie eine Verbesserung darstellen. Dies wäre möglich durch eine direkte Integration der Dehydratase-Gene und der zugehörigen Reaktivierungsfaktoren in den verwendeten rekombinanten *E. coli*-Stamm. Entscheidende Parameter bei der Anzucht und Analyse unter den entwickelten Fermentationsbedingungen ist die Produktausbeute und die Stabilität des resultierenden Stammes.
Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Weiterentwicklung der Methoden zur Isolierung von mRNA aus Umweltproben. Die Erfassung und Nutzung der genetischen

und physiologischen Vielfalt bisher unentdeckter eukaryotischer Organismen birgt ein enormes Potential besonders im Hinblick auf die Entdeckung neuer biologisch-aktiver Substanzen wie Antibiotika. Die bisher verwendeten Methoden zu Zelllyse in den Umweltproben waren hauptsächlich auf prokaryotische Mikroorganismen ausgerichtet. Zur Verbesserung der Lyseeffizienz in Bezug auf die Eukryoten wäre z.B. der Einsatz von Glas Beads oder dem Enzym Zymolase vorstellbar, das zum Abbau der Zellwand bei Hefezellen benutzt wird.

Die aus den vier Boden- und Sedimentproben konstruierten Genbanken sollten für weitere interessante Durchmusterungsverfahren genutzt werden. Denkbar wäre hier der Einsatz anderer alkoholischer Substrate zur Detektion von weiteren Oxidoreduktase-Aktivität vermittelnden Genen. Bezogen auf die tatsächlich in den eingesetzten Bodenproben vorhandenen genetischen Information wurde nur ein sehr geringer Anteil kloniert und durchmustert. Eine weitere Erhöhung der Anzahl der rekombinanten Plasmide in den einzelnen Genbanken würde die Identifizierung weiterer Gene und Genprodukte mit den gewünschten Phänotypen ermöglichen.

Des Weiteren könnte durch die Amplifikation und Sequenzierung von 16S und 18S rRNA-Genen ein Einblick in die Diversität des angereicherten mikrobiellen Konsortiums erhalten werden. Das heutige Wissen zur Physiologie und Rolle der verschiedenen Prokaryoten beruht zum überwiegenden Teil auf Laborstudien mit Reinkulturen. Auf die Frage welche Bakterien und Archaea in einem bestimmten Habitat oder einer mikrobiellen Gemeinschaft in welchem Maß zum Stofffluss beitragen, gibt es nur unvollständige Anworten. Eine Möglichkeit diesen Fragestellungen auf den Grund zu gehen, bietet die Kombination aus Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit rRNA gerichteten Oligonukleotidsonden und die Mikroaudiographie, bei der die Aufnahme radioaktiver Substrate wie z.B. Propionat, Acetat, Carbonat oder Phosphat untersucht wird. Neben der radioaktiven Markierung ist auch der Einsatz von stabilen Isotopen wie z.B. ^{13}C möglich (AMANN, 2000).

Über die heterologe Expression in *E. coli* ist es sicherlich nicht möglich die Gesamtheit der physiologischen Diversität der Mikrobengemeinschaft auch nur einer ausgewählten Reaktion darzustellen. Einige Proteine werden nicht in diesem Organismus exprimiert, andere sind nicht aktiv oder sogar toxisch für den wirtseigenen Metabolismus. Darum ist es sinnvoll und notwendig in Zukunft vermehrt andere Wirtsorganismen wie *B. subtilis* oder *Streptomyces sp.* in den Aktivitäts-basierenden Durchmusterungsverfahren einzusetzen.

In Zukunft wird die Metagenomik es uns mehr und mehr gestatten die metabolischen, biochemischen und biotechnologisch relevanten Eigenschaften der Mikroorganismen auf der Basis ihres genetischen Potentials abzuleiten. Die Kombination von Daten aus der Genomanalyse der nicht-kultivierten Bakterien und der Beschreibung metabolischer Funktionsgene gewährt tiefe Einblicke in die Evolution des Metaboloms, die auch die Rekonstruktion ganzer Biosynthesewege zum Ziel hat („pathway reconstruction“). Die Umweltgenomik kann somit als Genomforschung der zweiten Generation betrachtet werden, die der natürlichen Komplexität der Mikrobengemeinschaft Rechnung trägt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Herstellung von Metagenombanken wurden Boden- und Sedimentproben von einem Zuckerrübenfeld (Göttingen), dem Fluss Grone (Göttingen), dem Golf von Eilat (Israel) und dem Solar Lake (Ägypten) verwendet. Die Proben wurden nach einer kurzen Anreicherungsphase von Glycerin- und 1,2-Propandiol-fermentierenden Mikroorganismen zur DNA-Isolierung verwendet, die nach der Methode der direkten Lyse durchgeführt wurde. Zur Erstellung der Genbanken erfolgte ein partieller Verdau der gereinigten DNA mit dem Restriktionsenzym *Bsp*143I, die Ligation in den Plasmidvektor pBluescript SK^+ und die Transformation in *Escherichia coli*. Die daraus resultierenden Genbanken enthielten zwischen 37300 und 71050 verschiedene rekombinante Plasmide mit durchschnittlichen Insertgrößen von 3,3 bis 5,6 kBp. Der Anteil der Insert-tragenden Plasmide lag zwischen 60 und 78 %.

2. Zur Identifizierung von neuartigen Coenzym B_{12}-ahängigen Glycerin- und Diol-Dehydratasen aus den Metagenombanken wurden sowohl Aktivitäts- als auch Sequenz-abhängige Durchmusterungsverfahren verwendet. Als Wirtsstämme wurden *E. coli* ECL707/pAK1 bzw. *E. coli* DH5α eingesetzt. Insgesamt konnten sieben verschiedene positive *E. coli*-Klone isoliert werden. Die dazu korrespondierenden rekombinanten Plasmide wurden mit pAK2-8 bezeichnet. In den Rohextrakten von *E. coli* DH5α/pAK2 und *E. coli* DH5α/pAK6 bis pAK8 konnte eine signifikante Coenzym B_{12}-abhängige Glycerin-Dehydratase-Aktivität nachgewiesen werden. In den Rohextrakten der anderen Klone war keine Dehydratase-Aktivität detektierbar.

3. Die inserierten DNA-Fragmente der Plasmide pAK2-5 und pAK7 wurden vollständig sequenziert. Die auf pAK6 und pAK8 lokalisierten Dehydratase-Gene waren zu 100 % identisch zu denen aus *C. freundii* und wurden nicht weiter analysiert. Die Sequenzanalyse der übrigen fünf Plasmide ergab, dass die dort lokalisierten Dehydratase-Genregionen hohe Verwandtschaft mit den Genen für die Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* (pAK2-3 und pAK7) bzw. der Diol-Dehydratase aus *S. typhimurium* (pAK4-5) aufwiesen. Aufgrund der beobachteten Sequenzähnlichkeiten und der nachfolgend durchgeführten biochemischen Untersuchungen (s. 4.) wurden die auf pAK2-3 und pAK7 kodierten Dehydratasen als Glycerin-Dehydratasen eingeordnet.

Die auf pAK4-5 kodierten Dehydratasen wurden dementsprechend als Diol-Dehydratasen klassifiziert. Die Dehydratase-Gene auf pAK2 und pAK7 lagen vollständig kloniert vor, während den entsprechenden Regionen aus pAK3-5 jeweils unterschiedlich große Abschnitte der α-Untereinheit der Enzyme fehlten. Zur Vervollständigung dieser Gene durch die entsprechenden Genabschnitte aus den jeweils nächsten verwandten Dehydratase-Genen wurden sog. „Megaprime"-PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Methode war erfolgreich für die Komplettierung der auf pAK3 und pAK5 kodierten Dehydratasen.

4. Die Dehydratase-Gene aus pAK2, pAK7 und die Hybrid-Fragmente von pAK3 und pAK5 wurden in die Expressionsvektoren pET100/D-TOPO bzw. pET101/D-TOPO subkloniert. Die Expression der Gene wurde in *E. coli* BL21 durch Induktion mit IPTG erreicht. Die auf pAK3.1 lokalisierte Glycerin-Dehydratase zeigte keine Aktivität. Die anderen drei heterolog produzierten Dehydratasen wurden mittels Affinitätschromatographie an Ni^{2+}-NTA-Agarose gereinigt. Alle drei Enzyme waren in der Lage die Substrate Glycerin, 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol zu den entsprechenden Aldehyden umzusetzen. Die beiden Glycerin-Dehydratasen (pAK2.1 und pAK7.1) zeigten die höchste Aktivität mit Glycerin, während die Hybrid-Diol-Dehydratase (pAK5.1) mit 1,2-Propandiol am aktivsten war. Durch eine Gradienten-PAGE unter nativen Bedingungen und eine anschließende Aktivitätsfärbung konnten Molekularmassen von ca. 190 kDa für die beiden Glycerin-Dehydratasen und 230 kDa für die Diol-Dehydratase ermittelt werden.

5. Alle Dehydratasen wurden in Gegenwart des Substrats Glycerin im Verlauf der Katalyse inaktiviert. Am wenigsten empfindlich erwiesen sich dabei die Hybrid-Diol-Dehydratase (pAK5.1) und die zum Vergleich herangezogene Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii*. Der als Reaktivierungsfaktor der Glycerin-Dehydratase aus *C. freundii* identifizierte Proteinkomplex DhaFG war in der Lage, die Glycerin-inaktivierten Enzyme in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} zu reaktivieren. Die ermittelten Reaktivierungsraten lagen zwischen 62 und 85 %. Des Weiteren konnte die Hemmung der gereinigten Enzyme in Gegenwart von hohen Konzentrationen von 1,3-Propandiol festgestellt werden. Die ermittelten K_i-Werte betrugen 0,85 bis 0,93 M für die Glycerin-Dehydratasen (pAK2.1, pAK7.1, *C. freundii*) und 1,36 M für die Diol-Dehydratase (pAK5.1).

6. Zur Identifizierung von Genen, die Alkohol-Oxidoreduktase-Aktivität in *E. coli* vermitteln, wurde ein Testsystem verwendet, das auf der Detektion von Carbonylproduktion durch die *E. coli*-Klone auf Indikatoragar beruhte. Als Testsubstrate wurden verschiedene C2-C4-Polyole (Glycerin, 1,2-Propandiol, 1,2-Ethandiol, 2,3-Butandiol) eingesetzt. Der verwendete Wirtsstamm war *E. coli* ECL707. Es wurden die Anreicherungsgenbanken ZRA, SLA, GEA und GIIA sowie die aus natürlichen Standorten erstellten Genbanken FN, WN und ZB auf die Zielgene durchmustert. In den Anreicherungsgenbanken konnten bei der Untersuchung von 900000 Klonen 16 positive Klone identifiziert werden, die mit *E. coli* ECL707/pAK101-116 bezeichnet wurden. Dies entsprach einem Verhältnis von einem positiven Klon je 75000 untersuchter Klone. Acht Plasmide vermittelten eine NAD^+-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität. Aus den Umweltgenbanken FN, WN und ZB wurden im Rahmen der Durchmusterung von 3000000 Klonen 15 rekombinante Plasmide isoliert, die den gewünschten Phänotyp vermittelten (Verhältnis 1:200000). Die Plasmide wurden mit pAK201-215 bezeichnet. In den Rohextrakten von sieben der rekombinanten *E. coli*-Stämme konnte eine signifikante NAD(H)-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden.

7. Die inserierten DNA-Fragmente aller 31 Plasmide wurden sequenziert. Die Sequenzanalyse von pAK101-116 ergab 38 vollständig und 16 unvollständig, potentiell für Proteine kodierende Gene. 51 der abgeleiteten Genprodukte zeigten Übereinstimmungen mit bereits bekannten Proteinen, die zu einer Vielzahl von bakteriellen Gattungen gehörten. Bei neun Plasmiden (pAK101-102, pAK105, pAK107-110, pAK115-116) konnten die für die Carbonylbildung verantwortlichen Gene identifiziert werden und vier dieser Gene zeigten Ähnlichkeiten zu Oxidoreduktase-Genen bekannter Organismen, 3 davon (*orf12*, *orf14* und *orf22*) zu Alkohol-Dehydrogenasen.
Die Sequenzanalyse der Plasmide pAK201-215 ergab insgesamt 40 für Proteine kodierende Gene. 50 % der Gene zeigten keinerlei Übereinstimmungen mit den in den Datenbanken gespeicherten Sequenzen. Die anderen wiesen schwache Ähnlichkeiten zu bereits sequenzierten Genen auf. Fünf der abgeleiteten Proteine zeigten Verwandtschaft zu bekannten Oxidoreduktasen. Durch Subklonierung konnten für die Plasmide pAK204, pAK211 und pAK212 die für den Phänotyp verantwortlichen Gene

identifiziert werden. Die daraus abgeleiteten Proteine besaßen die für die Bindung des Nikotinamid-Kofaktors typische Glycin-reiche Region.

6. LITERATURVERZEICHNIS

AARDEMA, B.W., LORENZ, M.G., KRUMBEIN, W.E. (1983). Protection of sediment-adsorbed transforming DNA against enzymatic inactivation. Appl. Environ. Microbiol. **46**: 417-420.

ABBAD-ANDALOUSSI, S., GUEDON, E., SPIESSER, E., PEPTIDEDEMANGE, H. (1996). Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-propnadiol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431. Lett. Appl. Microbiol. 22: 311-314.

AMANN, R.I. (2000). Methoden zur Bestimmung der *in situ*-Funktion von Mikroorgansimen. Biospektrum 4/2002: 274-277.

AMANN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**: 143-169.

ANDERSON, L.O., BORG, H., MIKAELSON, M. (1972). Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gel of graded porosity. FEBS Lett. **20**: 199-202.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMANN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (1987). Current protocols in molecular biology. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience. J. Wiley & Sons, New York.

AVERHOFF B. (1988). Optimierung der Succinat- und Trimethylenglycol-Produktion durch Variation von Wachstumsparametern und Zugabe externer H-Donatoren. Dissertation, Göttingen.

BACHOVIN, W.W., MOORE, K.W., RICHARDS, J.H. (1978). Mechanism of action of adenosylcobalamin: hydrogen transfer in the inactivation of diol dehydratase by glycerol. Biochemistry 17: 2218-2224.

BACHOVIN, W.W., EAGAR, R.G. JR., MOORE, K.W., RICHARDS, J.H. (1977). Mechanism of action of adenosylcobalamin: glycerol and ohter substrate analogues as substrates and inactivators for propandiol dehydratase-kinetics, stereospecifity, and mechanism. Biochem. **16**: 1082-1092.

BARIK, GALINSKY (1997). Biotech. **10**: 489.

BARNES, S.M., DELWICHE, C.F., PALMER, J.D., PACE, N.R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophily from environmental rRNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9188-9193.

BATEMAN, A., BIRNEY, E., CERRUTI, L., DURBIN, R., ETWILLER, L., EDDY, S.R., GRIFFITH-JONES, S., HOWE, K.L., MARSHALL, M, SONNHAMMER, E.L.L. (2002). The Pfam protein families database. Nucleic. Acids Res. 30: 276-280.

BEJA, O., KOONIN, E.V., ARAVIND, L., TAYLOR, L.T., SEITZ, H., STEIN, J.L., BENSEN, D.C., FELDMAN, R.A, SWANSON, R. C., DELONG, E.F. (2002). Comparatative genomic analysis of archeal genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 335-345.

BEJA, O., SUZUKI, M.T., KOONIN, E.V., ARAVIND, L., HADD, A., NGUYEN, L.P., VILLACORTA, R., AMJADI, M., GARRIGUES, C., JOVANOVICH, S.B., FELDMAN, R.A, DELONG, E.F. (2000). Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. Environ. Microbiol. 2: 516-529.

BERTHELET, M., WHYTE, L.G., GREER, C.W. (1996). Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone spin columns. FEMS Lett. **138**: 17-22.

BIRNBOIM H. C., DOLY J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1518.

BOBIK, T.A., XU Y., JETER, R.M., OTTO, K.E., ROTH, J.R. (1997). Propanediol utilization genes (*pdu*) of *Salmonella typhimurium*: Three genes for the propanediol dehydratase . J. Bacteriol. **179**: 6633-6639

BOENIGK, R. (1991). Optimierung der 1,3-Propandiol-Bildung mit *Citrobacter freundii* und Isolierung und Charakterisierung der 1,3-Propandiol-Dehydrogenase. Dissertation, Göttingen.

BOENIGK, R., BOWIEN, S., GOTTSCHALK, G: (1993). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**: 453-457.

BORNEMAN, J., SKROCH, P.W., O´SULLIVAN, K.M., PALUS, J.A., RUMJANEK, N.G., JANSEN, J.L., NIENHIUS, J., TRIPLETT, E.W. (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 1935-1943.

BORNEMAN, J., TRIPLETT, E.W. (1997). Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. Appl. Evironm. Microbiol. **63**: 2647-2653

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.

BRADY, R.O., CASTANERA, E.G., BARKER, H. A. (1962). The enzymatic synthesis of cobamide coenzymes. J. Biol. Chem. **237**: 2325 –2332.

BRADY, S.F., CHAO, C.J., HANDELSMAN, J., CLARDY, J. (2001). Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. Org. Let. **3**: 1981-1984.

BRUCE, K.D. (1997). Analysis of *mer* gene subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by flourescent-PCR-restriction fragment length polymorphism profiling. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 4914-4919.

BRUCE, K.D., HORNS, W.D., HOBMAN, J.L., OSBORN, A.M., STRIKE, P., RITCHIE, D.A. (1992). Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 2647-2653.

BULL, A.T., GOODFELLOW, M., SLATER, H. (1992). Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. Annu. Rev. Microbiol. **46**: 219-252.

BULL, A.T., WARD, A.C., GOODFELLOW, M. (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **64**: 573-606.

CHASSY, B.M., MERCENIER, A., FLICKINGER, J. (1988). Transformation of bacteria by electroporation. TIBTECH **6**: 303-309.

CHENAULT, H.K., WHITESIDE, G.M. (1987). Regeneration of nicotinamide cofactors for the use in organic synthesis. Appl. Biochem. Biotechnol. **14**: 147-197.

CHOTANI, G., DODGE, T., HSU, A., KUMAR, M., LADUCA, R., TRIMBUR, D., WEYLER, W. SAFORD, K. (2000). The commercial production of chemicals using pathway engineering. Biochim. Biophys. Acta **1543**: 434-455.

CIRINO, P.C, ARNOLD, F.H. (2002). Exploring the diversity of heme enzymes through directed evolution. *In*: S. Brakmann and K. Johnson (Ed.), Direct molecular evolution of proteins.. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.

CONWAY, T., INGRAM, L.O. (1989). Similarity of *Escherichia coli* propanediol oxidoreductase (fucO product) and an unusual alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 171: 3754-3759.

CONWAY, T., SEWELL, G.W., OSMAN, Y.A., INGRAM, L.O. (1987). Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis.* J. Bacteriol. **169**: 2591-2597.

COSTILOW R. N. (1981). Biophysical factors in growth. In: Gerhardt P., Murray G. E., Costilow N., Nester E. W., Wood W. A., Krieg R., Philips G. B. (Hrsg.) Manual of methods for general bacteriology, 66-78. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA.

COTTRELL, M.T., MOORE, J.A., KIRCHMAN, D.L. (1999). Chitinases from uncultured marine microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2553-2557.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., SNADER, K.M. (1997). Natural products in drug discovery and development. J. Nat. Prod. 60: 52-60.

DANIEL, R. (1994). Glycerinvergärung durch *Citrobacter freundii*: Sequenzierung und Charakterisierung des dha regulons. Dissertation, Göttingen.

DANIEL, R. (2002). Construction of environmental libraries for functional screening of enzyme activity, p. 63-78. In S. Brakmann and K. Johnson (Ed.), Direct molecular evolution of proteins.. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.

DANIEL, R., BOBIK, T. A., GOTTSCHALK, G. (1998). Biochemistry of coenzyme B_{12}-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. FEMS Microbiol. Rev. **22**: 553-566.

DANIEL, R., BOENIGK, R:, GOTTSCHALK, G. (1995 a). Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpressing of the corresponding genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **177**: 2151-2156.

DANIEL, R., GOTTSCHALK, G. (1992). Growth temperature-dependent activity of glycerol-dehydratase in *Escherichia coli* expressing the *Citrobacter freundii dha* regulon. FEMS Microbiol. Let. **100**: 281-286.

DANIEL, R., GOTTSCHALK, G. (1992). Growth temperature-dependent activity of glycerol dehydratase in *Escherichia coli* expressing the *Citrobacter freundii dha* regulon. FEMS Microbiol. Lett. **100**: 281-286.

DANIEL, R., STUERTZ, K., GOTTSCHALK, G. (1995 b). Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii.* J.Bacteriol. **177**: 4392-4401.

DELONG, E.F. (1992). Archaea in coastal marine environments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 5685-5689.

DEVEREUX, J., HAEBERLI, P., SMITHIES, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nuc. Acids Res. **12**: 387-395.

DOWER, W.J., MILLER, J.F., RAGSDALE, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucl. Acids Res. **16**: 6127-6145.

DUARTE, G.F., ROSADO, A.S., SELDIN, L., KEIJZER-WOLTERS, A.C., VAN ELSAS, J.D. (1998). Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. J. Microbiol. Methods. **32**: 21-29.

DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, Patent-Nr.: PCT/US/06161, 1996.

DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, Patent-Nr.: PCT/US/06163, 1996.

DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, Patent-Nr.: PCT/US/06705, 1996.

FANG, J.-M., LIN, C.-H., BRADSHAW, C.W., WONG, C.H. (1995). Enzymes in organic synthesis. Oxidoreductions. J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1**: 967-978.

FELSKE, A., ENGELEN, B., NUBEL, U., BACKHAUS, H. (1996). Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. Appl. Eviron. Microbiol. **62**: 4162-4167.

FERRIS, M.J., MUYZER, G., WARD, D.M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 340-346.

FORAGE, R.G., FOSTER, M.A. (1979). Resolution of the coenzyme B_{12}-dependent dehydratases of *Klebsiella sp*. and *Citrobacter freundii*. Biochim. Biophys. Acta **569**: 249-258.

FREY P.A., BALLINGER, M.D., REED, G.H. (1998). S-Adenosylmethionine: a ´poor man´s coezyme B_{12}` in the reaction of lysine 2,3-aminomutase. Biochem. Soc. Transact. **26**: 304-310.

FREY, P.A. (1993). Lysine 2,3-aminomutase: is adenosylmethionine a poor man´s adenosylcobalamin?. FASEB J. **7**: 662-670.

GILLESPIE, D.E., BRADY, S.F., BETTERMANN, A.D., CIANCIOTTO, N.P., LILES, M.R., RONDON, M.R., CLARDY, J., GOODMAN, R.M., HANDELSMAN, J. (2002). Isolation of antibiotics turbomycin A and B from metagenomic library of soil microbial DNA. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 4301-4306.

GIOVANNONI, S.J., BRITSCHGI, T.B., MOYER, C.L., FIELD, K.G. (1990). Genetic diversity in Saragosso Sea bacterioplankton. Nature **345**: 60-63.

GORING, C.A.I., BARTHOLOMEW, W.V. (1952). Adsorption of mononukleotides, nucleic acids, and nucleoproteins by clays. Soil Sci. **74**: 149-164.

GOTTSCHALK, G., KNACKMUSS, H.-J. (1993). Bakterien und der Abbau von Chemikalien: Natürliches und durch Kombination und Konstruktion Erreichbares. Angew. Chem. **105**: 1437-1448.

GREAVES, M.P., WILSON, M.J. (1969). The adsorption of nucleic acids by montmorillonite. Soil Biol. Biochem. **1**: 317-323.

GREENE, R.J., GUARANTE, L. (1987). Subcloning. Methods Enzymol. **152**: 512-522.

GRIFFITH, R.I., WHITELEY, A.S., O´DONNEL, A.G., BAILEY, MJ. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 5488-5491.

HANAHAN, D. (183). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. J. Mol. Bol. **166**: 557-580.

HANDELSMANN, J., RONDON, M.R., BRADY, S.F., CLARDY, J., GOODMAN, R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem. & Biol. **5**: 245-249.

HARTMANIS, M.G.N., STADTMAN, T.C. (1985). Diol metabolism and diol dehydratase in *Clostridium glycolicum*. Arch. Biochem. Biophys. **245**: 144-152.

HARTMANIS, M.G.N., STADTMAN, T.C. (1986). Solubilization of a membrane-bound diol dehydratase with retention of EPR *g* = 2.02 signal by using 2-(N-cyclohexylamino) ethanesulfonic acid buffer. Pro. Natl. Acad. Sci. **84**: 76-79.

HEALY, F.G., RAY, R.M., ALDICH, A.C., WILKIE, L.O., INGRAM. L.O., SHANMUGAM, K.T. (1995). Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol**. 43**: 667-674.

HENNE, A., DANIEL, R., SCHMITZ, R.A., GOTTSCHALK, G. (1999). Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. Appl. Evironm. Microbiol. **65**: 3901-3907.

HENNE, A., SCHMITZ, R.A., BÖMEKE, M., GOTTSCHALK, G, DANIEL, R. (2000). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. Appl. Evironm. Microbiol. **66**: 3113-3116.

HENTSCHEL, U., ZIEBUHR, W., HACKER, J. (2002). Die Suche nach neuen Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten. Sonderausgabe Biospektrum 2002: 489-491.

HILVERT, D., TAYLOR, S.V., KAST, P. (2002). Using evolutionary strategies to investigate the structure and function of chorismate mutases. *In*: S. Brakmann and K. Johnson (Ed.), Direct molecular evolution of proteins.. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.

HOCHULI, E., BANNWARTH, W., DOBELI, H., GENTZ, R., STÜBER, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. Bio Technology **6**: 1321-1325.

HOLBEN, W.E. (1996). Isolation and purification of bacterial community DNA from environmental samples, p. 431-436. In: Manual of environmental microbiology, C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach, M.V. Walter (Eds.), ASM Press, Washington, USA.

HOLDEMAN, L.V., CATO, E.P., MOORE, W.E.C. (1977). Anaerobe laboratory manual. 4th ed. Anaerobe Laboratory, Virginian Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.

HOLMES, D.S, QUIGLEY, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. **114**: 193-197.

HUGENHOLTZ, P., GOEBEL, B.M., PACE, N.R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J. Bacteriol. **180**: 4765-4774.

HUGES, J.B., HELLMANN, J.J., RICKETTS, T.H., BOHANNAN, B.J.M. (2001). Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 4399-4406.

HUMMEL, W. (1997). New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **58**: 145-184.

HUMMEL, W. (1999). Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreduktases: recent developments. TIBTECH **17**: 487-492.

HUNGATE, R.E. (1969). A roll tube for cultivation of strict anaerobes. In: NORRIS, J. R., RIBBONS, D. W. (Hrsg.), Methods in Microbiology Vol. 3:177-132. Academic Press, London.

HURT, R.A., QIU, X., WU, L., ROH, Y., PALUMBO, A.V., TIEDJE, J.M., ZHOU, J. (2001). Simultaneous recovery of RNA and DNA from solis and sediments. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 4495-4503.

INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene **96**: 23-28.

JACKSON C.R., HARPER J.P., WILLOUGHBY D., RODEN E.E., CHURCHILL P.F. (1997). A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. Appl. Environm. Microbiol. **63**: 4993-4995.

JACOBSEN, C.S., RASMUSSEN, O.F. (1992). Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2458-2462.

JOHNSON, C.L., PECHONIK, E., PARK, S.D., HAVEMANN, G.D., LEAL, N.A., BOBIK, T. (2001). Functional genomic, biochemical, and genetic characterization of the *Salmonella pduO* gene, an ATP:Cob(I)alamin adenosyltranferase gene. J. Bacteriol. **183**: 1577-1584.

JOHNSON, E.A., BURKE, S.K., FORAGE, R.G., LIN, E.C.C. (1984). Purification and properties of dihydroxyacetone kinase from *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. **160**: 55-60.

JOHNSON, E.A., LIN, E.C.C. (1987). *Klebsiella pneumoniae* 1,3-propanediol: NAD^+-oxidoreductase. J. Bacteriol. 169: 2050-2054.

KAJIURA, H., MORI, K., TOBIMATSU, T., TORAYA, T. (2001). Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcoalamin-dependent glycerol dehydratase. J. Biol. Chem. **276**: 36514-36519.

KNIETSCH (1999). Identifizierung neuartiger Glycerin-Dehydratasen. Diplomarbeit, Göttingen.

KOZAK, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles. Microbiol. Rev. **47**: 1-45.

LORENZ, M.G., WACKERNAGEL, W. (1987). Adsorption of sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 2948-2952.

LUERS, F., SEYFRIED, M., DANIEL, R., GOTTSCHALK, G. (1997). Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. FEMS Microbiol. Lett. **154**: 337-345.

MACIS, L., DANIEL, R., GOTTSCHALK, G. (1998). Properties and sequence of the coenzyme B_{12}-dependent glycerol dehydratase of Clostridium pasteurianum. FEMS Microbiol. Lett. **164**: 21-28.

MACKINTOSH, R.W., FEWSON, C.A. (1988a). Benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase II from *Acinetobacter calcoaceticus*. Purification and preliminary characterization. Biochem. J. **250**: 743-751.

MACKINTOSH, R.W., FEWSON, C.A. (1988b). Bezynl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase II from *Acinetobacter calcoaceticus*. Substrate specifities and inhibition studies. Biochem. J. **255**: 653-661.

MAJERNIK, A., GOTTSCHALK, G., DANIEL, R. (2001). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring $Na^+(Li^+)/H^+$ antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. J. Bacteriol. **183**: 6645-6653.

MARCK, C. (1988). „DNA strider“: a „C“ programm for fast analysis of DNA and protein sequences on Apple Macintosh family computers. Nucl. Acids Res. **16**: 1829-1836.

MARGOLIS, J., KENRICK, K.G. (1967). Polyacrylamide gel electrophoresis across a molecular sieve gradient. Nature **214**: 1334-1336.

MCGREGOR, W.G., PHILIPS, J., SUELTER, C. (1974). Purification and kinetic characterization of a monovalent cation-activated glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes*. J. Biol. Chem. **249**: 3132-3139.

MEYNIAL-SALLES, I. (2002). Biological production of 1,3-propanediol using a new B_{12}independent glycerol dehydratase. *In*: The world of microbes. Joint meeting of the three divisions of International Union of Microbiological Societies. Abstracts.

MILLER, J. H. (1972).. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Habor, New York.

MISKIN, I.P., FARRIMOND, P., HEAD, I.M. (1999). Identification of novel bacterial linaeges as active members of microbial populations ina freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. Microbiology **145**: 1977-1987.

MOORE, W.E.C., HOLDEMAN, L.V. (1970) in: CATO, E.P., CUMMINS, C.S., HOLDEMAN, L.V., JOHNSON, J.L., MOORE, W.E.C., SMIBERT, R.M., SMITH, L.D.S. (eds.). Outline of clinical methods in anaerobic bacteriology, 2nd revision. Virginia Polytechnic Institute Anaerobe Laboratory, Blacksburg, Virginia.

MORAN, M.A., TORSVIK, V.L., TORSVIK, T., HODSON, R.E. (1983). Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. Appl. Environm. Micobiol. 59: 915-918.

MORI, K., TOBIMATSU, T., HARA, T., TORAYA, T. (1997). Characterization, sequencing, and expression of the genes encoding a reactivating factor for glycerol-inactivated adenosylcobalamin-dependent diol-dehydratase. J. Biol. Chem. **272**: 32034-32041.

MÜLLER, H.-J., BRUCHHAUS, I. (1997). Problematik der Isolierung genomischer DNA. Biospektrum 1/97: 68/73.

MUNSON, M.A., NEDWELL, D.B., EMBLY, T.M. (1997). Phylogenetic diversity of *Archaea* in sediment samples from coastal salt marsh. Appl. Eviron. Microbiol. 63: 4729-4733.

MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. (1992). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 695-700.

NISHIZAWA, H., KITA, N. OKIMURA, S., TAKAO, E., ABE, Y. (1988). Determination of molecular weight of native proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis. Electrophoresis 9: 803-806.

NOZAKI, K., INABA, K., KURODA, T., TSUDA, M., TSUCHIYA, T. (1996). Cloning and sequencing of the gene for Na^+/H^+ antiporter of *Vibrio parahaemolyticus*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 222: 774-779.

OGRAM, A., SAYLER, G.S., BARKAY, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. J. Microbiol. Meth. **7**: 57-66.

OGRAM, A., SUN, W., BROCKMANN, F.J., FREDRICKSON, J.K. (1995). Isolation and characterization of RNA from low-biomass deep subsurface sediments. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 763-768.

OSBURNE, M.S., GROSSMANN, T.H., AUGUST, P.R., MACNEIL, I. (2000). Tapping into microbial diversity for natural products drug discovery. ASM News **66**: 411-417.

PACE, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science **276**: 734-740

PACE, N.R. (1999). Microbial ecology und diversity. ASM News **65**: 328-333.

PACE, N.R., STAHL, D.A., LANE, D.J., OLSEN, G.J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. Adv. Microbiol. Ecol. **9**: 1-55.

PAWELKIEWICZ, J., ZAGALAK, B. (1965). Enzymic conversion of glycerol into β-hydroxypropionaldehyde in a cell-free extract from *Aerobacter aerogenes*. Acta Biochim. Polon. **12**: 207-218.

PEARSON, W.R., LIPMANN, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. **85**: 2444-2448.

PFENNIG, N., LIPPERT, K. D. (1966). Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mircobiol. **55**: 245-256

POZNANSKAYA, A.A., TANIZAWA, K., SODA, K., TORAYA, T., FUKUI, S. (1979). Coenzyme B_{12}-dependent diol dehydratase: purification, subunit heterogeneity, and reversible association. Arch. Biochem. Biophys. **194**: 379-386.

POZNANSKAYA, A.A., YAKUSHEVA, M.I., YAKOVLEV, V.A. (1977). Study of the mechanism of action of adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. II. Inactivation kinetics of glycerol dehydratase complexes with adenosylcobalamin and its analogs. Biochim. Biophys. Acta. **484**: 236-243.

QUATTARA, A.S., CUZIN, N., TRAORE, A.S., GARCIA, J.-L. (1992). Anaerobic degradation of 1,2-propanediol by a new *Desulfovibrio* strain and *D. alcoholvorans*. Arch. Microbiol. **158**: 218-225.

RAMOA, M.J., ARCHER, M., MOURA, I., MOURA, J.J., LEGALL, J., ENGH, R., SCHNEIDER, M., HUBER, R. (1995). Crystal structure of a xanthine oxidase-related aldehyde-oxidoreductase from *Desulfovobrio gigas*. Science **270**: 1170-1176.

REANNEY, D.C., GOWLAND, P.C., SLATER, J.H. (1983). Genetic interactions among microbial communities, p. 379-421. In J.H. Slater, R. Whittenburry, and J.W.T. Wimpenny (ed.), Microbes in their natural environment. Cambridge University Press, Cambridge.

REID, M.F., FEWSON, C.A. (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. Crit. Rev. Mikrobiol. **20**: 13-56.

ROMANOWSKI, G., LORENZ, M.G., WACKERNAGEL, W. (1991). Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNaseI. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 1057-1061.

RONDON, M.R., AUGUST, P.R., BETTERMANN, A.D., BRADY, S.F., GROSSMAN, T.H., LILES, M.R., LOIACONO, K.A., LYNCH, B.A., MACNEIL, I.A., MINOR, C., TIONG, C.L., GILMAN, M., OSBURNE, M.S., CLARDY, J. HANDELSMAN, J. GOODMAN, R.M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2541-2547.

RONDON, M.R., GOODMAN, R.M., HANDELSMAN, J. (1999). The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. TIBTECH **17**: 403-409.

ROSADO, A.S., DUARTE, G.F., SELDIN, L., VAN ELSAS, J.D. (1998). Genetic diversity of *nifH* Gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 2770-2779.

RÖSKENS, H. (1997). Subklonierung der einzelnen Strukturgene der Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin-Dehydratase aus *Citrobacter freundii* und Identifizierung der Coenzym B_{12}-bindenden Untereinheit. Diplomarbeit, Göttingen.

RUCH, F.E., LENGELER, J., LIN, E.C.C. (1974). Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol. **119**: 50-56.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (2.Aufl.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Habor, New York, USA

SANGER, F., NICKELEN, S., COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.

SANTOSA, D.A. (2001). Rapid extraction and purification of environmental DNA for molecular cloning applications and molecular diversity studies. Mol. Biotech. 17: 59-64.

SCHAGGER, H., VON JAGOW, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. **166**: 368-379.

SCHLEPER, C., DELONG, E.F., PRESTON, C.M., FELDMAN, R.A., WU, K.Y., SWANSON, R.V. (1998). Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations in the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. J. Bacteriol. 180: 5003-5009.

SCHLEPER, C., ECK, J. (2000). Umweltgenomik: Charakterisierung und Nutzung nicht-kultivierter Mikroorganismen. Biospektrum 6/2000: 449-451.

SCHLEPER, C., SWANSON, R.V., MATHUR, E.J., DELONG, E.F. (1997). Characterization of a DNA from the uncultivated psychrophilic archeon *Cenarchaeum symbiosum*. J. Bacteriol. 179: 7803-7811.

SCHNEIDER, Z., LARSEN, E.G., JACOBSON, G., JOHNSON, B.C, PAWELKIEWICZ, J. (1970). Purification and properties of glycerol dehydrase. J. Biol. Chem. **245**: 3388-3396.

SCHNEIDER, Z., PAWELKIEWICZ, J. (1966). The properties of glycerol dehydratase isolated from *Aerobacter aerogenes*, and the properties of the apoenzyme subunits. Acta Biochim. Polen. **8**: 311-328.

SCHULZ, R., MEURER, G., SCHLEPER, C. (2002). Das Metagenom als Quelle neuartiger rekombinanter Wirkstoffe und Enzyme. Sonderausgabe Biospektrum 2002: 498-501.

SCHULZE, R., MEURER, G., SCHLEPER, C. (2002). Das Metagenom als Quelle neuartiger rekombinanter Wirkstoffe und Enzyme. Biospektrum Sonderausgabe 2002: 498-501.

SCHÜTZ, H., RADLER, F. (1984). Anaerobic reduction of glycerol to 1,3-propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. System. App. Microbiol. **5**: 169.178.

SCRUTTON, N.S., BERRY, A., PERHAM, A.R. (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. Nature 343: 38-43.

SEIFERT, C. (2001). Untersuchungen zur Inaktivierung und Reaktivierung der Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin-Dehydratasen aus *Citrobacter freundii* und *Clostridium pasteurianum*. Dissertation, Göttingen.

SEIFERT, C., BOWIEN, S., GOTTSCHALK, G., DANIEL, R. (2001). Identification and Expression of the Genes and Purification and Characterization of the Gene Products Involved in Reactivation of Coenzyme B_{12}-dependent Glycerol Dehydratase of *Citrobacter freundii*. Eur. J. Biochem. **268**: 2369-2378.

SEOW, K.-T., MEURER, G., GERLITZ, M., WENDT-PIENKOWSKY, E., HUTCHINSON, C.R., DAVIES, J. (1997). A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. J. Bacertiol. **179**: 7360-7368.

SEYFRIED, M. (1996). Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der Coenzym B_{12}-abhängigen Glycerin-Dehydratase aus *Citrobacter freundii*. Dissertation, Göttingen.

SEYFRIED, M., DANIEL, R., GOTTSCHALK, G. (1996). Cloning, sequencing, and overexpression of the genes encoding Coenzyme B_{12}-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. J. Bacteriol. **178**: 5793-5796.

SHIBATA, N., MASUDA, J., TOBIMASTU, T., TORAYA, T., SAUTO, K., MORIMOTO, Y., YASUOKA, N. (1999). A new mode of B_{12} binding and the direct participation of a potassium ion in enzyme catalysis: X-ray structure of diol dehydratase. Structure **7**: 997-1008.

SMILEY, K.L., SOBOLOV, M. (1962). A cobamide-requiring glycerol dehydratase from an acrolein- forming Lactobacillus. Arch. Biochem. Biophys. **97**: 538-543.

SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**: 503-517.

SPRENGER, G.A., HAMMER, B.A., JOHNSON, E. A., LIN, E.C.C. (1989). Anaerobic growth of *Escherichia coli* on glycerol by importing genes of the *dha* regulon from *Klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol. **135**: 1255-1262.

STEFFAN, R.J., GOKSØYR, J., BEJ, A.K., ATLAS, R. (1988). Recovery of DNA from soil and sediments. Appl. Environs. Microbiol. **54**: 2908-2915.

STEIN, J.L., MARSH, T.L., WU, K.Y., SHIZUYA, H., DeLONG, E.F. (1996). Characterizaton of uncultivated prokaryotes: Isolation and analysis of a 40-Kilobase-Pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. J. Bacteriol. **178**: 591-599.

STIEB, M., SCHINK, B. (1984). A new 3-hydroxybutyrate fermenting anaerobe, *Ilyobacter polytrophus*, gen. nov. sp. nov., possessing various fermentation pathways. Arch. Microbiol. **140**: 139-146.

STOKES, H.W., HOLMES, A.J., NIELD, B.S., HOLLEY, M.P., NEVALAINEN, K.M.H., MABBUTT, B.C., GILLINGS., M.R. (2001). Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. Appl. Environ. Microbiol. 67:5240-5246.

STRICKEBERGER, M.W. (1996). *In*: Evolution. Johnes & Bartlett Publishers, Boston, USA.

STUDIER, F.W., MOFFAT, B:A. (1986). Use of bacteriophage T/ RNA polymerase to selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. **189**: 113-130.

SUGIURA, M., OIKAWA, T., HIRANO, K., SHIMIZU, H., HIRATA, F. (1978). Purification and some properties of glycerol dehydrogenase from *Erwinia aroideae*. Chem. Pharm. Bull. **26**: 716-721.

TANG, C.-T., RUCH, F.E., LIN, E.C.C. (1979). Purification and properties of a nicotinamide adenine dinukleotid-linked dehydrogenase that serves *Escherichia coli* mutant for glycerol metabolism. J. Bacteriol. **140**: 182-187.

TEBBE, C.C. (2002). Marker-Gene in Böden. Biospektrum 3/2002: 270-271.

TEBBE, C.C., VAHJEN, W. (1993). Interference of Humic Acids and DNA Extracted Directly from Soil in Detection and Transformation of Recombinant DNA from Bacteria and Yeast. Appl. Environm. Micorbiol. **59**: 2657-2665.

TESKE, A., RAMSING, N.B., HABICHT, K., FUKUI, M., KÜVER, J., JORGENSEN, B.B., COHEN, Y. (1998). Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt). Appl. Environ. Microbiol. 64: 2943-2951.

TOBIMATSU, T., HARA, T., SAKAGUCHI, M., KISHIMOTO, Y., WADA, Y., ISODA, M., SAKAI, T., TORAYA, T. (1995). Molecular cloning, sequencing, and expression of genes encoding adenosylcobalamin-dependent diol dehydrase of *Klebsiella oxytoca*. J. Biol. Chem. **270**: 7142-7148.

TORAYA, T. (2000). Radical catalysis of B_{12} enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. Cell. Mol. Life Sci. **57**; 106-127.

TORAYA, T., HONDA, S., FUKUI, S. (1979). Fermentation of 1,2-propanediol and 1,2-ethanediol by some genera of *Enterobacteriaceae*, involving coenzyme B_{12}-dependent diol dehydratase. J. Bacteriol. **139**: 39-47.

TORAYA, T., SHIRAKASHI, Y., KOSUGA, T., FUKUI, S. (1976). Substrate specifity of coenzyme B_{12}-dependent diol dehydrase: Glycerol as both a good substrate and a potent inactivator. Biochem. Biophys. Res. Comm. **69**: 475-480.

TORAYA, T., SUGIMOTO, Y., TAMAO, Y., SHIMIZU, S., FUKUI, S. (1971). Propanediol dehydratase system. Role of monovalent cations in binding of vitamin B_{12} coenzyme or its analogs to apoenzyme. Biochemistry **11**: 2599-2606.

TORAYA, T., KUNO, S., FUKUI, S. (1980). Distribution of coenzyme B_{12}-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*. J. Bacteriol. **141**: 1439-1442.

TORAYA, T., USHIO, K., FUKUI, S., HOGENKAMP, H.P.C. (1977). Studies on the mechanism of adenosylcobalamin-dependent diol-dehydratase reaction by the use of analogs of the coenzyme. J. Biol.Chem. **252**: 963-970.

TORAYA, T., MORI, K. (1999). A reactivating factor for coenzyme B_{12}-dependent diol dehydrase. J. Biol. Chem. **274**: 3372-3377.

TORAYA, T., SHIRAKASHI, T., KOSUGA, T., FUKUI, S. (1976). Substrate specifity of coenzyme B_{12}-dependent diol dehydratase: Glycerol as both a good substrate and a potent inactivator. Biochem. Biophys. Res. Comm. **69**: 475-480.

TORAYA, T., USHIO, K., FUKUI, S., HOGENKAMP, H.P.C. (1977). Immunochemical evidence for the difference between coenzyme-B_{12}-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. Eur. J. Biochem. **76**: 285-289.

TORSVIK, V.L. (1980). Isolation of bacterial DNA from soil. Soil Biol. Biochem. **12**: 15-21.

TORSVIK, V.L., GOKSOYR, J. (1978). Determination of bacterial DNA in soil. Soil Biol. Biochem. **20**: 7-12.

TORSVIK, V.L., GOKSOYR, J., DAAE, F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56: 782-787.

TREVORS, J.T. (1996). DNA in soil: adsorption, genetic transformation, molecular evolution and genetic microchip. A. v. Leeuwenhoek **70**: 1-10.

TSAI, Y.-L., OLSON, B.H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 1070-1074.

TSAI, Y.-L., OLSON, B.H. (1992). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2292-2295.

VERGIN, K.L., URBACH, E., STEIN, J.L., DeLONG, E.F., LANOIL, B.D., GIOVANNONI, S.J. (1998). Screening of a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragment reaveals four clones related to members of the order *Planctomycetales*. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 3075-3078.

VIEILLE, C., ZEIKUS, G.J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**: 1-43.

VIEIRA, J., MESSING, J. (1982). The pUC plasmids, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19**: 259-268.

V**OGELSTEIN, B., GILLESPIE, D.** (1979). Preparation and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. SCI. USA **76**: 615-619.

WARD, D.M., WELLER, R., BATESON, M.M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature **345**: 63-65.

WIERENGA, R.K., DEMAEYER, M.C.H., HOL, W.G.J. (1985). Interaction of pyrophosphate moieties with α-heilces in dinucleotid binding proteins. Biochemistry 24: 1346-1357.

WILKINSON, D.E., JEANICKE, T., COWAN, D.A. (2002). Efficient molecular cloning of environmental DNA from geothermal sediments. Bioechn. Let. 24: 155-161.

WILLS, C. (1976). Production of yeast alcohol dehydrogenase isoenzymes by selection. Nature 261:26-29.

WILSON, E.O. (1992). *In*: The diversity of life, pp. 131-162: W.W. Norton & Co. New York, USA.

WINTZINGERODE v., F., GÖBEL, U.B., STACKEBRANDT, E., (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Let. **21**:213-229.

WITT, U., MÜLLER, R.-J., AUGUSTA, J., WIDDECKE, H., DECKWER, W.-D., (1995). Synthesis, properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol. Macromol. Chem. Phys. **195**: 793-802.

WOESE, C.R. (1987). Bacterial evolution. Microbiol. Rev. **51**: 221-271.

YAMADA, H., NAGAO, A., NISHISE, H., TANI, Y. (1982). Formation of glycerol dehydrogenase by microorganisms. Agric. Biol. Chem. **46**: 2325-2331.

YAMANISHI, M., YUNOKI, M., TOBIMATSU, T., SATO, H., MATSUI, J., DOKIYA, A., IUCHI, Y., Oe, K., SUTO, K., SHIBATA, N., MORIMOTO, Y., YASUOKA, N., TORAYA, T. (2002). The crystal structure of coenzyme B_{12}-dependent gylcerol dehydratase i complex with cobalmin and propane-1,2-diol. Eur. J. Biochem. **269**: 4484-4494.

YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp8 and pUC19 vectors. Gene **33**: 103-119.

YIP, T.-T., NAKAGAWA, Y., PORTATH, J. (1989). Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zi(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography. Anal. Biochem. **183**: 159-171.

YOUNG, P. (1998). Major Microbial Diversity Initiative Recommended. ASM News **63**: 417-421.

ZHOU, J., BURNS, M. A., TIEDJE, J.M. (1995). DNA Recovery from soils of diverse composition. Appl. Environm. Microbiol. **62**: 316-322.

ZIMMER, R., GIBBINS, A.M.V. (1997). Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artifitcial chromosome librariy. Genomics **42**: 217-226.

7 ANHANG

Der Anhang enthält die kompletten Nukleotidsequenzen der Plasmide pAK2 bis 5 und pAK7, sowie von pAK101 bis 116 und pAK200 bis 215.

7.1 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK2

```
   1 gatcgccttc gtgagtggct gcgataccaa tgcctttgcc gcagtcatgc gggctgccgc cgccgacggt
  71 cacgatgata tcgcactgct ctttacgaaa gacttccagg ccgtcgcgca cgttggtgtc ttttgggttt
 141 ggctcaacac cgtcaaacac caccacgtca ataccggctt cacgcagatg tgcgagggtt ttatctaccg
 211 cgccgtcttt aattgcccgc aggcctttat cagtaaccag cagcgctttt ttaccgccca acagtttgca
 281 gcgttcgcca accacagaaa tagcattggg gccaaaaaag ttcacatttg gcaccagata atcaaacata
 351 cgatagctca tattatacct tcttagattt aaattataat tcagagaaac aattcaatgc gggttcagct
 421 aataatctgt cctgttcgac ggtgccgcca ctcacaccga cagcaccgac tatttttcca tttaataaaa
 491 ccggcaggcc accgccaaaa ataataatgc gttgttgatt ggttagctgt aacccatata gcgaagcacc
 561 aggttgtacc gcatcggtaa tttcatgagt gccctgacgc aggcagcagg cggtataagc tttattaaga
 631 gaaatatcac agctggtgac aaacgcttcg tccatgcgtt gcatgagtag tgtattcccg ccgtggtcca
 701 ccacggaaaa gactactgga acgttgattt caagggcttt aacctcgaca gcggtcgcca ttttctttgc
 771 ggctgccagc gtgatggtgg tgattggttg ggtctttttc acagaatctc ctgtcaattt tgtagggctg
 841 aggtcacgaa aaatatcgtg caacagctat tttttatcat tgagttttct ttattctcgc gctgatcgtt
 911 attaagtcaa tactgtgaag aattctaaat tggtaagtta attacctttg cgtagcgttt attgataatg
 981 atcatttaac cccgtcacaa ttcgctgtga atatttcaga taactgtttc aatatgaaac gtagaaaatt
1051 aattacgtat caaattggaa cgaaattaat tttatttttt tacaggtctg ctcatttaaa gttcggctat
1121 tgctgatgaa aggcgattgc cggggattta ggcctccggt gatgcggccc ggcgtcccta ttatttactt
1191 tttgagtcaa tgcgctatga gaagatcaaa acgattcgaa gtccttgccc aacggcctgt aaatcaggat
1261 gggctgattg gcgaatggcc ggaagagggg ctaatcgcta tggaaagccc ctacgatccg gcgtcgtcgg
1331 tgaaggtgga aaatggccgt attgtcgaac tggacggtaa agaccgcgca cagttcgaca tgatcgaccg
1401 ttttatcgcc gactacgcaa ttaacgttgc ggaaaccgaa cgggcaatgc aactcgacgc gttggagatc
1471 gccagaatgt tggtggatat tcacgttagt cgggaagaga ttattgccat taccactgcg atcaccccgg
1541 cgaaagcggt ggaggtgatg gcgaaaatga acgtggtgga aatgatgatg gcgctgcaaa aaatgcgtgc
1611 cagacgcacg ccctctaacc agtgccacgt caccaacctg aaagataacc cggtacaaat tgccgccgac
1681 gccgccgaag ccgggatccg tggtttttct gaacaagaaa ctaccgtagg tatcgcccgc tatgcgccgt
1751 ttaatgcgct ggcgctgctg gtcggttcac agtgcggccg ccctggtgtg ctcacccaat gttccgttga
1821 agaagccacc gaactggaac tggggatgcg cggcttaacc agctacgccg aaacggtatc ggtatacggc
1891 acggagtcgg tgtttaccga tggcgatgat acgccgtggt ccaaagcgtt tctcgcctcg gcctatgctt
1961 ctcgtggcct gaagatgcgc tacacctccg gcaccggttc ggaggcgctg atgggttatt cagaaagtaa
2031 atcgatgctg tacctggagt cgcgctgcat ttttattacc aaaggcgcgg gtgtccaggg gctgcaaaac
2101 ggcgcggtca gctgtatcgg gatgactggc gcagtgccgt cggggattcg tgcggtgctg gcggaaaacc
2171 tgattgcctc gatgctcgac cttgaagtgg catcagcgaa tgaccagacc ttttcacact ccgatattcg
2241 tcgcaccgcg cgcaccttga tgcagatgct gcccggcacc gactttatct tctccggcta tagcgcggta
2311 ccgaactacg acaacatgtt tgccgggtcg aatttcgacg ccgaggactt cgatgattac aacattctac
2381 agcgtgacct gatggttgat ggcggcctgc gtccggtaac ggaagaggaa actatcgcca ttcgcaataa
2451 ggctgcgcgt gctattcagg cggtgttccg cgagctgggg ctgccgttga ttagtgatga agaagtcgac
2521 gccgccacct acgctcacgg cagcaaagat atgccagcgc gtaatgtggt ggaggatctg gccgccgagg
2591 aagagatgat gaagcgcaat attactgggc tggatattgt cggtgcgctg aattccagcg gctttgaaga
2661 tattgccagc aatattctca acatgctgaa gcagcgtgtg accggcgatt atctgcaaac gtccgccatt
2731 ctggatcgcc aattcgaggt ggttagcgcc gttaacgaca tcaatgatta tcagggaccc ggcaccggct
2801 atcgcatttc tgccgaacgc tgggcggaaa ttaaaaatat cgcgggcgtg gttcagccca gcgccattga
2871 ataaggcggt acacggtgga atgtacaatt gaacgtaagc cggttttcat cttgcaggtg agcgagggcg
2941 aggcggcaaa agcgggcgat cgcgcggatg aagtggtgat tggcgtcggg ccagcctttg ataaatatca
3011 gcacaaaacc ctgattgata tgccgcacaa agcgatccta aaagagctgg tggccggcat tgaagaagag
3081 gggctgcatg cgcgggtggt cagaattctg cgcacctcgg atgtctcttt tatggcctgg gatgcggcga
3151 acctcagcgg ttctggcatt gggattggta ttcagtcgaa aggaaccacg gttattcatc agcgtgattt
3221 gctgccgctg agtaacctgg aattgttctc ccaggccccg ctgctaacgc tggaaactta tcgccagatc
3291 ggtaagaacg ccgcgcgtta tgcacgtaaa gagtcgccat cgccggtccc ggtggtcaat gaccaaatgg
3361 tgcgacccaa atttatggcc aaggccgcgc tgtttcatat caaagaaacc aaacacgtgg tgcaggatgc
3431 cgcgcctgtc acgctgcata ttgcactcgt aaaggaatga ccatgaacga caacatcatg accgcgcagg
3501 attacccgtt agcgacccgc tgcccggaga aaatcctcac tcccaccggg aagccgttaa ccgacattac
3571 ccttgagaat gtgctggctg gacgcgtggg gccacaggat gtgcgtattt ctcagcaaac gctggagtat
3641 caggcgcaga ttgccgagca gatgcagcgt cacgccgtgg cgcgcaattt ccgccgtgcg gcggagctga
3711 tcgccatccc ggatgcccgc atactggaga tctacaatgc gctgcgtccg tttcgctcat cgcttgcaga
3781 gctgctggcc attgctgatg aactggaaca cacctggcat gccacggtga acgccgggtt tgtccgcgag
3851 tcggcggaag tgtaccagca gagaaacaag ctgcgtaaag gcagccagta acggggtggg gctatgtcgt
3921 taattgcagg gattgatatt ggcaacgcca ccacggaagt ggcgctggcg caggatggcc ggtttgtcgc
3991 cagcgggatt gtcgccacca cgggtatgaa agccacgcgg gacaatattg ccggggtggt cgcctccctg
4061 cagcaggcac tggataacac gccgtggtcg tttcaggatg tggcgaaaat tttcatcaac gaggccgcgc
4131 cggtgattgg tgatgtggca atggagacga tcaccgaaac catcatcact gaatcgacaa tgattggtca
4201 taacccgcaa acacccggcg gcgttggcgt ggggatgggc accacgatcg ccgtggcgaa actggcgtcg
4271 ttgcgcgagg atcagtttgc tcagggatgg atcccgctgg tgggcgaaga gatagatttc ctcgaggcgg
```

```
4341 tttggcttat caatgaggcg ctggatcgtg gtgtcaacgt ggtggcggct atcctgaaaa aagatgatgg
4411 cgtactggtc aataatcgcc tgcacagaac gatgccggtg atcgatgaag tcacgttgct ggagaaggtt
4481 ccggaaggcg tgcaggcggc agtagaagtt gcgacgacgg gacaggtagt gcgggtattg tcaaatcctt
4551 acggcatcgc caccttcttt gccctgacgc cggaggaaac gcaaacgatc gtgccgatcg ccagagcgct
4621 gatcggcaac cgctccgccg tggtgctgaa aactccgcag ggtgatgtgc gctcaagggt gatcccggcg
4691 ggcaagatct ttatcagtgg agaaaagcgc ggcggtgaag ctgatgtagc acaaggggca caggcgatta
4761 tgcaagcgat gaacgcctgt gtgccggtct gcgatattca cggcgaggct ggtactcacg cgggcggcat
4831 gctggagcgc gtgcgtaagg tgatggcctc gctgagcgga gacgatatga attcggtgca tattcaggat
4901 ctgctggcgg ttgatacgtt tattccccgc aaagtccatg gcggtatcgc cggggaatat tcaatggaaa
4971 atgctgttgg cattgcggcg atggtgaaat ccgatcggtt acagatgcag gcgatcgcca gtgagttgag
5041 tgtgcgactt aacacgcccg ttgaggtggg gggagtggag gccaatatgg cggtggccgg ggcattgacg
5111 acgcccgggt gtgcagcgcc gctggcgatc ctcgacttag gtgcaggatc caccgatgcc gcgattatca
5181 atggcgatgg taccgtcaaa gcggtacatc tggctggggc agggaacatg gtcagcctgc tgatcaaaac
5251 ggagttgggt ctgagcgatt cttttctggc ggaggagata aagaaatatc cgctggcgaa agtggagagt
5321 ctgttcagta ttcgccatga gaacggtgcg gtggagttct ttcgcgaacc gctcagccca tcagtgttcg
5391 ccaaggtggt gtatctgaaa gcgggcgagc tgatcccggt agataaccag acctcgctgg aaaaaattcg
5461 tctggtgcgc cgaaaggcaa aagagaaggt ctttgtgacg aactgtctgc gcgcgttgca tcaggtctca
5531 cccggtggct caattcgcaa tatctctttt gtggtgttgg tgggcggttc gtcgctggat tttgaaatcc
5601 cgcagatgat caccgatgcg ttggcgaatt acggtgttgt tgccggtcag ggtaacattc gcggaacaga
5671 aggaccgcgt aatgcggtgg caaccgggct ggttttagcc ggggagacgg aaggatagtg cagaaaacca
5741 ccaccgcaag cgtttggctg cggcataaat caaataaagg taacgttctc tttgatatcc cggctgactt
5811 gggtacatag tataaaggtg tttattacgc ggttaatttt aaggataaga gcatgccaac agcaattgag
5881 aaagcattgg attttattgg tggtatgaac acatcggcgt cagtacccca ttccatggat gaaagtacgg
5951 ccaagggaat tttaaaatat ttgcacgact taggtgtgcc agtgagcgca gcggatgtga cggcacgagg
6021 tgagcaggag ggatggaatc ccgagttcac aaaaaaagtc gccggatggg cagaaaaagt tgcctccggt
6091 aaccgtatcc ttatcaagaa ccctgagtac ttttcgtcct acatgcagga gcagctcaaa gaactcgtgt
6161 gagctgacta tcgaataaaa ctctaacgga cgtttccact ttcaaggtgg tagcgtccaa agagttgcta
6231 tctgcatgtg gggagctgaa cacgcaaatt atgggctgcg atgccatact cttaagatta agccttaatg
6301 ctttgtgaaa ctgcctgcaa aattatcctc tcatgttttt tatttacgag tttattttct caaataatga
6371 gatagtgttg atcattgaaa aaaatgcaac tatttaagtt tttaagtatg ttagtactag cattcagtaa
6441 gttaagtcaa atcggaatat ataactatag tgctataaat acttgggggga atattcttgt tttctggttg
6511 ttgttgattg tttttatcta gtgtctctat tttttcgtgg ttattgcacc tttgaacata aaagtatatt
6581 ttgttttggg ttattggcgt actttatgtg ggtgaaactt caacccaata tactgtagac ttaagtcata
6651 agcgtaaact cgcatcttat aatgttgata tcatttataa tggaaaatgt accgttgcaa atgatgagtt
6721 tattgatgct ataaataatg agtaataaca tttaacggtt atctgaatga gtgtttttca accgtctcct
6791 gtaaatatag agcatgatat ggagggtttt aatctttcct acgaacgagt attggttatg gacaatatct
6861 attatagtgc cattggacta tgtgctctta ttgatagctt ggcaggccgt tcaattacgc tgagagtcat
6931 aaccctttcc gcattgaaga aaaaactgtc agccagtatt gggaagcacg aacgggtatt agttattacc
7001 gagttaatga gcgagagtga gactctgtcg gaaggactcg cattcttaaa gtttgcaaag gacgagtggc
7071 cagcagacca atatagcatc attgttttta cccgcttact tgatc
```

7.2 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK3

```
   1 gatccgtgct gtgctggcgg aaaacctgat tgcctcgatg ctcgacctcg aagtggcgtc ggcgaatgac
  71 cagaccttct cgcactccga tattcgccgt accgcccgca cattgatgca gatgctgccc ggtaccgact
 141 ttatcttttc cggctacagc gcggtaccga actacgacaa catgtttgct gggtcgaact tcgatgccga
 211 ggactttgat gattacaaca ttctgcaacg tgatctgatg gttgatggcg gtctgcgtcc ggtaacggaa
 281 gaggaaacta tcgctattcg caatcaggcg gctcgcgcta ttcaggcggt gtttcgcgag ctgggcctgc
 351 cgctgattag cgatgaagag gtcgacgccg ccacctatgc tcacggcagc aaagatatgc ccgcgcgtaa
 421 tgtggtagag gatttggccg cggtggaaga aatgatgaag cgcaatatca ccgggctgga tgttgttggc
 491 gcgctgagtg ccagcggttt tgacgatatc gccagcaaca ttctcaacat gttgaggcag cgtgtgaccg
 561 gcgattatct gcaaacatcc gccattctgg atcgccagtt cgaggtggtc agcgccgtta atgacatcaa
 631 tgattatcag ggacccggca ccggctatcg catctctgcc gaacgctggg cggaaattaa gaatattgcg
 701 ggtgtggttc agcctggcag cattgaataa ggcggtatgc ggtggaatgt acaactgaac gtaagccggt
 771 tttcaccttg caggttagcg aaggcgaggc ggcaaaagcg gacgatcgcg cggatgaagt ggtgattggc
 841 gttgggccgg cctttgataa ataccagcat aagaccctga ttgatatgcc gcacaaggca atcctgaaag
 911 agctggtggc cggaattgaa gaagagggat tacatgcgcg ggtggtcaga gttttgcgca cctcggatgt
 981 ctcctttatg gcctgggatg cagcaaatct gagcggctcc ggcatcggca ttggtattca gtcgaaagga
1051 accacggtga ttcatcagcg tgatttgctg ccgctgagca acctggagct tttttctcag gccccgctgc
1121 tgacgctgga aacctatcgc cagattggta agaacgccgc gcgttacgca cgcaaagagt cgccctcgcc
1191 ggtaccggtc gttaatgacc agatggtgcg accaaaattt atggccaagg ctgcgctgtt ccacattaaa
1261 gaaaccaaac acgtggtgca ggatgccgcg cctgtcacgc tgcatattgc cttagtaagg gaatgacgat
1331 gaacgaaaac atcatgaccg cgcaggatta tccgttagcg actcgctgcc cggagaaaat cctcacgccc
1401 accggaaagc cgttaactga tattactctt gagaatgtac tggcagggcg tgtggggcca caggatgtgc
1471 gtatttctca gcaaacgctg gagtatcagg cgcagatcgc cgagcagatg cagcgtcacg ccgtggcgcg
1541 taatttccgt cgtgcggcgg aactgattgc catcccggat gctcgtattc tggaaatcta caatgcgctg
1611 cgcccatttc gttcttcatt tacggagtta caggccattg ccgatgaact ggagcacacc tggcatgcca
1681 cggtgaacgc cgggtttgtc cgcgagtcgg cagacgtgta ccagcagaga aacaagctgc gtaaaggcag
1751 tcagtgacgg aggcggtatg ccgttaattg cagggattga tatcggcaac gccaccacgg aagtggcgct
1821 ggcgcaggat ggccggtttg ttgccagcgg gatcgtcgcg accacgggca tgaaaggcac gcgggataac
1891 attgccgggg tagtggcctc cctgcagcag gcgctggaaa aaacatcgtc gtcgcttcag gacgtgacga
1961 aaatctgcat caacgaggcc gcgccggtca ttggtgatgt ggcgatggag acgatcaccg aaaccatcat
2031 cactgaatcg acaatgattg gtcataaccc gcaaacgcca ggcggtgttg gcgtagggat gggtaccacg
2101 atcgccgtgg agaaactggc atcgttgagc ctcgatcggt ttgcgcaggg ctggatc
```

7.3 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK4

```
   1 gacctcaagg atgcgatcgt caggcaccgc ggtcagttct gcggcacgtt caaagttcat cgccagcctg
  71 tcacgtccgg catctttggc gatatccgcc tgaatgcgca gcgtttctgg tgtgatacgc atatcctgtg
 141 cggtgacctt attgctcagc acattttcga gcgtgaagtc atccagcgtt ttattggtgg cggtttttac
 211 ccactcaggg tgtttattgg cgagcgggta atccgtcact ttcgcggtat gcgctgatga accagtcgcg
 281 gctggagtga cggtctctcc ctgcagactg ttcattcggc tcaacacatc ccgaaccatc gattcaattg
 351 cgtcggtatt catggagtta tcctttatca aagcgccacg cgcagttcct gcgggttttt gcccgtcacg
 421 acgtatttgg tctctttaat gtgcagaatg gctgatttcg cctggtactt cggacgcgcc atctgatcat
 491 tcaacgtcgg gaccggttgt ggagattcac gcttggcgta acgcgcggcg ttcttaccaa tctggcggta
 561 ggtttccagt gtcaggagtg gggcctgagg gaacagctcc aggttagaaa gcggcggtaa cccctgctgg
 631 tggataaccg tggtgccttt ggactggatg ccgattgaaa taccggaacc actcagacgg ttaccttcca
 701 cggcgacaaa cgccacatcg gaggatttaa agcagcggat gacgcgtgct ttaatgcctt cttcttcaat
 771 acccgcgatc acttcgcgca aaatattctt gtgcggaata ccgacgatat tgacggtctg cgagagccca
 841 aacgccggac caacggcaat aatcacttca tcctgctgct gaccctgttt ggcttcgcca atttcggtca
 911 gaaaactgtc accaggcgcg gtcgccatct gcggtgcggt tgccgcagca gacgagcgga aagaaacagg
 981 cttatcgctg gtctgcattt cagacagcac atcttcaatt atctggcgca gcagcttttc attgatttcc
1051 atagttcacc ccttagccaa gctcgttggg atcaagtgcg ccggggatgt ttttaatttc ttcccagcgt
1121 tcgccttgca ggcgataacc tgttgccgga ccggcataat cgttgacgtc attcaccgcg gaaagcacct
1191 gtccgtcgcc gacgataatg gcggaggtat gcagatagtc tccggttaac ttggctttct ggatgttgag
1261 catatcctga gcaacatcgg taaatccgcc ctgggccagg gctttcacca cttccagtcc gttgcggttt
1331 ttgctgatga tctcttgcgc aaacttaatg tcttcaacga tgttacgttc tggcatatct ttcgagccgt
1401 gggcgtaagt cgcggcttca acttcttcat cggttatggg tggcaatccc attccagcaa acactgcctg
1471 cagtgcgcgg gccgctttgt tacgaatggc gatgacgtct ccttcacgca ccggacgcaa acccccgtcg
1541 actttaaggt cacgctggag aacgttgtag tcgtcaaagt cttcggcatc ttcgttagag cctgcaaaca
1611 tgttgtcgta gttcggcacg gcggaataac cggaagagat gaagtcagtt cctggcagga attgcatcag
1681 caaacgcgcg gtacggcgca tatccgagtg ggtaaaggtt cggtcgttac tggaggcgca ttcgagatcc
1751
```

7.4 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK5

```
   1 gatcctcgta ctggcgtcct tgttcttccg tccggtcggt tttgattacc gttccaagat tgaagacatg
  71 cgctggcgta acatgtggga ctggggcatc ttcattggta gcttcgttcc gccgctggtc attggtgtcg
 141 cgttcggtaa cctgctgcaa ggggttccgt tccacatgga tgagtacatg cgtttgtact acaccggtaa
 211 cttcttccag ttgctgaatc cgtttggtct gctggccggt gttgtgagtg tgggtatgat ctgcaaagct
 281 ggaaccggtg gaaatggccg cctgaacgga ggccacatca ccgatgattt tgatcaccgt ccagccagag
 351 ccgttggttt tttcgaggcc caccagcgtg atggaggcgg ctttcgccat gacatccgcg caactgatgg
 421 ctaatgccag accactaact tcgagtaatc ccagtgattg cttcacgctg tgctccttgt tgcgacggtt
 491 taagcggatt taggtaaaat tgcttcgacg tcgctgtgtg gacgcgggat aacgtggcag gatttcacct
 561 caccaacggc gctggcggcg gcgctccccg catctacagc ggctttaacc gcaccgacat caccacgaac
 631 catgacggtg ataaggcccg agccaatttt ttcgtagcca attaactgca cgttagcgga tttcaccatg
 701 gcatcagcgg cttcaatagc gccgacaagc ccttttgttt caaccagtcc cagtgcgtta ttcatactgc
 771 ttttctcctg tggattatga gtggcattcc ctgaagggga tgcctttaac cagccgcgca gcgttattac
 841 caatgctccg acgagcgtgg ctatcttgtt gatacgtcag cgtaaaaagc ggcgctgaag tcggtaagtt
 911 tttatagtgc acaaccagtt gttcctggtt gcatccgatg ccgacgagca gcggtgactg acatgctgcc
 981 agccatgcgc tgtggatagt gtcggtagag tggctttccc tgatcacaaa agggatccct tcttcttcaa
1051 tacccagcag gacgtcattc cagagtgaag tgcagtctcc cagggtgaag atcacgatag ccggtgcgct
1121 gaggttactt tccatgagcg aacgccttgt accaggagag gattaacccg gttgcgacag catttcgtgg
1191 gccttcagtg ccgcgaatat tgccgcggcc cgcaaccagt cgatagtgtg ccagcgcatc cgtgaccagt
1261 tgcggaactt cgaagtccag ggaagagcca ccaaccaaaa ccacaaacgg gatgtcgcga atatttccgg
1331 ttggactaac ctgacgaagt gctctcagtg cgttggtgac aaaaacgcgt tctttggcgc tgcggcgaat
1401 ggcgcgaact ttctccagcg ccagatctcc aggtaatggc actagttcat cgggcttaac cacacagact
1471 cgggcaaaca ccgttggcgg cagaggggag gggaagaact gaacgctgcc atcttcgtgg cgaaggtgga
1541 acaagctttc aactttcgcc agcgggtatt ttttgatttc ctcggcgaga tagcggtcgt ccagccctag
1611 ttcacgggca atgatcatcg tgaccatatc gccagcgccc gccaggtgtg tggcaataat ttcgcctttc
1681 gggtttatga tggaggcgtc agtggaaccc gcgccgagat ccaaaatggc cagcggacgc gttgtgcctg
1751 gtgtggttag agcgcccaga attgcggctt cagcttcagc gccgcctacc tgtacatcga tattgagttt
1821 ttgcgtgatt tcctgggcaa tcatcgccat ttgcaggcga tctgatttca ccattgaggc aatacccacc
1891 gcctgttcca gcgagaattc accggcaagt ccccccgtca cgctgacggg aaccgaggta tcaaccgcaa
1961 gtaaatcctg aatgaagatt tcatgactgg gcttgttggt taattccgcc atggtctggc gtacgtgctc
2031 cagcatgccg ccaatattgg ttcccgcttc gccagtgaca ttatctagcc gtgggcagtc acctaccgct
2101 ttcataatgg cttctgcgcc cgctgcaacg tcgacacgaa cggtacgccc ctgcgactga agctcgaggt
2171 ttccagcggg aatggctcgc gccttcacat cacccgacgg tgttttcacg acgacagcag atcggttgcc
2241 aatcagggcg cgcgccatgg ggacaatatt ttttgtctct tccgcattca ggttaaaaac ggtcgcaatt
2311 ccgtaaggat tagagagcgt ttcaatcact tttccgggga cagcgacctc aatggccgcc agcattccta
2381 acgggatacg gtcgatatag agcacttcat cgacgatggg caacggcgta gtaagacggt tgctgaccag
2451 tacgccatcg tcctgttgta aaatcacgcc cgttagctga tatccggcgc gaacggaagc attaatcatg
2521 gtggcgacat cggcaaaatc gaatgctgat gacaccacca ggatgtaagg aatatccgcc ggacgagtta
2591 acaattcctc cggggtgatc gtgacgccaa cacctaaccc gaccccaccc ggcgttttag ggttgtgacc
2661 gatcatggtt gattcggtga taatggtttc ggtgatcgtc tccatcgcca catcaccaat gaccggggtg
2731 gcttcgttaa ttcggatgag cgaaatatcg ctgacattga tgcccgcatt ttttgcagca agcgtaagcg
2801 cctcctgaat accaaacaca ttacgtaatg tgcccttaat tccggtggtt tctgccagtg cgctggcttt
```

```
2871 aatgctcagc gtgccagcgt catccagggt cgccagtgcg acttctgttg atgagttgcc tatgtcaatg
2941 ccagctatat atcgcatcat ttttccctaa aattaatcgt cacctttgag ttttttacgc tctacgtaca
3011 gcactgccgc ttcacgaacg aaagctgcgc aaatctttgc ctgataacga ttttcgagat cgtcggcgat
3081 ggccataagc tcgtctttgg ttgagcgata cgggcgcagc gcgttataga tttcaaggat gcgatcgtca
3151 ggtactgcgg tcagttctgc ggcacgttca aagttcatcg ccagcctgtc acgtccggca tctttggcga
3221 tttcagcctg gaggcgcagc gtttcagggg tgatgcgcat atcctgcgcg gtgaccttgt tgctcagcac
3291 attttcgagc gtgaagtcat ccagcgtttt gttagtagcg gtttttaccc actcaggatg tttatttgcg
3361 agcgggtaat ccgtcacttt tgcggtatgt gttgatgaaa cagtcgcgga tggagtgacg gtctctccct
3431 gcaggctgtt catacggctc aacacatccc gaaccatcga ttcaattgca tcggtattca tggagttatc
3501 ctctatcaaa gcgccacgcg cagttcctgc gggtttttgc ccgtcacgac gtatttggtt tctttaatgt
3571 gcagaatggc cgatttcgcc tggtacttcg gacgcgccat ctgatcattc aacgtaggaa ctggctgcgg
3641 agattcacgc ttggcgtaac gcgcggcgtt cttaccgatc tgacggtagg tttcaagcgt cagaagggga
3711 gcctgaggga acagctccag attagaaagc ggcggtaacc cctgctggtg gataaccgtg gtgcctttgg
3781 actggatgcc gattgaaata ccggaaccac tcagacggtt accttctacg gcaacaaacg ccacgtcgga
3851 ggatttaaag cagcggatga cgcgcgcttt aacaccttct tcttcaatac cggcgatcac ttcgcgcaag
3921 atactcttgt gcggaatacc gacgatattg actgtttgtg acagtccaaa cgccggacct acggcaataa
3991 tgacttcgtc ctgctgctgg ccttgtttgg cttcgccaat ctcggtcaga aagctgtcgc cctgtgccgc
4061 tgcagcctgt ggtgcgcttg ccgctgtaga tgagcggaat gagacgggtt tgtcgctggt ctgcatttca
4131 gacagtacgt cttcaattat ctggcgcagc agcttttcat tgatttccat ttttcacccc ttaaccaagc
4201 tcgttgggat caagtgcgcc agggatgttt ttgatc
```

7.5 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK7

```
   1 gatcgctggc gagttccgcc cccagtacga acagcatctt ctgcatagcg tgcaattcct ggcgtagctc
  71 ggcctggcgc gtgctggcat agcagacgcc aagctgggaa atcagttcat ccaccgtgcc gtaggcctca
 141 acgcggatgt cgtctttatc gatacggctg ccgccaaaca gcgcggtcgt gccgttatcg ccggttcggg
 211 tatagatgcg gtacatttat tttatctcgc tgaagggaag aactttaacc agttgaccgg cattggcgcc
 281 gagcgtgcgg atctgtgctg tcccggcgcg ggtatgcccg cagaccagcg cccgatcctc gggcaactgg
 351 gcatgggtta aggcaatatc accggtggcg ttgagaccga gacccacgcg cagcgccgaa cttttggccg
 421 ccagtttgcc gagcgccagc gcgcagtcat gatcgtcgca acagattgcc cggcagggaa cgccttgctc
 491 ttccagcccc cagcacaact cgtcaagcac gcgagtaccc tgccagcgtg agtgataaaa caggtgtacg
 561 cccggtgatg aaagtaacat tgcgcccccct gcgttatcag aatgcctgac ggaagatctc ggcaatttct
 631 ttctcgttcc ctttgcgcgg gttggagaag gcgttgccgt ccttcagcgc catttccgcc atatacggga
 701 aatcggcttc tttgacgccc agatcgcgca gatgctgcgg aataccgatg tcggcggaga ggcgggcaat
 771 agcatgaatg gccagctcgg cggcatccat ggtggagagt ccgtccgtgt tctcgcccat aaactctgcg
 841 atgtcggcaa atttttccgg gttagcgatc aggttatagc gtgccacgtg cggcagcagt acggcattcg
 911 ccacgccgtg cggcatgtcg taaagaccgc caagctgatg cgccatcgcg tgaacgtagc cgaggttggc
 981 gttgttgaag gccatacccg ccagcaggga ggcgtaggcc atgttctcgc gagctttcag gttgctgccc
1051 agcgccacgg cctgacgcaa gttacgggcg attaggcgga tcgcctggat agcggcagcg tcggtgaccg
1121 ggttggcatc tttggaaatg taggcttcca cggcgtgggt cagggcgtcc atcccggtgg ccgcagtcag
1191 tggagctggt ttgccgagca tcagcagcgg atcgttaata gagaccgacg gcaggttgcg ccagctgaca
1261 atcacaaact tcactttggt tttggtattg gtcagcacgc agtggcgggt gacttcgctg gcggtaccgg
1331 cggtggtatt caccgcaacg atcggcggca gcgggttggt cagggtttca atcccggcat agctgtagag
1401 atccccttcg tgagtcgccg cgataccgat gcctttaccg caatcatgcg ggctaccgcc gccaacggta
1471 acgatgatgt cgcaatgctc tttccgaaag acctccaggc cgtcgcgcac gttggtgtct ttggggtttg
1541 gctcaacgcc gtcaaaaact acgacgtcaa taccggcttc acgcagatgt gtgagggttt tatctaccgc
1611 gccgtcttta attgcccgca gacctttatc agtgaccagc agcgcttttt taccgcccaa cagtttacag
1681 cgttcgccga ccacggaaat agcattgggg ccaaagaagt tcacatttgg cacgaggtaa tcaaacatac
1751 gatagctcat aatatacctt cttagattta aattataatt cagagaaaca attcaatgcg gtttctgcta
1821 ataatctgtc ttgttcgacg gtaccgccac ttacgccaac ggcaccgatt actttgccgt ttaatatgac
1891 aggtaaaccg ccgccaaaaa taacaattcg ttgttgattg gtgagctgca agccatatag agaggcacct
1961 ggttgtaccg catcggtaat ttcatgggta ccctgtcgca ggcagcaggc ggtataagct ttattaagag
2031 agatattaca gctggtgaca aacgcgtcgt ccatacgttg cattagcagc gtgttcccgc cgtgatccac
2101 cacggaaaac accaccgcaa cgttgatttc aagcgcttta gcctcgacgg cctgcgccat tttctttgca
2171 gccgccagcg taatggtggc gatttgttgg ctcttattca cagtctctcc tgaaaaggtt gtagggctga
2241 ggtcacgaaa atatcgcgca acagctattt ttatcattgg ctttatctta ttttctcgcc ccgcgttatt
2311 aagtcaatag ggtgggaatt tcaaaaatat tacgttcagt ttcctgttgt ggcgtttatt gataatgatc
2381 atttaacctc gtcacaattc acggcgaata ttcctgagcc gcgtttcaat atgaaacgat ggtttttat
2451 tacgtaccaa attggaacga aattaatttt atttttttat tgtcctgctc atttagagtt cggctattgc
2521 tgatgaaagg cgaatgccgg gtgttgtgtc cccggcaata cggcccggcg tccctatttt ttatcttttg
2591 agtccataaa ctatgagaag atcaaaacga tttgaagtgc ttgcccagag gcctgtaaat caggatgggc
2661 taattggcga atggcctgaa gaggggctga tcgcaatgga aagcccttac gatccggctt cgtcggtgaa
2731 ggtggaaaat ggtcgtattg ttgagctgga cggcaagagc cgcgccgagt tcgacatgat tgaccggttc
2801 attgccgatt acgcgattaa cgtgcccgag gccgagcgcg ccatgcagct cgacgcgctg gagatcgcca
2871 gaatgctggt ggatatccac gtcagtcggg aagagatcat tgccattacg actgccatca ccccggcgaa
2941 agcggtggag gtgatggcgc aaatgaacgt ggtggagatg atgatggcgc tgcaaaaaat gcgcgccaga
3011 cgcacccccct ccaatcagtg ccacgtgacc aacctgaaag ataacccggt acagattgct gccgacgctg
3081 ctgaagcggg gatccgtggc ttttccgaac aggaaacaac ggtcgggatc gcccgctatg cgccgtttaa
3151 cgccctggcg ctgctggtgg ggtcccaatg cggtcgcccc ggcgtgctga cgcaatgctc cgttgaagag
3221 gccacggagc tggaactggg aatgcgcggg ctaaccagct acgccgaaac ggtgtcggta tatggcacgg
3291 agtcggtgtt taccgatggc gatgatacgc cgtggtcaaa agcgtttctt gcctcggcgt atgcttctcg
3361 tggtctgaag atgcgctaca cctccggcac cggttcggaa gcgctgatgg gctattccga aagcaaatcg
3431 atgctttatc tggagtcgcg ttgcattttt atcaccaaag gcgcgggcgt acaggggtta caaaacggtg
3501 cggtcagctg tatcggcatg accggcgctg tgccgtcggg gattcgcgcg gtgctggcgg aaaacctgat
3571 tgcatcgatg ctcgaccttg aagtggcctc cgccaatgac cagacctttt cccactccga tattcgtcgt
```

```
3641 actgcccgca ccctgatgca gatgctgccg ggcaccgact ttatcttctc cggctatagc gcggtaccga
3711 actacgacaa catgtttgcc gggtcgaact tcgacgctga agacttcgat gattacaaca ttctgcaacg
3781 cgatctgatg gttgatgggg gcctgcgtcc ggtcacggaa gaggagacaa tcgccatccg caataaggcc
3851 gcgcgcgcca ttcaggcggt gttccgcgaa ctgggcctgc cgctgattag cgatgaagag gtggaagccg
3921 ccacttacgc tcacggcagc aaagatatgc ccgcgcgcaa tgtggtggaa gatttggctg ccgtggaaga
3991 gatgatgaaa cgcaatatca ccgggctgga tatcgtcggc gcgttgagtt ccagcggctt cgaagacatc
4061 gccagcaata tcctcaacat gctgaggcag cgcgttactg gtgattacct gcaaacgtcg gccattctgg
4131 atcgtcagtt cgacgtcgtc agcgccgtta atgacatcaa cgattatcag ggacccggca ccggctatcg
4201 catctctgcc gaacgttggg cggaaattaa aaatattgcg ggcgtggttc agcccggctc gatcgaataa
4271 ggcggtacac agtggaatgc acaactgaac gtaagccggt tttcaccttg caggtgagcg aaggcgaggc
4341 ggctaaagcg gacgaacgcg tggatgaagt cgtgataggc gtcggcccgg cctttgataa gtatcagcac
4411 aaaacattga ttgatatgcc gcacaacgcg attttgaaag aactggttgc cggcattgaa gaagagggcc
4481 tgcatgctcg ggtggtgagg attctgcgca cctcggatgt ttcatttatg gcatgggatg cggcaaatct
4551 cagcggttcg ggcatcggga ttggtatcca gtcgaaagga accacggtga ttcatcagcg cgatctgctg
4621 cctctgagca accttgagct gttctctcag gctccgctgc tgacgctgga aacctatcgc cagattggta
4691 aaaacgccgc gcgctatgca cgtaaagagt cgccttcgcc agtgccagtg gttaatgacc agatggtacg
4761 ccccaaattt atggccaagg ccgcgctgtt tcatatcaaa gaaaccaaac acgtggtgca ggatgctgcg
4831 cctgtcacgc tgcatattgc actcgtaagg gaatgaccat gaacgacaac atcatgaccg cgcaggatta
4901 tccattagcg acccgctgcc cggagaaaat ccagactcct accggcaaac cgctaaccga gattaccctt
4971 gagaatgtgc tggcgggccg tgtaggtccg caggatgtgc gtatttctca gcaaacgctg gagtaccagg
5041 cgcagattgc cgaacagatg cagcgtcacg ccgtggcgcg taatttccgt cgtgcggcgg agcttatagc
5111 aatcccggat gcccgtattc ttgaaattta caacgcgctg cggccgtttc gttcttcgtt cgccgagctt
5181 caggccattg ccgatgaact ggaacatacc tggcatgcca cggtgaacgc cgggtttgtc cgcgagtcgg
5251 cagaggtgta tcagcagaga aacaagctgc gtaaaggcag ccagtgacgg aggttgtatg ccgttaattg
5321 cagggattga tatcggcaac gccaccaccg aagtggcgtt ggcgcagcat ggccggttta tcgccagcgg
5391 gattgtcgcc acgaccggta tgaaaggtac acgggacaat attgccgggg tggtggcctc cctgcagcag
5461 gcgctgaata acaccccgtg gtcacttcag gacgtggcga aaatctgcat caacgaggcg gcaccggtga
5531 ttggcgatgt ggcgatggaa accatcactg aaaccatcat taccgaatca acaatgattg ggcataaccc
5601 gcaaacgccc ggcggcgttg gcgtgggaat gggaaccacc atcgccgtgg agaagctggc ggcgttgagt
5671 gaagatcggt ttacccaggg ctggatcccg ctggtcggtg aggagaggga tttcctcgag gcggtttggt
5741 ttatcaatga ggcgctggat cgcggcgtca acgtggtggc ggcgatcctg aaaaaagatg atggcgtgct
5811 ggtgaacaat cgtctgcgtc gaacaatgcc ggtggtagat gaagtcaccc tgctggagaa ggtgccggaa
5881 ggtgtgctgg cggcggtgga agtggcggcc ccaggacagg tggtgcgagt gctgtcgaat ccttacggca
5951 tcgcgacctt ctttaccctg acgcccgagg aaacgcaaac tatcgtcccc atcgccagag cgctaattgg
6021 caaccgttcc gccgtggtgc tgaaaacccc gcagggtgat gtgcgctcaa gggtgatccc ggcgggtaag
6091 atctttatcc gcggcgaaaa gcgcggcggt gaagccgacg tagcgcaagg cgcacaggcc attatgcagg
6161 cgatgagcac ctgtgcgccc gtgtgcgata ttcgtggtga agcaggtacg catgcaggcg gcatgctgga
6231 gcgggtgcgt aaagtgatgg cctcgctgac cggtcacgat atgaacgcgg tgtatattca ggatc
```

7.6 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK101

```
   1 gatctatggt gtaaccttta ctccgcaaat gttattcacc aaatttttaa aaaagacctt aatggtggca
  71 aggcagcagt ttctaaacag cagtatacaa aaattggtgg ttacggtacc gaatttaaca cctaggttaa
 141 cagaagagat ttattttagt ttagaggaac tagggttaaa gaaggacagg gtaactgtga ttagccaggt
 211 gcaaagctat atgtattatg tgctctgtca aaagccagag atttgggcga atgaagtggc tcttttcacc
 281 tatgatgaga caggcctatt ttattataat ttgaccatga ataagaggat gcaaccgtac gcagtgattg
 351 tagatcgaat agatctaagt catgagttaa cgcctcagat gtttcaagag gaaccattag agcgtgtgct
 421 ttatcgtctg gagaaattat taaatcaagt cttatataag aaattaacca gcgcggtttt tatgacaggg
 491 aaaggctttg aaggaaactg ggttagagat gttcttgtaa gactcagcag ttctaggcgt gtctttgtgg
 561 gacagaatct gtatgcaaaa ggcgcttgtt ttgcagcaaa aggatttgcg gatgaaagtt ttcgaaacta
 631 tgtttttta agtgatgaaa tgataacctc cacaattacg ttacgccttt atgaagatgc aaaggaagta
 701 gaatacagca tggtaaaagc tgggacgcca tggtggaaag cagaacatac agtaacggta attttggatg
 771 agaccaaaga actttgcttt acggtgagca atctcttaaa gagagagccc ctccaggaag tattttcttt
 841 agatggaatg gtagaacggg aaaataagac cattcgtctt gcaattaccg ttcattttgt ggatcgtttt
 911 actgcggttg tgacagtgag agatactggt tttggtgagt tttatgcaac taactataga atttgggaac
 981 agacattaac cttatagaca ggaggatggc aatgggaaaa ttaattcttt gtgcaggaaa tacagccaag
1051 gaaccgtatt gttttaagtt aacaggtact ccggtctata cgatagaaga actatgctac tacatctatc
1121 ataatttgga atctgtaagt gaagagctag taagtcagga gtttattgta tttgtaagag aacagttggg
1191 cttaatggat c
```

7.7 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK102

```
   1 gatctgtctg aagtctttac ccgcatcaaa cgactgcgcg acgacgatat ccgggtggat gaaaaacgcc
  71 gcctgttgat ggataacgcc gacgccagcg ccattccagc cgacaaactg gtcaccatgg caaaactgtt
 141 tgtcgttatc agcgaatggg tcatcgctaa tgatattgat acgactgcca tccagtgctg gacatcgctg
 211 caggaaaatt taggcatcaa cgtgtgctca atcatgagcg tgatgtccgg gcagttaatg cccagtgcct
 281 gcgaagtgga tgtgatgggc gcgttgtcaa tgtacgccct cgccagcagc aacttaagtc cagcatccat
 351 tgccgactgg aacaataatt tcggcgacga tcgtgataaa tgcgttcttt ttcactgcgg taatttcgca
 421 tcagccagtc tggacagccc gaagatgggg acggcggata tcatcggtac caccgtcggt aaagagaaca
 491 cctgcggtgc agttcacggt cgtatgaaaa gcggtgcctt gacctacttc cgcctgagta ccgacgattt
 561 aaccggcgaa atcaaagcct acgttggtga agggctatcg gttgacgatc cgctggacac tgtcggctgc
 631 cgagcggtaa tccaggtacc tcatctggag aacctactgg cctggatttg tcgtaatggc tttgagcatc
 701 acgtggcaat gaaccattcc gccagcgcag aggtactgca tgaagctttc acccgctatc tcggggtgga
 771 tacctttttc catcgctaat actcagggaa accgaagggc tggagaaaac aatgtcagca caaaaagaca
```

```
 841 ttattattgc gcttgatgaa ggcaccacca atgccaaagc cgtagcgctg gatggtcagg gaaacgtggt
 911 cgcgaagttc tcccgcgcgc tggcgatcca cacgccccgt gaaggctggg ttgaacagtc aggtgatgca
 981 cttctggacg catcactgga tgttgtggca caagccatta cctgcgtcgg cgcacaacgc gtcgcagcgc
1051 tggcgatcag caatcaacgt gaaacggcga taggctggta tcgtgccagc ggtcgccctc tcggccctgc
1121 tatcacctgg caatgttcgc gcacggccga tttttgccgt gcattacgtg aacaggggca cgaggcgtac
1191 ataaaatcca tcaccggatt acccgttgcc ccactctttt ccgcctctaa aatgcgctgg ctgctggagt
1261 cagttcccaa cggtatgacg ctcgcacagc aaggggaaat atgtctcggg accatcgata gctggttact
1331 gtggaactta acgcacggcg aggaatttcg ttgcgacatc tccaacgctt cacgcacgca gttgctcaat
1401 ctcaacagcg gacaatggga tagcgagatg ttggctctat ttggtattcc gcagcaggcg ttgcccgaag
1471 tttgcccttc cagccaccat tttggcgtaa caaaaggtct ggagaggata cctgatggaa tccctattct
1541 ggcgatgatt ggcgactctc atgctgcgct ttttgcccat gggctgggta tggaaggctg cgtcaaagcg
1611 acctatggca ccggatcttc cgttatggct cccgtattct cggcgcagtc cgaggtgagc gcgctggcaa
1681 cgaccattgc ctggcatgac gctgacaccc tggtctacgg gctggaaggt aatattccgc atacgggaga
1751 tgccgtcgca tggatggccg atagcacagg tcttagcgaa ttaccggaag agcaactgct tcatgagctc
1821 aatacgctgc ccgccacggt tgactccacg ctgggcgtct atttgttcc ggcccttacc gggctgggcg
1891 cgccctggtg ggatgaagat gcccgggggt tgattcacgg tctcagccgc ggagtgaaac gcgcacatct
1961 ggtacgtgcg gcactggagt cgattaccta tcagattgcc gatgttgttt tagcgatgcg ccagcacaac
2031 ggttttcgac tcagcgcgtt aatggttgat ggcgggccaa caaaaaatga ctggctaatg cagtatcaag
2101 ccgatttatt gggctgtccg gtgatgcgca gcgatatccc tgaactttcc gctatcggtg ccggattgct
2171 ggcacgcaag aagctgcaag gtgcatctac cagccagttg cgagattatc tgcccgatca cgtatcgttc
2241 cagccaaaca tggcgcgcca tgggagattg caaaaacgct ggcatgaatg gcaaggagcc gtcgaacgca
2311 cccgttggca aacccgttaa taaatcaacg ctaatgataa atgcgcccgc agccataact gactgtgggc
2381 gcactgttaa ttcttcaaaa gcgagctact gttgctgaca cgccgccagc gatcggcgtt gctgcccttt
2451 ttcatcgaag ttgtcggcag ccagccagcg ctgcaaaaca gcgtcgcact ggggccattc gctatcaatc
2521 atcgataacc agtcgctgtc gcgattacgc cccttgcgca caatcttctg gcgaaaacgt ccttcgaaga
2591 taaacccaag gcgctccgcc gcccgacggg aagccgtgtt cagagagtca catttccact ccacgcgacg
2661 atagcccaac gcaaacgcct ggcgcagcaa cagccagatg ctttcggtgc cgagtaccgt atttttcatg
2731 cgcggtgacc aggttacatg accaatttca accgaaccat gctcccgttc gatcgccata aagcacacca
2801 gtcccaccgc acgaccggaa ccctgttcaa tgacagcata gggaaccaga gaggcatccg tggatttgcc
2871 ctctacccag caagctgtgg cctcaacgct cgtggggcga gaacttgcaa gccaggtcca gtcgcgatcg
2941 tctggcgcct gcgcgtaagc atcaaacaga tcggcggcat ggctgtcggc atccaaggga accagtcgac
3011 aatattgccc tgcaagttct tcccgcggca gcacggcagc accattccag tcaggcacaa tatcgccgac
3081 ggtctgtcca taaagattaa tttccggcac gattcaaccc ctgttgcgaa gtaaaaaata gttataacac
3151 cggccatttc gccttcaaag catcgcgggg ggatttctga caacgaacag aaaatcagcg gcccttctat
3221 atgcagcttg caagatgacg cgtctatact gattaaaaat caacgctgaa gagaacacta tgtccctacc
3291 cgattttcat gtttctgacc cttttacgtt aggcattgaa ctggaaatgc aggtggtcaa tcctccgggc
3361 tacgacctga gccaggactc ttcccgactg attgacgccg taaagccgct gctcaccgcc ggagaagtaa
3431 agcacgatat cactgaaagt atgctggaga tggcgaccgg ggtttgtcgc aatatcgacc aggcgagtgc
3501 tgaattatcc gccatgcagc agataatctc gcgggttact gccgagcatc acctcgccat ctgtggcggc
3571 ggtacgcatc cgtttcaaaa atggcaacgt caggaagtct gcgatgacga acgctatcgg cgtaacctgg
3641 aaaattttgg ctatcttatt cagcaggcga cggtattcgg ccaacatgtg catatcggct gtgcaaacgg
3711 cgatgatgct atttacctcc tgcacggcct gtcgcgattt gttccccatt ttattgcact ctctgccgcc
3781 tcaccttata tgcagacgtc cgacacgcgg tttgcctgcg cgcggctgaa tattttctcc ggatttcccg
3851 ataatggccc gatgccgtgg gtgaataact ggcaggaatt cgaggggtta tttcgtcgac tggcttacac
3921 cagcatgatt gatagcatta aagatttaca ctgggatatc cgccccagcc cgcactttgg tacggtagag
3991 gttcgcgtca tggacactcc gctaaccctt gaacacgcag tcaatatggc gggacttatt caggctaccg
4061 cccactggtt gctcactaaa cggccattca agcaccagga gcgtgattac ctgctgtata aatttaaccg
4131 ttttcaggcc tgccgctttg gcatggcggg aatcatcacc gacgtcaata ccggcgatgg gcaccgcctg
4201 tcagatgaca cgctacggct actggagaat gtcgccgctt ctgcggacaa agtaggcgcg accagcgcga
4271 ttgaatcctt acgcctgcag gttaaaaatg gtcatgatga agcgcagagc atgcgtgatt tcgtcgccga
4341 cggcggatc
```

7.8 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK103

```
   1 gatcaccacc agcgtgatca gaggccatgt accttcggga atgtttaaca ggcgtaccaa cagaaaagta
  71 aggagaaacg ccagcgcaat gcgaatacca tgcaccacac gataatgacg atacaaacga atttcaaaag
 141 gactcagcga tttgtctgca cgcactcatg cactccgtca gggaatagca aagaagcgaa ttgtacctgt
 211 ttttagcgtg aaaagatcat cctgatttac accccaaaca gttacttcgt ctgcactggc acgtacattt
 281 caatgtccca gtaaccgtcc tccatgccat tgttcatata aacttcaaag cagggtttag cggctatcgc
 351 ataagtcgta tcctgcaaca ggcgctcgaa gaactgatac caaggcgtcg caaaatcgtg attctcaacg
 421 cgcgcaacgg cgacagcata gtcgccaccc gccagttcgg tgaggatcac cccttcgctg ttttctggga
 491 tttcaaaacc ttcaggcaca gaaaccacgg tatcacagcg cagtttttcc gcaggaacaa catcagggtt
 561 gtcgtaataa acagcaatcc attccaacgg cacaatctgt ttaccgtcga cccacttcat taattgctca
 631 aacccctgct tcaccgtttg ttcccacggt ccaaccatat ggaaaccggc aatcatgcgt ttttcgacca
 701 gctttatctc gtactccata caacctccac tgttacactg tatttatata cagtgtaatt tctggctatg
 771 tcggccacaa ggaaatagtg attattatgt gagcagattc gcactcttgc cagtcagacg catcaggaaa
 841 aactaagcct tgtggtggaa ataatcgctc aggcgcgaga aaacgccgcc ttcgccgacg gattccagcg
 911 taaccagagg ccaatgcgcc accagcttat cccgatcgta gagttcaatt tcccccacac gttgatgcgc
 981 agcgatggga gcaaccagct ctttcttatc aaggacatat tttgctttga tgttagggac ttctgcttta
1051 ggcagggcca tccagaaatc ctgctcggtt ccgaggctga ttttttcttt atcgccatac cagatccgtt
1121 cagtgccaac ctgcttaccg ctacgcaaaa cctgtactgt atcgaagttg tgttgccccc attgcagcag
1191 tttacgcgcc tgatcttcgc gccccttcgc actctccgcg cccatcacca ccgcaatcag gcggcgctga
1261 ccatcgactg cggaagcaat caggttaaat ccggcaccgg acgtatgccc tgtcttcagg ccatctacgt
1331 tcatggtttt atcccacaac aaaccgttac ggttttgctg tgtgatgccg ttccaggtaa ggcttttctc
1401 actgtacata tggtagaaat ccggttctcc gtggatgata gcgcgggaca gcacggccag gtcgtacgcc
```

```
1471 gagctatgct gacccggcgc atccagacca tgtaccgttt caaaatgggt gtcctgcagg ttcagttttt
1541 gcgcatagtt gttcatcatc gcgacaaact gcggctgccc tccggcgatg taatccgcca gtgccacgca
1611 ggcatcatta ccggaatcaa caattaaccc acggctgagg tcacgtaccg aaacgcgatc cccttctttc
1681 aggaacatca aggatgaacc gacaaatacc ggattatctt ttgcccatgc atcgcgcccg acggtcacaa
1751 tatctgtcgg actaatacgc ttgctgtcaa ttgcgcgatc gacaacatag ccagtcatca gtttcgtcag
1821 gctggcagga ttgcgctgct ggtgttcatt accggctgtc aggatttggc ccgtggtgta atccattaac
1891 acccatgccc cggcagtaat cgcaggaggt tgtggggcga agctcacggc atcgctcgcc caggcgggcg
1961 aaaaactcat cgttaatagt gaagcggcaa taaacaaacg gcgtttcaac agcatgtcct caggaaaggg
2031 agaaatagcc gttcttttta cggaagttct gtcgaacaaa catggataaa ttgcaagaaa atgtgacata
2101 aggcacattt tcttgctatc aggaaagggt ttcagagaca aatctcgccg gaactaccct ttacgcggcg
2171 cggtctctgc gtgatgactg cgatggcggt gataaccatc gatcatactg cgaaaaattt gccctggcgt
2241 gtcacccagc gtgcacaggt aaatatgcgc gcagatgaac agtaagccca caatcgctaa cgccatatgc
2311 agcaccagca tcaccggccc cgcccctacc acctgcgggt agagacatag caacccggtg atgatc
```

7.9 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK104

```
   1 gatcccttgc cgtgccgccc gcggcgttga gcacgatttt aaagaaggtg actgggccgt cgctgaaatg
  71 cgtcgccacc cgctgaaagg cgatcgcacc ttctatgccg agttaaccca atttatcact tttgctgatg
 141 accactttgt cccgtggtgg gtcacgctgg cacgccataa tctcgaaaaa gaagcgccgg acggtgtggc
 211 aactgagatg ctggatgaag gtctggttcg tcaggactta accgccctca actttgtcac catcgacagc
 281 gccagcaccg aagatatgga cgatgcgctt tatgctgaag agctggccga cggcaaactg caattaactg
 351 tcgccattgc cgaccctacg gcctggattg cagaaggcag caagctggat aaaacagcaa aaattcgcgc
 421 gtttactaac tatctgccgg ggttcaacat cccgatgcta ccacgcgaac tgtctgacga tctgtgctct
 491 ttacgcgcga acgaagtgcg tccggttctg gcttgtcgta tgaccatcac cgcagatggc gcgattgaag
 561 acaacatcac cttcttcgca gcgacgattg agtcgaaagc gaagctggtc tacgacaacg tctccgactg
 631 gctggaagat accggcgact ggcagccttc aaatgacgcg attgctgaac aaatccgtct gctacaccgt
 701 atttgcctga gccgcggtga atggcgtcat aaccatgctc tggtatttaa agatcgcccg gattaccgtt
 771 ttgttcttgg tgaaaaaggt gaagtcctgg acatcgtcgc tgagccacgc cgcatcgcaa accgaatcgt
 841 ggaagaatcc atgattgcgg caaacatttg cgccgcccgc gtgcttcgcg acaagctcgg cttcggtatt
 911 tataacgtcc atatgggatt cgacccggcc aacgccgacg ctctggccgc gctgctaaaa acccatggta
 981 tgcacgttga tgccgaggaa gtcctgacgc tggaaggttt ctgcaaactg cgccgcgagc tggatgcgca
1051 gccttctggt ttcctcgaca gccgaattcg ccgcttccag tcttacgctg aaatcagtat cgagccagga
1121 ccgcactttg ggctgggtct ggaggcttat gccacctgga cctctcctat tcgtaaaaat atggcgatat
1191 gattaaccac cgcctgctta aaggccgtca tcaaaggtga aaccatcgcc cgccctgggg atgataccac
1261 ggtgcaaatg gcggaacgtc gtcgcctgaa ccggatggct gagcgtgatg tgggcgactg gttatacgcc
1331 cgtttcctga gtgacaaagc cgggaccgat acccgctttg cggccgagat aattgacgtc agccgcggcg
1401 gtatgcgcgt acgtttagtt gataatggtg cagtagcatt tattcctgcc ccattcctgc acgccgttcg
1471 ggacgagctg gtatgcagcc aggaaagcgg cacggtgcaa attaaaggtg aagtggttta caaagtcacg
1541 gatgtgattg acgtaaccat cgccgaagtt cgcatggaaa cccgcagcat tatcgcgcgt ccagccgcgt
1611 aacacgtatc aatccagcga cctttctcat tttgtgaaag gtcgtttctt tttcccgccc aaattcccac
1681 caccgcacta cacttctttc attcggtcaa ttttattttt ttactttttt cagttccgct ggctttgctt
1751 tttacggatt ctggattaaa cataaatata taaaaaaaac aatacgttca gccataatca ccccgaatga
1821 atcatggcta cccatacttt tgaggctcta tgcgctttaa acgggatagt acacatgatg aaagacgtcc
1891 gggagctggt tacgttgtat agctatgtgg gcactcataa cccctactgg cgtttgtcag aggattgcaa
1961 catcctgcat ttctctatcg acgaagcgtc agaagctgat cagaccatcg aattattacc tgaacaagcc
2031 gatcgcattc gcgagatgac ggtgatcacg tcaagtctgc taatgacgtt gcccattgaa gatgacgaca
2101 ttcccgtgca tctggtcggt cgaaaaatca ataagcgcga atgggccggt agcgcatccg cctgggatga
2171 cacccccttcc gtcgcccgcg atctggtatg gcgataaaga aaaaatcagc ctcggaaccg agcaggattt
2241 ctggatggcc ctgcctaaag cagaagtccc taacatcaaa gcaaaatatg tccttgataa gaaagagctg
2311 gttgctccca tcgctgcgca tcaacgtgtg ggggaaattg aactctacga tcgggataag ctggtggcgc
2381 attggcctct ggttacgctg gaatccgtcg gcgaaggcgg cgttttctcg cgcctgagcg attatttcca
2451 ccacaaggct tagtttttcc tgatgcgtct gactggcaag agtgcgaatc tgctcacata ataatcacta
2521 tttccttgtg gccgacatag ccagaaatta cactgtatat aaatacagtg taacagtgga ggttgtatgg
2591 agtacgagat aaagctggtc gaaaaacgca tgattgccgg tttccatatg gttggaccgt gggaacaaac
2661 ggtgaagcag gggtttgagc aattaatgaa gtgggtcgac ggtaaacaga ttgtgccgtt ggaatggatt
2731 gctgtttatt acgacaaccc tgatgttgtt cctgcggaaa aactgcgctg tgataccgtg gtttctgtgc
2801 ctgaaggttt tgaaatccca gaaaacagcg aaggggtgat cctcaccgaa ctggcgggtg gcgactatgc
2871 tgtcgccgtt gcgcgcgttg agaatcacga ttttgcgacg ccttggtatc agttcttcga gcgcctgttg
2941 caggatacga cttatgcgat agccgctaaa ccctgctttg aagtttatat gaacaatggc atggaggacg
3011 gttactggga cattgaaatg tacgtgccag tgcagacgaa gtaactgttt ggggtgtaaa tcaggatgat
3081 cttttcacgc taaaaacagg tacaattcgc ttctttgcta ttccctgacg gagtgcatga gtgcgtgcag
3151 acaaatcgct gagtcctttt gaaattcgtt tgtatcgtca ttatcgtgtg gtgcatggta ttcgcattgc
3221 gctggcgttt ctccttactt ttctgttggt acgcctgtta aacattcccg aaggtacatg gcctctgatc
```

7.10 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK105

```
   1 gatctggtga cactggccga cccgacccac cccctgagtt atctcaacta cctgcaccag caggatcggc
  71 tttacccttt ctattactac gatcacttcc tgatcccgag acgggaatat gaccactact gccgctgggc
 141 cgcgcagcag ctaacgagct gtcactttgg cgaagaggtc atcgatgtcc gctatgacga caccagagag
 211 aggtttctca tcgacagcac atccgcaacc ggagccgtac agcgctacag cagccgcgat ctggttatcg
 281 gcataggcac cacccccctgg ttgcccgact gggctcggga atgccaacat cctctcgtca tgcattcagc
 351 ccggttcatg catgccaggg agcagctctc gcaatgcaag cgggtgaccg tcattggatc gggacagagt
 421 gccgccgaat gcgtattggc gctctttagc gccttgaccc cggaacaggt ccaggccgga gcctccattc
 491 agtggatcac ccgggcggcc ggttttcacc ccatggaata ttcgaagctg ggacaggagt gcttcacccc
 561 cgcctacatg cactacttcc acactctgcc cagagagcgg cgcagggaga tagtggcgga gcaagggttg
```

```
 631 ctctacaaag gcatcagctt ctcgaccatt ggcgagattt ttgatctgct ctatgagaga tccatcggtg
 701 gagagacgcc aggcctggtg ctctactcac attgcaccat cgaaggagtg gaagaactgg atggccaggg
 771 cgccctgcgc atgagctgcc atcacaccca gctggatcag cactgcacac tggagaccga cgccatcgtc
 841 gccgcaaccg gttatgccca tgcatggcct gcgtggtttg aacggctcaa aggcacagtc ctggccattg
 911 atgagcaggg ggattgcata gtccagccag atttcacggc ccgtcgttgc gacagaggac aggggcggat
 981 ctttgttcag aatgccgaaa tatttcagca tggggtgggc tcaccggatc tgggcatagg ccccaaccgc
1051 aatgcacata tcatcaatca gttgcttggt cgggagcagt atcgcctgcc ccgaacctcc accttccagc
1121 actacgggct gccaacctcc tagccctggg ttctgccccc tgtcggctga cagggggcag aacactgttt
1191 atgcctcctt ttgcagtgcc agatcttatc gttacacata ttaacttgga ttccctataa aattacaacg
1261 gggatc
```

7.11 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK106

```
   1 gatctcgcct atcccgaaca ggagttccgg ttccgggact tcgaggccgg tttgagcacg gcgacgctgg
  71 caacccatct cgaactctac cgcggctatg tcgcccagac ccgggagttg ttgggcgcgc tggcggacga
 141 ctcgctgcgg cgcgaagcgg ggggcgtcac ccgtcctcgc gaggccgttt cgcgacggat gagcttcgag
 211 ctcaacggcg tcaagctcca tgaatggtac ttcgaacagc tcgccggacg ttccggactg cgggttccgg
 281 attcgtcctc cgtggcggcc gagggcatgg acgtcgcgtt cggcggcttt gatggctggc gcgcggacgt
 351 cgaagcgctc gcgacgaccc gcggcatcgg ctgggtggtg gccgcctggg atgcgagcgc gggacagctc
 421 gtgaatctct gggccgacct ccatcacctg ctgctgcccg caggccacgg catcgtattc gtgctcgacc
 491 tctgggaaca cgcctactgg gacgatttcg ggccgaaggg gcggggcgcc tacagcaagt tcatcctcga
 561 aaacaccgat tgggaggtcg tcgaggcccg cttcgcacgg gctcggaacg gcgcctgagg ggggtcgacg
 631 gtcgcgggcg gtgcgagacc ggccgcgata ctcgtcaccg gttcagggat acgagatctc gcggaccacg
 701 taagcgccgc gacccgcggg cgtcgtccac tccacgcgct gaccgagccg ggcgccggcc agtgcgcggc
 771 cgagtggcga aaaccagttc accaaccccc tttcaggcgc ggcttcgttt tcgccgacga gctggaagcg
 841 actgcgggag ccgcgatcgt cctcgacgac gacctcggcg ccaaagcgaa cttcgtctcg cggcgggctg
 911 gcgagccgga tcacgatcgc gccctgcaac accgcgctga cctgcgccag ttcccgctcg agcgtcgcga
 981 gttcgctgcg ttccggaagg tcgtcgtcgg gcgacgccag caattcgtcc cgccgctgga ccagctgctg
1051 gaggcgcctg cgataacgct ccgcgccggc ggcggtcatg tagccgcgcg cggggttccg cgcgggcggc
1121 gtcgtcgtct ccgcagtgcc gccggcatcg cgcaccaggg cgctgctcac gacgcggcct cgcgctccgg
1191 gcggacgggg cgtcccaacc ctcgtgtcgc tgtctgcatc gtccaactcc gtaggcagtg gaggcgcagg
1261 tcctgtccag tgaaaagtcc ggggatctgc ggggcgtcga accagatgac cgtcatgccg tccaacagtc
1331 tccagttcga gacccgggtc gctgtcagtg atggacgtcg aaacccgtag gcccgcaccg accttgacac
1401 gctcgggcgg tgctatccgc ggctgtaggg catcgactac aggaaaagag ccctgccggc ggacagcaac
1471 gcagtgtccg cgaccgcaca cttcgaccca tcccgcccgg caccgaaccc tcatcacgga gcgcaaagca
1541 tgcacgtcgt cgaacagccc aggatcgagt cgtggagcaa ggcggcggcc ggccaggtcg aagagcagtt
1611 gcgcgagcgg cggcgcgcgt tctatcgccg gcgcgaggca ttggagcgca tccagtccgc gtcgggtgac
1681 ctggagcagc gcatcgccga gcttgaaacg cgcgagaggc gcctgcgcga actgctgcag caaatggacg
1751 gcctggtggc cgccaccgaa cacatcgcgc gtgcagggcc cgaaccaccg gcaagcgccg cggcgcaccg
1821 agacgctgcc tgaatgaagc tggagagcct ggccagccgc gtggtgcgct ggcagcggca acatggccgc
1891 cacgggctgc cctggcaggg cacacaagac ccgtaccgcg tgtggctgtc cgaggtgatg ctgcagcaga
1961 cgcaggtggt caccgtgatc gactactacg cccggttcct gcaacgtttt cccgacgtgc aggcgctggc
2031 cgcggcgccg ctggacgacg tgctcgcgct ctggagcggc ctgggctact acagccgcgc gcgccacctg
2101 caccgctgtg cgcaggcggt ggtggtgcag catggcggcg agttcccgcg cagcagcgag atgctggcca
2171 cgctgcccgg tatcgggcgc tccaccgcgg cagccatcgc cgcgttctgc ttcggcgagc gggtggccat
2241 cctcgatggc aacgtcaaac gggtgttgac ccgagcactc ggttttggcg acgacctctc gcggcccgca
2311 aacgaacgtg cgctgtgggc gcaggcccag accttgttgc ccgcgcaggg catcacggcc tacacgcagg
2381 gcctgatgga cctgggcgcc ggcatctgca ccctgcgccg gccgcagtgc gctgcctgcc ccttgcaacc
2451 cgtctgcgtg gcgcatgcgc agggccggcc cgaggcctac ccggtgaaga cacgccgcct caaacgtggg
2521 cagcgcgcca acgtggtgtt gtggctggtg cacggcctgc aggtctggct cgtgcgtcgg cccgagcaag
2591 gtgtctgggc cggcttgtgg agcctgcccg aatggccggc cgacgattca ctcggcacac tcgcggccgc
2661 ctggcccggc cacggcgaat ggctgccgcc ggtgccgcat gcgttgacac acttcgactg gacgctgcac
2731 ccgctgcgct ggcagttgcc ggcgcgggtg ccggcggcgc ggcgcaaggc ggtcgagcag gcactgccca
2801 caggccgctg gttcacgcgg caagaggcgc tggccgcgag cctgcctgcg ccggtgcgca agctcctggc
2871 agggtgagcc cagggcggcg cgcggcagga gcctcagtac ttgtaggggt cggcagcgtt gccggtggcg
2941 gcgcgctttt cacccggctt gtcgccaccc gcggccttga tgacgtgcca cacgccgccc gagccgtcgc
3011 cgctggtgtc gcccaccttg gcatcaccgg caaagtagta cagcggcatg ccgccccagg cccattgctg
3081 gccgccgccc ttgcgtgcca cgagcgtgag cttgccggcg gcctgggcgc cgtcggcagc catgaagggc
3151 ggccacaccg cagcgcagtt gtcgaagcag cggctttcgc ccgccacgtc tttgtcgaac aggtacagcg
3221 tcttgccggc cttgtcgcgc agcaggccgc cggtgtcggt ggtctgtgca aatacgccgg ccgaaccgat
3291 ggccgacagc gcggcgatgg cgagggtgaa gagagtgcgt ttcatgatga agctctttat gcgagggtgg
3361 gttgaaatca agcgctgcgg tgctgccgtg gcgcaccgcg acctgcactg tcggcctggc cttgtcccgg
3431 tgtcatgggg ctacggtccc ggtgcgccca tgtttcagat ttgccgcccg tgcagccggt gtgcgttcag
3501 gcgctgggcg cacagcaatg ccagcccact gaagctgccc caccagagcc aggccgccgg ccgccctggg
3571 ttgaaggccg cgtgatgcca ggccgatgca cccagcaagc ccagcgacaa caccagcaac aggtgcagcg
3641 ccggggtgcg cacgtagcga cgccgctcgc gtgccagcat ccaggccacc cctgcaaagc ccaggaaatg
3711 cgcgccgtag gcgccggcct gtgccggctg catgcgccac ggccattgca gtgccgccca ctgcggcgcc
3781 agcagcagca gcagcgcggt gatgccggcc cacagggcgg tggcctgcca ggcgcggctg gggtgctcgg
3851 ccggcgccgg gtcgtcgtca cccaccagca gcagggctga tgccgcagca cccacgccgc cggtgagcaa
3921 aagccaggcc gggccggtgc cgggtggcga ccaccaagcc gcagaaagcg tgttcgccac gccccaggtg
3991 gcggtggcgg cgagcggtat gcgcgctgcg gccgggtctg gctcgcgccg tgccgaccac agcccggccg
4061 cgagcgcgag tgcatcgcac ccacgcagcg tgtgtgcagt ggcggcagcg gcgtgggcca cagcgcagcg
4131 ccggcctcgg actcacagcc ggcctgccgg cgctgcgccc agcagcgcca ggccggtgca ggactgtacg
4201 gcgccagaca tcgacgcggt tttctcgcat cgagggcctg cgctactgga gagggcgccc cggcggggcg
4271 tcatgcgccg catagatttg caagcgccgc acgccggccc gcaaccaggc ccgttcggtt ctttcaaaca
4341 ccccgcagca ggctgcaatc tcgtgattgg acagcccgcg gtagagcgcc agcgcgaccg cctgccggtg
```

```
4411 ctcttgcgcc agcgtcccca gcccacggcg cagcaccgcc aggcggcgcg gggaggcagc ctgccatcgt
4481 ggccgtcatg ctcggtgtgg cgcgatgcgg ggatcgtctc ggcccagccg tcgtccaggg gcagcatcgt
4551 ctcgcgctct gcgcggcgcg cacgcaggcg gtcgatggcg cggttgcgca catgccagca gccaggtcat
4621 cggccttgcg atcgcgagaa gcaggcgccc gagcgtgggt tcctggtcgt cggcccggcg cgtggggcgc
4691 cggccggcga gtgggtgcgg tgccggtcgc gttggcactc gcggcggcgg gcgtggccgg cttcctggtc
4761 gcgcagtggg cctcgcgtcc cgcggccgtg ccgatcgcgg ctccgccgtc caccgtggcg ccgctgacgc
4831 tgccggccta cgcgccggct ccctacgtcc ccgcggcgcc tcccgcccgc gcgtcggtgc cggtgagcga
4901 accggtcgcg ctgccgcgca ccgtcccgtc tcccgctccg cgcggcgaag cggccgctcc cgcgcaggcc
4971 gaggctccgc cggtcgggac cttcgcgctg caggccgtca gcgagcagga cggccagccc gtcgccatcg
5041 tgaacggcca gctggtgcgg gtgggcgacg tcgtggaggg cgcgcgcgtc cttcgcatca cgccggagac
5111 cgtcgagatc gagaaggacg gccgccgcat cgtcctcgga ttctgaccgc gcctcatcgc gggtggcgcg
5181 cgaggatcgc ccgcaggcgg tcgagcggaa tcgcctcgac ggtgcgaccg ttcgcggtga cggtggtggc
5251 ccggagaagc gagttgagca cggcctcctc ggtcgcttcc agcacggcct cgaacaaggg cgagaccgcg
5321 tcgcccggca ggaacgatcg cgggcgcggc aacgtgtccc cgaaagcgta gcgggcctcg gccgacgtcg
5391 agaaggcgat cgcgtagtcg ccgcttccgt ggctgaacga cgagccggtc cgcgccaggg cgaacacggc
5461 gcgcgcggcc aggcggcgca gatcgcgcgc gtcgaagcgg cgcgtccgtg gcgaccacga tcaggcacga
5531 gccgtcggcc gcaccggcac gcgcgtccga cgcgcgccgc ccggcggcga gctcgcgccc accggcacgc
5601 cggccatgac cagatcgccg ccgtagttcg actggaccag cacccccacc gtgtacgagc tgccacccgc
5671 cgtcaccgcg cgcgacgagg tgccgatgcc gcccttccag ccgaacgcga tcgtgcccgt tccagcgccc
5741 acactgccct ccgcgaccgg accgctgcgc gcggcgcgga tggcgtccac gacctgcgcc ggtgtgacgt
5811 gctggccgcg gatgtcgttg aggccggagt cgttggtctc gcccaccagc gcgttcaccg atcgtgcacg
5881 gcccgctgct gctcgacacg gtggcgcgcc gcgcccagct gaacggcgag ccgctcgacc tcgcggcgcg
5951 cgaatgggcg gtgctggagg tgctgctcgc gcgcgtcgag aaaatcgtct ccaaggaggc gatcatccag
6021 gcggtcgcca actggggcga ggaactgacg cccaacgcga tcgaggtcta tgtctcgcgc ctgcgcgcca
6091 agctcgagcc ggcgggcgtg aagatccgca cggtgcgcgg cttcggctac atgctggaag agttcaagga
6161 gaaaaaagct ggtcggtagc ctgcgcgtca ggctgctcaa ggcgctgctg ccgccggtgg cggggctgct
6231 ggttctgggc gcggtcggcg cctatttcct ctccctcgag ccggcgagcg aagcctacga ccaggcgttg
6301 gtggacgtcg gcatcgccct cagcgaacgc atccgcagcg cgggcgacgc agtcagcctt gacttgcccg
6371 gggtggccga gcaggtgctg cgcacggaca agttcgacaa gatcaacgga acgaggaacc ccatccatgc
6441 gagagtcagc agggcgacct cgcgcggacc tttgcaactc cgcgcgacgt tgactccgcg actccggcgc
6511 ccgtgaggtg ctcgaatcac gaccatcacg acactggcga cgagaatcac cgccttagcg atccaagggt
6581 tcatgatcga tcagcggcga tcgcgtaatg gccgagacgt gccttggctg ccgatgtccg acttgctccg
6651 catctggacg ttgaccaagc ggtgtgcgcc gaccacgagg tcccgaagag cgtcgagacg aatgcgcgtc
6721 agtctcacga gcacacacgg gtggttcagg tagtgtttcc tcagatagta cgtggcaggg tcgtcttcga
6791 cgagtgcgtc acggtcggcg aaggccatca tcacgaccag cgagttcggt tcggcggact tgtgggacgc
6861 gacgcacacg aacatcttcc cgtgcacctt tagagcgggc tggccccatg cggttgtcac ctccacgtcc
6931 ggaagggcgc ggccgatagc ctcgactgcc gcgaacgtgt gcccgctgcg tttaccaccg tccccttcgc
7001 gcgctgatga agtgggtctt ctcggcattc gtcgtcccct ggagtctacg cgcgatcgag ggcccagcct
7071 ccgccgacct gtggccaaac gacgtgttca cgaagattac tcctagaaaa gtcgcgacgt gggcggctat
7141 ctaatcgaat tgccgtcggg ccgaaacagc cgagaagatg ctgctccctg gtctgtggcg gcttcgattg
7211 actgtgtgga atcggaatcc ccatcttttg gcatcaacgg gttggagctg gcgaccctaa cgttcgcgag
7281 ttggaaccgg atcgcggcct ggctgcgtca gctagaacgc ctgcctcagc cggttcgccg gggggcgctt
7351 ccagcgaaat ggatttgatg tacgcgcaaa agtcgagtgc cggcgcaacg gcgtcacttc gccgccttag
7421 ccgcaagccg cacgtcgtcg tgtgtgaaca ccgcaaaaat gaacggctgt gattcgagaa agtgcgccag
7491 atcgcgcaac gtcagatgaa gagccgaccg ccggtcctca tcgacgaaca tttggctgtt ttcccgggtt
7561 cgaaaggatg taatcagctg cttcgccctc aggatcaaac ttctcggtgc aacaggtcta cgatcgactg
7631 cgcaaagtgg ccggcggtcc ggcgacaacg gttccgacgg catgccatgg tccgcgggtc accgcgagaa
7701 gatagttgtt accaaccttc gcctctagcg ctcgcagcat ccgcgtcaag tgacggtcca tctcgccgag
7771 agtgacgcgg agctcactcg aatccggacc gtacttgtgg cccacgaaat ccgcgccctt gtagttcagc
7841 agaatgagat cgtggatggt gttctgcatc cccgggcgca gcacgatggt cgcctcgacg ccctcgccga
7911 cgttggcctg acgcggcgcc tcctcgcgcc attggaacgg cgagtggacg acgccgatcg gtttcatcgt
7981 cagcgtctgg tccgccggca gggtgaactt cggcagcgcg tggcggcccg gacgcttggg catcaggcgc
8051 ctgcggttgg tgcgaggagg ggggcgagcc aggtgtcgct gcgaccggtc gccggccgtg ctggcgccaa
8121 tcgccgagcg tcgcgacgct gcaggtccca gtgggtcgac ggtcggtccg gcctgaccgg cggctgaccc
8191 aggcgtcttc aggcgtcgcc gcgatcgatc cgcacgcggt tggccggcga cctccgatc
```

7.12 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK107

```
   1 gatctcgccg tactgcttgc gcagcttcat gatgggcgcc atgttgatct cgttgaaggt ggtcagcatg
  71 gcggtggtgt tcttggcctc cagcagacgt tcggcgatgc gcttgcgcag acgggtcatg ggcacgcgct
 141 tctcggtgcg accggccagc ggggctatgg gcgcaacagg tgcggctgcc acggcggcgg cgggggctgc
 211 cggcttgccc aggttcttga tgaaggcatc cacgtcttcc ttggtgacgc gaccaccctt gccggtgccg
 281 gtcagcttgg ccacgtcgat gtcgtgctcg gccaccaggc ggcgcaccga ggggctcaaa ccgtcggcag
 351 cgtcatcggc tgccacttcc accggcttct ccttggtctc ttcaccggcc acaggggccg ccttgaggat
 421 ggcgatcagc tggcgggaga gcacggtcgc gccttccagt tgcaggatgt cgcccagcac gccggcttcc
 491 ggcgcgggga cttccagcac gactttatcg gtttcgatgt caaccagtac ttcgtcacgg gcaaccagat
 561 cacccggttt cttgtgccag gtggcgatgg tggcgtccgc cactgattcc ggcaggtccg gtaccttgat
 631 ctcgatagtc atgtaatcag ttccttgtta cttcttggcc agcaggcttg ttccagagac ggagagggtc
 701 ggcttcacgg agcccccctcc ccttcacaac tcgtttattc cagggtcagc gcgtcttcca ccagggcttt
 771 ctgctgcttg gcatggacag acatgtaacc gacggccggt gaggccgagg ccggacgacc ggcgtaacgc
 841 agacgggcat tgcttggcag cacgctgtca tagtgatgac gggtgctgta ccaggcgccc tggttctgcg
 911 gctcttcctg acaccagacg aaatcggtga cgtgggcata gtcggccagg atggctcgca cttcctcttc
 981 cgggaagggg tagagctgtt cgatccgcac cagagccaca tcctgctgct ccgccttgcg acgggcatcg
1051 agcaggtcgt agtagacctt gccggagcag aagaccaccc gcttgacggc tttgggatc
```

7.13 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK108

```
   1 gatctgggtt cgtacaacgg cacatttgct tactttgact atccaaggat tccaggccat gagttctctg
  71 ccgaaattat tgaaattgag gaaaatgacc aggggttaaa agcaggcatg gtggttacct gcaatccgta
 141 ttttaactgc ggccgctgct attcctgtga acatggcatg gtgaatgcct gtatggataa ccagaccatg
 211 ggctgtcaga gggacggcgc gttctgcgaa tacataacca tgccggtcga acggatctat gaaggaaagg
 281 ggatcgatcc aaaggttctg gctgcgatcg aaccattctg catcagctat cacggagtca gccatgcaga
 351 tgtcaaaaag ggagataagg tcctggtggt gggttccggt accatcggcg ttcttgcggc aatagccgct
 421 aaagcaaaag aggcagaggt ttatatggcg gacatctctc aggggaaact ggatatggcc gcaggattcg
 491 gtattgacgg aaccatttta aacacttctg aggaggcatt ccggaaaagt gtggatcaga tcaccgatgg
 561 aaacggcttt gatgtagcga ttgaagcagt cggcctcccc tcaacgttcc agaactgcat tgatgccgca
 631 tgtttcggag gccgggtgat c
```

7.14 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK109

```
   1 gatcttgagc attttgcgat gggcttttca ctttctgaag gcattattga gtccccgcag gatatctacg
  71 gcatggaagt ggtgccttct tgtaacggat tagaagttca ggttgagctg tccagccgtc gttttatggg
 141 attgaaagag cgccgtcgag ctttggccgg tcgtaccggt tgtggcgttt gcggcgtgga acagctcaat
 211 gacattggca agccggttca gcctttggcg tttacccaga cgtttaacct ggcggacctc gatcgcgcgt
 281 taaagcattt gcatgacttc cagcccgtgg ggcaactgac gggctgtacg cacgcagcgg cctgggtcca
 351 gccgtcgggg aatctggcgg gagggcatga agatgtgggc cgtcacgtgg cgctggataa actgctcggg
 421 cggcgtgcaa ttgaaggcga aacatggcgg cagggagccg ttttagtctc cagtcgcgcc agctatgaga
 491 tggtgcaaaa gtcggcgatg tgcggcgtgg agattctgtt tgctgtctct gccgcgacga cactggccgt
 561 agaagtagcc gaacgctgta acctgacgct ggtgggtttt tgtaaaccgg gcagggcgac gatttatacg
 631 catccggaac gtctggtggc ggagtaacgc caccaggctg ccacaatgct gcctgagaat gccagctcca
 701 tcattacagc aacgggcgag ccgacgatgg cattgttcag tagccagcac aggctgccac acaatgtgta
 771 tccacgtaat tttccaccct gtgtctgaaa cgacgcatag gtcatcagca ggcttcctgc gagcggcagc
 841 aggccccaca ttccctgcca gagataagca ctacacagca gtgacccaat cataaatccc cacatggccc
 911 agcggcgttg cgtcacgatg gctatcgcat aacgacaggc ggcgatgagc attaatcctg cggcggcggg
 981 ttgatgcaaa agataaaaat gaatggccag caggctggtt gagctggtca acagcactaa cgtcatcgcc
1051 cgacgccgga aatgaaaggc tgaaatatcc agcacaaagc tgatgcaggc cagcagctga gagagaaaaa
1121 atgcgttcat catgcgcgct atcttgtgaa gagtggcggg acaataatct atgcaaaaag cgaatgcgtt
1191 aacctttgtt aagacgctgg cgaatgcgag acaggctaac gggcgtaatg ccaatgtagt gggcgaggtc
1261 ccgctgagtg agctgcaatt cccaactggg aaagtgtgtc tgaacatact ggtagcgttg ttctggcgta
1331 ttaagcagca gcatttgttc ttttttctct ttgtagatc
```

7.15 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK110

```
   1 gatcactctc tacaagcacc gctatcccat atcatttttc cgcttttaat tacttgaatc tgataatttt
  71 tttgaattac attcttgccc ttaccttcaa gcttccatga aaagcgtgga tttacatcaa ttcctattgg
 141 gttggttcgg tattctattg taaaatcctt aatcattctt cttctccttc catttttctt tcttattcaa
 211 attctaatct taatccatct ctatgcattg cgaaatcagt tgtattattg taaaatcagt ttattacatg
 281 tggcttttat caatcagaga ggaaattcat atgattttag acataaaact gttctgcgaa aaattttaca
 351 attcaacctt tatcccaata gcatgccatc atgtttccac cggtaaatct cttttttttc ctaaaacgct
 421 agatacaaca gccgcttttg gaaacactct agatgggttt atgaatttta ccaagaatcc tgattacttc
 491 attgcagatt ccttcagcta ttatggctat gctaagtcgc ttaagaccga ctactgcatc attatcggtc
 561 ccatattcag cacaccgcct tctgaatcca ccttacatgc ttttatgcat gaatgggcta ttcacggtaa
 631 tgatcgggag ctgatatcta actttttagc cactactccc cagctctctt tttatcagtt tttacaaacg
 701 ctatcttatc tgcatttctg tctgaatgat caggaagtta atctcactgc acagttcatt caggaagata
 771 ccgatatgat ttctaaaata tctgccattc actcgaacca actgaatgac tggaaagaaa atcaacggta
 841 ccacaacacc tatcattttg aaagagagct tatgcggtat attcaggaag gtgatgttgc taagctgcaa
 911 aagttgattt cttcccctgt ttacctgtct gaaggtcaat tagccgacaa tgcccttcgc cagtcaaaaa
 981 acattttgat atccactgta tcactggcca tgagaagtgc cattgccggt ggaatgaata ccgaggaggc
1051 ctattcgctc tccgatgttt atatccagga aggtgaaaag gcacagcaat tatcccaggt tgcggatctt
1121 aatgaatcga tgctgataga ttatgcaaaa cgagttgcca aggcaaagat tccccagggc atgtccaaag
1191 aaatatttga ctgcatacaa tttattacga gccatattaa tgagcccatt catgtcgatg atgtcgttgc
1261 aaacattggc agaagccgta cttatctgac caaaaggttt aaagatgaat taggatttga cattagtaat
1331 ttcattatga gatgcagatt agaggaggcc aaaagtttat tgaccttttc agacaaaagc ctgagcgaaa
1401 tcagcaatta tctttgcttc tccactcagg catattttca aaatgtattc aagaaaaaat atggcgttac
1471 tccgaaccaa taccgtaagg acacaaagta tattcagtga tggtacctct acacaaactg catactgaaa
1541 tggcatctgt atgtcgatca ggtgatgacc ttcctgatga tcctgcctct cgccctgcta accgcaggcc
1611 tgttaggcac attgttcgtg gtgattaaaa aaaaatgctg tagcgcctga gcagtaaccg taggccgggt
1681 aaaactaccc ggcattttcg cctgatggcg cttcgctaag tatacctgct aaaaattagc tcccctgcat
1751 cgtgcgaatt cttgccgcat cttcccctgg tgtcacaccg aagtaccgtt tgaactcccg actaaactgc
1821 gaagcgcttt catagccaac ccgcattgcc gctacgctgg ccttcatgcc gtcgtggata atcatcatcc
1891 gcgccttatg caggcgataa ctcttcaggt actgtagcgg cgaggtgctg gtcaccgatt tgaaattatg
1961 atgaaacgcc gacacgctca tattggcctc tgctgccagt tgttcgacgt tgaggttctc ggtgtactta
2031 ttttcgattc gcttcagcac gcgactgatc aaactgaaat gcgtctggcg actgaccagc gcgagcaatg
2101 cgccaccccg tggaccagtc agcacatggt agaggatctc acggatgatc tgtttgccca gaattcgcgc
2171 gtccagcggg cgctccatca catccagtaa acgctcagcc gcgcaaagaa tctcgtcaga aagcgtggca
2241 gagttaatcc cgctcgccgc cattgagggc tggaacagtt catcttcgcc aatatccatc agtagctcct
2311 gcaattgcag gatatcgaca ttcaggcgca taccggccag tggaatttcc ggtgtcgcat acgtttcaca
2381 ttcaaagggt aaaggtacgg tgagcagcag atattcgttg gcgtcataac gaaatatgcg ctcattgata
```

```
2451 taaccaattt tatgacccga gaagagcaat atgatgccgg gctgatacat caccggcgtg cgtagccccg
2521 gttccgtgcc atacagtaaa cgcacatccg gcagcaactc actgagttta ttttcattgt ttttcagctg
2591 cttaatttta tctgtcagca gaaggcagat cttatcacgg ttcatagaac accatttcgt catcggattg
2661 caacaccaac agtgtgcgca tttttatcct ttttctccag cagcctgtag aaataggcaa gacattggca
2731 gaaatgagca ttgagaggaa cgtgtctgac gaccacaatg ttcaccatca ggcagacact cgcctgccct
2801 ctttttacc cacataaggg aacgagcaat gaacaacttt aatctccata ccccgacccg cattctgttt
2871 ggtaaaggcg ctatcgctga actgcgcgat caaatccctc aggatgctcg cgtgctgatt acctacggcg
2941 gtggcagcgt gaaaaaaacc ggcgttctgg cacaggttca ggatgcgctg aaaggcctgg acgtgctgga
3011 gtttggcggt attgaaccga acccggctta tgaaacgcta atgaacgcag taaaaatcgt gcgtgatgag
3081 aaagtgacgt tcctgctggc ggtcggcggt ggttctgttc tcgacggcac caaattcatc gccgctgcgg
3151 cacagtacgc tgacggcatc gatccatggc gtattctgga aacccacggc aatgacgtaa aaagcgccat
3221 cccgatgggt tccgtattaa ccctgccagc aaccggctct gaatctaact ccggcgcagt aatttcgcgt
3291 aaaaccaccg gcgataagct ggcctttatg accccgtttg tgcagccggt ttttgccgtg ctggatccgg
3361 tttacaccta caccctcccg ccgcgtcagg tggcaaacgg tgtggtggac gcgttcgttc atactgttga
3431 gcagtatgtg acttatccgg ttgacgggaa aattcaggat cgctttgccg aaggcattct gctgacgctt
3501 atcgaagaag gtccgaaagc attacaggag ccggaaaact acaacgtgcg tgcgaacgtc atgtgggcgg
3571 caacccaggc actgaacggt ttgattggcg cgggcgtacc gcaggattgg gccacccata tgctgggcca
3641 cgaactgacc gcgatgcatg gtctcgatca tgcccaaacg ttggccatcg ttctgcctgc gttgtggaat
3711 gaaaaacgcg ataccaaacg tgccaaattg ctgcaatacg cagaacgtat ctggaatatc accgaaggaa
3781 gtgatgacca gcgtatcgac gccgccattg ccgctacccg cgctttcttc gaacaaatgg gcgtacccac
3851 tcgtctgtct gactatggcc tggacggtag ctccatcccg gcgctgctgg agaaactgga agcacacggt
3921 ggtacgaaac tgggcgaaca tcaggacatt acgctcgacg tcagccgccg tatttacgaa gcggcgcgct
3991 aaggtttttt cacctcagac tttcgttttt gggtatttag gccagactta agtcacactt gtgtcaccgg
4061 agcgcgctcc ggtgacaata atccaggggg gaattatgaa ctaatccaac cgttatcaaa ctacaggatg
4131 gtaacgtgat gccacaactg ggcctggggg tctggaaggc aagtaatgag gaagtaatct ccgcaatcca
4201 taaagcgctg gaagtgggtt atcgctctat cgataccgct gccgcgtaca aaaatgaaga aggtgtcggt
4271 aaagcattac gcgattcggg gcttccccgg gaagccttat tcatcaccac taaactgtgg aatgacgatc
4341 agaaacgtcc ccgcgaagcg ttgctcgaaa gcatggagaa actccagctc gattacctcg atctttatct
4411 catgcactgg cctgtaccgg cgatcgacca ttatgttgaa gcatgggaaa acatgatcga cctgcaaaaa
4481 caggggctca tcaaaagcat cggcgtgtgc aacttccaga tc
```

7.16 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK111

```
   1 gatctgggag cagatatccc aaaaattgcg ctgatgccgc aaaataaaac ggatgtcctg acgctgctta
  71 gtgcaacgct tcaaatgcag gagcactacg ctgaccgccc aattatcacc atgtcgatgg ccaaaacagg
 141 cgtaatttct cgactggcgg gcgaagtctt tggctctgcg gcaacctttg gcgcagtgaa aaaagcctcg
 211 gcacccggac aaatttcggt ttccgacctg cgtaccgttc tgacaatatt gcatcaagct taataacata
 281 atatttcagc actgttttaa ataatcccct gcctgttatt cgtgtcatga cgaatatcgg gcagatggct
 351 taatactttc gcaatacgca tttattttta tcgaataaaa cgataggcag gcactcgcct gtcatctgga
 421 gtctatatga agcttaacag acctgaacgt attgacggtc gggtgcccgt attatcggca gccgacgcaa
 491 tttattatat ccctgatgaa gccacactct gcgtattagg tgccggtggc ggtattttgg aagccaccac
 561 gttaattagc gcactagctg ataaatataa aaataatcaa tcaccacgca atttatcact tattagccca
 631 acaggactgg gggaccgcgc cgaccgggga attagcccgt tggcacagga gggtttagta aaatgggcgc
 701 tgtgcggaca ctggggacaa tcaccacgga tcacacgctg tgtgtgccgt tgattgctca aggtgaggct
 771 atcggcctgc tctcatttca gaatctcagc gatgataccg cgccttcccg cgcgtatctg gaactgatgg
 841 cagaagcgct cggtctggca ttagccaatc agcgtctgcg cgatgcgtta ctggaaaaag cactctacga
 911 cccgctgacc ggtctgcgca atcgccatca tctggaagac actttgcgca cccagatggg ccaggcgata
 981 cataatcaga cacccatcag ttgcctgatg attgatattg atcacttcaa agatgtcaac gaccggttcg
1051 gccacgaggc gggcgatggc gttatcaagg gcgttgccgc gattattcag cgcgccatac gcgacagtgg
1121 gatggcgttc cgctacggtg gtgaagagtt tttggtcctg ctcagcggca tgggtgaaga agaggctaac
1191 cgcatggcga cggacatcta caacggtgtg catgcgctta cgctgcgctt tgggacgtcg gacatcagcc
1261 atatcgacgt gtctattggc gttgccagct acccacagca cgcccaaagc gacaacctgc tgcgcgccgc
1331 tgacgtggcc ctgtatcgcg ccaaagagtt gggccggtca cgaattgtga gcttcggtat gctgcaagcg
1401 agctaaacgc gggcatatcg cgatatgtta ttgcctgcaa gagcataaac caatacgaaa ttgcacgttg
1471 tcatagcatg gtagagcgtg ggatgaccgg agaacaacaa gaggactata cgatgaagca cattgatttt
1541 tacatgatag atgcctttac cgacaccact tttggtggca atgccgccgc agtgtgctga tgaatcccct
1611 aatgattttt atcaaaatca ttaagttaag gtagatacac atcttgtcat atgatcaaat ggtttcgcca
1681 aaaatcaata atcagacaac aaaatgtgcg aactcgatat tttacacgac tctctttacc aattctgccc
1751 cgaattacac ttaaaacgac tcaacagctt aacgttggct tgccacgcct tacttgactg taaaactctc
1821 actcttaccg aacttggccg taacctgcca accaaagcga gaacaaaaca taacatcaaa cgaatcgacc
1891 gattgttagg taatcgtcac ctccacaaag agcgactcgc tgtataccgt tggcatgcta gctttatctg
1961 ttcgggcaat acgatgccca ttgtacttgt tgactggtct gatatccgtg agcaaaaacg gcttatggta
2031 ttgcgagctt cagtcgcact acacggtcgt tctgttactc tttatgagaa agcgttcccg ctttcagagc
2101 aatgttcaaa gaaagctcat gaccaatttc tagccgacct tgcgagcatt ctaccgagta acaccacacc
2171 gctcattgtc agtgatgctg gctttaaagt gccatggtat aaatccgttg agaagctggg ttggtactgg
2241 ttaagtcgag taagaggaaa agtacaatat gcagacctag gagcggaaaa ctggaaacct atcagcaact
2311 tacatgatat gtcatctagt cactcaaaga ctttaggcta taagaggctg actaaaagca atccaatctc
2381 atgccaaatt ctattgtata aatctcgctc taaaggccga aaaaatcagc gctcgacacg gactcattgt
2451 caccacccgt cacctaaaat ctactcagcg tcggcaaagg agccatggat tctagcaact aacttacctg
2521 ttgaaattcg aacacccaaa caacttgtta atatctattc gaagcgaatg cagattgaag aaaccttccg
2591 agacttgaaa agtcctgcct acggactagg cctacgccat agccgaacga gcagctcaga gcgttttgat
2661 atcatgctgc taatcgccct gatgcttcaa ctaacatgtt ggcttgcggg cgttcatgct cagaaacaag
2731 gttgggacaa gcacttccag gctaacacag tcagaaatcg aaacgtactc tcaacagttc gcttaggcat
2801 ggaagttttg cggcattctg gctacacaat aacaagggaa gacttactcg tggctgcaac cctactagct
2871 caaaatttat tcacacatgg ttacgctttg gggaaattat gaggggatct ctcagcgcag tgtgtcctct
2941 tacagaatgg ttgcccgatg agatattatt aaaaatgtct cagcaacata accagtcaga aaccgccttc
```

```
3011 tttgtcacca ccgatagcgg ctttgagcta cgttggttta ccactcaggg tgaaatcaat ttatgcgggc
3081 atgccacact ggctgctgca cacgtcatct ttgaacatct tgactacccg gacaccacaa ttcacttcga
3151 aacccgattt gttggcccgc tgaccgtgac ccgcagtggc gaatggctga cgcttgattt ccccgcctgg
3221 aataccgaat cggttatacc gccgccttta ctattggaaa cgctgggtat cacggaatac aaagaagtcc
3291 gcgtggcacg tgattacatg gtcgttatgg agaatcagca gcagattgca gcagtacgcc cggatattca
3361 cgccatgctt ccgctgggaa aaatggtctg cattacggcg ccaggcgatg gggaatacga ttttgtcagt
3431 cgattcttct gcccaggcga ggccgttgcg gaagaccctg tcacaggttc ggcacatagc atgctcattc
3501 catactgggc tgagaaactg aacaaaacac agatgctggc acgccaggtg tccgagcgcg gcggggattt
3571 acgctgcaag ttagtgggcg atc
```

7.17 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK112

```
   1 gatcatgctc atcggtgaac cctattggcg tcagctcccc gcaacggacg agatagccaa ggcctgtggc
  71 gtcagctcga cgaccgattt tctgacgcta ccagggcttg tgagtgcttt cgatgaactc ggctacgacg
 141 tggtggaaat ggtacttgca gaccaggaag gctgggaccg gtatgaagcc gcgaaatggc tgaccatgcg
 211 ccgctggctg gaggccaatc ctgacgacga cttcgccgcc gaagtcaggg ccgagttaaa catcgcgcca
 281 aaacgccacg taacttacgc gcgggaatac tttggctggg gcgtgttcgc gctcatcgcc aggtaacaac
 351 aggttcccgg tatttctgac cggagatacc gggggcttcg cctttgcttt gatctgatgc atcacctgca
 421 caatacatat tctgtatatt tatcaatcag gacatcacca taaggagcat catatgtcac aacatgaaca
 491 gttctgtcag gcttgcggaa tgccgatgtc cgcacccgat gcacacagtg ccagtaatca atattgcgcg
 561 tactgcagcg acagcaacgg caatcttaaa ccttgggaag aggcggtatc aggcctggcc agcttccttg
 631 attcctggca aaaagtcggc ccggaagaag cacagaagcg agcaaaacgt tacctgacgg caatgccagc
 701 ctgggctcat aaagcagatg aatgaaaaac aaagcctgag tgatttaggc tggctaaata ccctatcgtc
 771 atgctgcacg gcgcaggtca gttctcccgt acctgggaaa gtaccccgga tggtcgcgaa gggttccaga
 841 acattttcct gcgtcgcggg ttctcaactt atcttgtcga tcagccgcgt cggggcagcg ccggacgcac
 911 tactgtagaa ggtactgtta cgcctaagcc ggatgaacag atgtggttca atcagttccg cgttggcgtg
 981 tggccagagt attttaaggg cgttcagttc tctcacgaca aagaagcact gaatcagtat ttccgtcaga
1051 tgaccccaaa taccgggccg tttgatatca atgttatctc tgatgcgatg tccgccgtcg tggataaatc
1121 cggcccggca atcctcttca cccactctca gggtggcgga ccaggctggt atacggcgat gaaaaatgac
1191 aaggtcaaag ccatcgtcgc cttcgagcct ggcagcagct ttgtcttccc ggaaaaagaa ctcccagccc
1261 ctatgccaag cgcgttcgac acgctgaagg gtgaaccagt gccgatggag cagtttatgg ctctgaccaa
1331 aatcccgatt ctgattattt acggcgataa cataccggat aaacctgtcg ccatgcccgc gcaggacagc
1401 gggcgcgtac gccttgcaat ggctcgcgaa tggcgtgatg tggtgaacaa gcatggcggg gatgtcacgg
1471 tgacgcatct gcctgaagtg ggaatcaaag ggaataccca cttcccgttc tctgatctca ataatgtgca
1541 gattgctgac ctggtgagtc agtttttgaa agagaaaaat ctgcagtagc cgttttagaa aatcacctaa
1611 atcatttaaa agagcgccca acacatagtg ggcgctcatc gccttgtgta acttattcaa gtaccggcaa
1681 aatataacct ttacgcgcac tttgccatgc aagaacagcg aggcccaacg caatgaagga cagaattgcg
1751 cccgcccagt tcggagaagc cagtccaaaa cccgcagcaa tggttacccc accggcccat gcccccagcg
1821 catttcccag attaaacatg ccgatattga ccgaggccgc cattgtcggg gctcccgcat ggctggcgcg
1891 ctccataacc agtttgtgaa tcggtgagac cgtcgcgaag ccgaaggccg ccatcaggaa gactgagatg
1961 ccggcaaccc actggctttc aacacccgcc cagaagacca gcagcaccaa cccctgagcc gcgagggtaa
2031 cgaacagcgt gccaaacaga gagcggtcag cgaagcgtcc accaatccag ttaccgacag caagtcccag
2101 accaaacagc accattaacc ctgccacgcc gcctgaggag aaaccggcct cctgcaccat cattggcgca
2171 atataggtaa tcgaggtgaa aaaggcggcc ggaccgaaaa tcgtgatccc catgaccagc agcactgcgg
2241 gtcaacaaag gctctcagtt cgttgcgtaa agcaatcgct ttgcctttcg caatatgcgg aaccagcacg
2311 gctatgcttg ccatcgtcag caccccgata ccagcaatga tcctgaaaaa aatgttaaga gaagtactat
2381 attaggtatg ttaattagta ctgttttata tatattaata agtgttgtag ctatgggagc tatgagtcaa
2451 agtgaattag cttcaagtac tgctcctatt tctgatataa tagttaaagt tttaaattta aagagcttaa
2521 atttcttaaa tatagctata gctattagta ttttaggaac agctatggga tggctattat caactgctag
2591 agtaggatat gctgctggag aggatggaat tttccctagt gtatttgcta aggtacatcc taagtataat
2661 acgccacatg tagccttaat aataggtagt atatttataa atattatatt cttaatgaac tttactaagg
2731 gtttagcagg ggcatatagt tttatagttg tattagctac tttaagttac ctaccaatat atgcaatttc
2801 aactattgca gaaataatac ttatggttaa agaggataaa aaacctacat ttaaaaaaca tttaggttta
2871 ataataagat gtttaatagg ttttgctttt gcaatttggg caatatatgc ttcaggagct gaaatagtaa
2941 tgtatggatt tattttaata ttactaggag ttccgattta tggatatatg agcataaaaa aacacttccg
3011 ataaattgaa ttttgatatt taacaaattt gttatgtaat gttgattaat ttattatata ataaatataa
3081 gttttgaaat tggggttata ttatttatgg tacagaaatt tgcgtgggga gtgtattggg atggcaaaag
3151 tagaagcttt agaagaggaa ttagttgaat taaaacttaa aaaaagaaat ttcattttag ccaataaaga
3221 tacaaaagag attgataatc ttataaaaaa tttagaagaa gaaattatga gaattaaatc aaataattga
3291 tattcagtag ctatgaaaga gaaattactc tttcatagct ttttttgttt aataaaaaag aaagtgttct
3361 caaataaact tttaaagtga gagtagtcaa atatgccatc ataaagctta agaagaatgg atc
```

7.18 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK113

```
   1 gatctggccc cgctggcgca tatgtccctg acgttgctgg gggaagggaa ggcgcgctgg cagggggaat
  71 ggctcccggc gaccgaagcg atgaaaaagg ccgggctgga gccgattacg ctggaggcga aagaggggct
 141 ggcgttgctg aacgggactc aggcgtccac cgcttttgcg ctgcgcgggt taatcgaagc ccaggagctg
 211 tttgcgtctg cgacggtgtg cggggcgctc accactgaag ctgtgctggg ctctcgtcgt ccgtttgacg
 281 cccgcattca cgctgcgcga ggacaacgtg ggcagattga cgccgcaacg ctgtaccgcc atgtgttgac
 351 cgactccagc gcgctttcgc aatctcacca caactgtgaa aaagtgcagg atccgtattc tctgcgctgt
 421 cagccacagg tgatgggcgc gtgtctgacg caaatacgcc aggtgatgga cgtgctgttg gtcgaagcca
 491 acgccgtgtc ggataacccg ctggtgtttg ccgaagaggg cgatgtgatt tccggcggca acttccatgc
```

```
 561 ggaaccggta gcgatggcgg cggataatct ggcgctggcg attgcggaaa tgggggcgct atcagagcgg
 631 cgtatcgcgc tgatgatgga taaacacatg tcgcagttac cgcctttcct ggtcaaaaat ggcggcgtta
 701 actccggctt tatgattgcc caggtaaccg ctgccgcgct ggcgagcgaa aataaagcgc tggcacaccc
 771 gcacagcgta gacagtctgc caacgtccgc caaccaggaa gatcatgtgt ctatggcacc ggcggcgggt
 841 cgcagattgt gggagatggc ggcgaatacg cgcggcgtga ttgctgtaga gtggctggcg gcctgtcagg
 911 ggatcgattt gcgcgaagga ctgacctcaa gcccgctgct ggagcaggcg cgtcaggctt tgcgtgaaca
 981 ggtttcgcac tatacccagg accgcttttt tgccccagat atcgagtgtg cgaccgaact gttagcgcag
1051 ggaaccttgc tgaagctggt gcccgagttt atgtaacaca atgccggatg gcgctatcgc cgtccggcag
1121 tatttttcaa tacaccagct taatttgctg tgctttcgca taatcaacaa attcatcgtc aggacgggaa
1191 tcgctgatga tgctatcaaa gcgtttcagg tcacccatcc gcgcgggacg caccttgcca aacttgctgt
1261 gatccaccac caatacgtga tattgcgcca ttgacatcgc ccagtgcttc accggtaatt cttccaggtt
1331 aaaacaggtc gcgcccttgt caatgtgtat gccggccgca gaataaaacg cgatatccgg acacagatta
1401 ttcagcgttt cttgaaaatc gagcggtttg aaaatagcgt tgctggcatg gaattcaccg ccacacaaga
1471 tgacgcgaca cagtggcttt tcctgcagag ccagaaaggt attcagcgag tagcagatgg cggtgaaagg
1541 caggtcatta tcgatagctt caatgatcca tggcgtggtg gtgccgcagt caaaaaagat cgtctgatgc
1611 gcctgaacga ggctcgcagc ctgctgcgca gcacgacgtt tctcatccac cagtcgggac ttttggtcgc
1681 tgattaggta gtggctggcg ctacggggtt ccagaacaat atagcctccc agcaacacaa ctggggcatt
1751 gttattattc aggtcgcgac ggatggtcat ctcagatacg cccagcagcg tcgcggcttc tttaaggtgt
1821 aatttatcac tgcgtttcag cgcctgcagc aattgaccaa tacgctcgtc gcgtcgtgtt tccatagttc
1891 ccctggtgag tagagtaagc gcttcatatc gcgtgcttaa tactactctt tttaccgtgg attagtcacg
1961 cacccagcct ttacggatc
```

7.19 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK114

```
   1 gatctgggag cagatatccc aaaaattgcg ctgatgccgc aaaataaaac ggatgtcctg acgctgctta
  71 gtgcaacgct tcaaatgcag gagcactacg ctgaccgccc aattatcacc atgtcgatgg ccaaaacagg
 141 cgtaatttct cgactggcgg gcgaagtctt tggctctgcg gcaacctttg gcgcagtgaa aaaagcctcg
 211 gcacccggac aaatttcggt ttccgacctg cgtaccgttc tgacaatatt gcatcaagct taataacata
 281 atatttcagc actgttttaa ataatcccct gcctgttatt cgtgtcatga cgaatatcgg gcagatggct
 351 taatactttc gcaatacgca tttattttta tcgaataaaa cgataggcag gcactcgcct gtcatctgga
 421 gtctatatga agcttaacag acctgaacgt attgacggtc gggtgcccgt attatcggca gccgacgcaa
 491 tttattatat ccctgatgaa gccacactct gcgtattagg tgccggtggc ggtattttgg aagccaccac
 561 gttaattagc gcactagctg ataaatataa aaataatcaa tcaccacgca atttatcact tattagccca
 631 acaggactgg gggaccgcgc cgaccgggga attagcccgt tggcacagga gggtttagta aaatgggcgc
 701 tgtgcggaca ctggggacaa tcaccacgga tcacacgctg tgtgtgccgt tgattgctca aggtgaggct
 771 atcggcctgc tctcatttca gaatctcagc gatgataccg cgccttcccg cgcgtatctg gaactgatgg
 841 cagaagcgct cggtctggca ttagccaatc agcgtctgcg cgatgcgtta ctggaaaaag cactctacga
 911 cccgctgacc ggtctgcgca atcgccatca tctggaagac actttgcgca cccagatggg ccaggcgata
 981 cataatcaga cacccatcag ttgcctgatg atggatattg atcacttcaa agatgtcaac gaccggttcg
1051 gccacgaggc gggcgatggc gttatcaagg gcgttgccgc gattattcag cgcgccatac gcgacagtgg
1121 gatggcgttc cgctacggtg gtgaagagtt tttggtcctg ctcagcggca tgggtgaaga agaggctaac
1191 cgcatggcga cggacatcta caacggtgtg catgcgctta cgctgcgctt tgggacgtcg gacatcagcc
1261 atatcgacgt gtctattggc gttgccagct acccacagca cgcccaaagc gacaacctgc tgcgcgccgc
1331 tgacgtggcc ctgtatcgcg ccaaagagtt gggccggtca cgaattgtga gcttcggtat gctgcaagcg
1401 agctaaacgc gggcatatcg cgatatgtta ttgcctgcaa gagcataaac caatacgaaa ttgcacgttg
1471 tcatagcatg gtagagcgtg ggatgaccgg agaacaacaa gaggactata cgatgaagca cattgatttt
1541 tacatgatag atgcctttac cgacaccact tttggtggca atgccgccgc agtgtgtcct cttacagaat
1611 ggttgcccga tgagatatta ttaaaaatgt ctcagcaaca taaccagtca gaaaccgcct tctttgtcac
1681 caccgatagc ggctttgagc tacgttggtt taccactcag ggtgaaatca atttatgcgg gcatgccaca
1751 ctggctgctg cacacgtcat ctttgaacat cttgactacc cggacaccac aattcacttc gaaacccgat
1821 ttgttggccc gctgaccgtg acccgcagtg gcgaatggct gacgcttgat ttccccgcct ggaataccga
1891 atcggttata ccgccgcctt tactattgga aacgctgggt atcacggaat acaaagaagt ccgcgtggca
1961 cgtgattaca tggtcgttat ggagaatcag cagcagattg cagcagtacg cccggatatt cacgccatgc
2031 ttccgctggg aaaaatggtc tgcattacgg cgccaggcga tggggaatac gattttgtca gtcgattctt
2101 ctgcccaggc gaggccgttg cggaagaccc tgtcacaggt tcggcacata gcatgctcat tccatactgg
2171 gctgagaaac tgaacaaaac acagatgctg gcacgccagg tgtccgagcg cggcggggat ttacgctgca
2241 agttagtggg cgatc
```

7.20 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK115

```
   1 gatcagcagc gtctcggtgg tggcgatatt gcctttacgg ctaatcccat ccagaagatc gcctttggtg
  71 ataccggtcg cggagaagat aacgttatcg ctgcgtgcca tttcgtccag acgcagcgct ttaccggctt
 141 cgatacccat gacctggcag cgagccagtt cctgttcacc aatacggcgg ttctcttcgc tgtcaccttt
 211 gacatcatga cgtgccagca gacgaccctg catgtcgcca tccagcgcgc ggataacggc ggcagaaacc
 281 acaccttccg gcgcgccgcc aatgccgtac agcacgtcaa cttcgctgcc tggcatacaa gtcagaatgg
 351 atgccgcaac gtcaccgtcg ggaatggcaa acacgcgcac gcccagcttc gccatctcgg cgataacatc
 421 atcgtggcga ggcttggcca gaatcgtcac ggtcagttcg ctaagcggct tgttgagtgc ggcggcgatg
 491 ttacgcaggt tagtttccag cggcaggttc aggtcgatag cccctttgc acctggcccg acaatcagct
 561 tctccatgta catatccggc gcgttgagga agcagccttt gtcaccgacc gcgaggaccg ccagcgcatt
 631 cgcctgaccc attgctgtca tgcgcgtacc ttcgataggg tcgactgcaa tatctaccgc gtcgccgaga
 701 ccggtaccga ctttctcacc gataaacagc atcggcgctt catcaatttc accctcgcca atcacgatgg
 771 tgccgtcaat attgacctgg ttgagcataa tacgcatggc gttcaccgcc gcgccgtcag cggtattttt
 841 atcgccgcga cccagccatt tatagccagc cagcgccgcc gcttcggtga cgcgtgaaaa ttcaatggca
 911 agttctcgtc tcattgcaaa ctcgtagcag aaaggaatgg cgcgaagtgt agcacagggg agggaggggg
```

```
 981 attattgatg tgtgcggggt tgcccccgca cttgtgttac cttaattact cttcgtggtc ttcccacgcc
1051 agggcgcgtt taaccgcttt tttccagccg ctgtaacgga agttacgttc ggttgtttcg atcccagggc
1121 ggaattcgcg ctcgatggcc gctttttcct gcagctcatc caggttctgc cagaaaccgg cggcaagtcc
1191 cgccagatac gcggcaccca gcgcggtgac ttcgcgaact tccgggcgtt caacgcgggt gccgaggatg
1261 tcggactgga actgcatcag gaagttgttg gcgaccgcgc cgccatcgac acgcagcgcg tgccaacgaa
1331 taccggagtc ggcctgcatc gcttccagta cgtcgcgggt ctggtaagcg atagactcaa gcgttgcacg
1401 gatgatgtgg ttggagttta cgccacgggt caggccgaag atggcgccac gtgcatacgg gtcccaatac
1471 ggcgcaccca gaccggtgaa ggccggaacc acgtacacac cgttggtatc cttcactttg gtggcgaaat
1541 attcggagtc gaacgcatcg ctgatgagtt tcatttcatc acgcagccac tggatggatg cgccagccat
1611 aaacacggcc ccttccagcg cgtagttcac ttccccggtc gggccgcagg cgatggtggt cagcagcccg
1681 ttttcagact taacggcttt ctcaccggta ttcatcagca tgaagcagcc ggtaccgtaa gtgtttttcg
1751 ccatcccttc cttcacgcac agctggccaa acagcgctgc ctgctggtca ccggcgatac cggagatagg
1821 aatacgtgtg ccgcctttac cgccaatgtt ggtctgaccg tagacttcag aagaacgacg cacttccggc
1891 agcatggcac gcggaacgtc cagcgcgtcc agcattttgt cgtcccagtc cagagtatgg atgttgaaca
1961 gcatggtacg tgaggcgttg gtgtaatccg tcacgtgtac gcgcccctgg gtcatttcc agataagcca
2031 ggtgtctacg gtaccgaaca gcagttcgcc gcgacgagcg cgctcacgcg agccttctac gtggtcgagg
2101 atccacttca ctttggtgcc agagaagtac gggtcaatga ccagtccggt gttgttgcgg acgtattctt
2171 ccatgccgtc gcgcttgagc ttctcgcaaa tatccgcagt acgacggcac tgccatacaa tggcgttata
2241 gataggtttg ccggtctcgc gttcccagac aatggtggtt tcacgctggt tggtaatccc gatcgctgca
2311 atttcatcgg aactgatatc ggctttcgcc agcacttcta ccagcgtgga gctttgggtc gcccaaattt
2381 ccattgggtc gtgttctacc caacctgctt tcggatagat ttgctcgaat tcgcgttgcg aaacgctaac
2451 gatgttcgca tcgtggtcca ttacgaccgc gcgggagctg gtggtgccct ggtcgagcgc aacgatatat
2521 tttttctcag tcatgatttt tttgtcccgt agtcacatta cagcgaagct ttttgttgag tgttggccgc
2591 agcgtctttc tcttcaatcg cgcagacatc gcacggtaaa tgacgaccaa tcagtttgcg atatgcccat
2661 gcgcccaaaa tcgcgccggt aatcgggcca aacactggta ccaggaagta agggatatcg cgaccacccg
2731 tgaaggcaat ctcaccccaa ccagccatcc aggcgaagag tttcggtcca aagtcacgtg ccggattcat
2801 cgcaaaaccg gtcagtgggc ccatggaagc accaataacg gcaatcaata agccgatcag cagtggtgcc
2871 agcggaccac gaggtacacc gttaccatcg tcggtcagcg ccaaaatcag ccccattaga atagcggtaa
2941 tgaccatttc aaccgcgaag gcctgcacaa aattgatatg cgggttcgga taggtggaga aagtgccagc
3011 cagacccagg ctctctgtac tgccgcgcac gatatggttg gtttgttcaa agtcgatgaa aagattgtaa
3081 taaagcccgt aaaccaatgc cgctgcgcaa aaggcgccgg caatttgcga aataataaaa ggaacaactt
3151 tgcgtttatc aaaacaggcg aacagccata gtgcgatggt taccgctgga ttcaggtgtg caccagaaac
3221 acctgccgtc agatagatag ccatcgctac ccccagaccc cagatgatac tgatttccca ctgaccaaaa
3291 gtagccccag ccactttgag tgcagcgaca catcccacac cgaagaaaat caacaacccg gtaccgagga
3361 attcagcaat gcactggcct ttcaaggttg atgtttgact cataatcgga tcctgaagag agattaatgt
3431 ttattgtgtg cgagaaggtc actgacatcc ccggagcccg gtaggcacac tgttaattta tcgttaacga
3501 gcaaaaacga gaaatatcga aattaaaatg tgtgtactgc atcaacaaaa tgagcgtttt cgcgccacaa
3571 cgaggtattt gttatacata attagtgtga gctgaatcat ttcattaacc aatatgttaa cactttggag
3641 ctataagggg tttgtcgcca ggacaaagat taaaagtgtt gcaaaccgca atctacgcgg gatgctgctg
3711 gacagcgatg gcgcggcttc atacaatcgg agctaagtag agaacgcgcg tttttattaa ggcgtcaccg
3781 gttatcggga cgaggatttt tatccatcaa cgccttgcaa ttcaggagag gtatgacgat gtcattagaa
3851 gtgtttgaga aactggaagc aaaagtacag caggcgattg ataccatcac gctgttgcag atggaaatcg
3921 aagagctgaa agaaaagaac aactcactgt cgcaggaagt tcagtctgca cagcagcagc gtgaagagct
3991 ggagcgtgag aacaacaacc tgaaagaaca gcagagcggc tggcaggatc gtctgcatgc gctcctgggt
4061 cgtatggaag aagtctaatc ctcgtcatat ttcacgttat ggctgcgtgc attcacccca gtcacatagt
4131 ttcctatgtt cctggggatt cattttcttg ccgccttgcc ctgacgcgaa atctatagag gaattgagta
4201 ccagcatgta ggccggataa ggcgcaagcc gtcatccggc aatatcatag ctttaccgcg atacaacgtt
4271 agtttcaggc attcaaaccc ccgtctacgt ccagaccagt gccggaaatc tgcccagccg ctgggcttgc
4341 tagaaacgtc actgccgctg caacatcctc cggtgtaccg taatgccctg tcgcaataag ctgtcgttgg
4411 gagtctgcct gttcgccatc tgctgggttc atatcactgt ccgttgggcc gggatggaca aggttgacgg
4481 taataccccg tgggccgaga tcacgagcca ggccacgggt tagcgagttg agcgctgatt tagtcatcgc
4551 gtagacagca atccccggct gggcgacacg gttggcaagg caactgccaa tattgataat tcgcccacct
4621 tcagggagat gcggcaacgc ggcctgtatg gcaaccacca cgccacggat attcacgtta atcaacgcat
4691 cgatgtcttc cagtgacaga gactccagcg ggccgccgcg tgcgatccct gcgttgttga ccagaatatc
4761 taatcctcct agtgactgta tcgtgtgatt tacggcattc tgaatagcct gagcgtttgc actgtttgcc
4831 tgaatagcct cgccatagcg gccgagtgct gtaatttcat tggcaacggc ctgggctttc tccgcagatt
4901 tttcataggt tataacaaca tcagcaccgg ctttcgccag cgacagtgca atagcgcgcc ctaatccacg
4971 actggctccg gtgaccagcg ctttttttacc tgtcagatcg atatgcatga tgaccccgtg acgagagtga
5041 tgagattcat cattaggtat agagagagtt ttttcttcgt caatgcgctg aatgggggaa tcgaaagggt
5111 gaagtggcaa aaaagaggat c
```

7.21 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK116

```
  1 gatcatgtcg ttaagccggg taggaaccat tgtttctacc tgggcactcc ctgtttttat cagcaaatac
 71 gggatcagtc atgtgatgct aatgggcgcc gggatatcac tgatcggcct gttggtttcc attgcctttg
141 cgccagaaac gcgggggctg actctggcac aaaccagtca aatgacgatt cgcagcaagc ctgtatccag
211 agtgagttat taggagtgtt ctgtattttc cctgttactc agtcagttag cctaagctta attggtattt
281 cactgaaaat gactgaaaag cagggagaac accatgcaaa aacatattct gatcacctcc atttttaccg
351 cagcagcact gttcaccgtt gccggttgtt cttcaaacca ggcggttaaa accaccgatg gtaaaaccat
421 tgttaccgat ggcaagccgc aggtggatga cgataccggt ctggtgtcgt ataagaatgc ggaaaccggt
491 aaaacggaac agattaaccg cgatcaggtt aaggacatga gtgagctgga caactaactc aatattttcc
561 attcatctac tcaataatat tgacttttag cctgctgatt aactgactaa actcactggt attacaataa
631 tgcagtaata gcaggctaat catgattctc atcatttatg cacatcccta tccgcagcac tcgcatgcga
701 ataagcggat gcttgagcag gcaaggacgc tggagggcgt agaagttcgt tcgctgtatg aactctatcc
771 cgacttcaat atcgatatcg ccgctgaaca ggatgcgctg gcgcgcgcga atcttatcgt ctggcaacac
841 cctatacagt ggtacagcac accgcctctc ctcaaactgt ggatggacaa agttctctct cacggctggg
```

```
 911 cgtatggtca tggtggcacc gcgctgcacg gtaaacatct gttgtgggcg gtcactaccg gcggcggtga
 981 aaatcatttt gatatcggct cccatccagg ttttgatgtg ctttcccaac ctttgcaagc cacggcatta
1051 tattgtggtt tcaaatggct gccgccattt gcgatgcact gtacgtttat ctgtgatgac gaaacgctgc
1121 aggcgcaggc acgtcattac aagcagcgtt taatggaatg gcaggaggca caccatggat agccatacgc
1191 tgatacaggc gctgatttat ctcggttcag cggcgctgat tgtgccgatt gcggtacggc tggggttagg
1261 gtcggtgctg ggatatctca ttgccgggtg catcatcggt ccgtggggct taagactggt gacggatgcc
1331 gaatctatcc tgcattttgc cgagatcagc gccacgatca gcgccatcgc accgttttgt gccagatcgg
1401 caccgacgct aggcccaacg aattcgatac gcttcacagc cgcatgctgg ttggtggctt cgttaatgac
1471 gcttagcacc ttgctaccca gcacctgccc accgttttca ccttcggttg gcggcatacg taccataatg
1541 tcatggctgc taccgaagtt ctgcaaaagc ggctctacga agcccgcttt ttccagcgca tcgcgcatca
1611 cgtccatttc cgccggtttt tccagcgtga tttcaatgac cgtaccaccg gtgaaatcga gaccccagtt
1681 aaatccacgt acgcccatta cgacaatagc cgcaatcagc aggaaaccag agatgccgaa agcccagtag
1751 tcccagcgca taaagtcgat gactttacgg ccgtggttca attgttcaac agtatattcc tgtgccactt
1821 cgcactcctc agattgacag ctttttgacg cgcttgccgc catacaacag gtttacgatg gcacgtgtcc
1891 cgacgatcgc ggtaaacatc gacgtcgcca cacctatacc ggtagtaatc gcgaaccctt taattgcccc
1961 ggtaccgact gcatacagga tc
```

7.22 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK201

```
   1 gatccagagg tcggacgacg ccgtttcgag gcggcggtcg agaccctgcg cgcagggaat cgcacgtggc
  71 acatccagat caacacgcag ctatccatga tcgacgcgat gcggaaggag ctcgccgcgt cgcctgtgcc
 141 ggttgtgttc gatcacttcg gtggtgccca ggcggcgctt ggtctcgaac agcgaggatt cgacgtgttg
 211 ctggacctcg ttcgaaccgg acgcgtctac gtcaaactct ccgcggcata cctcggctcg aaggctgcgc
 281 cagattacgc ggacctcgca ccactcgccg aggcattgat tcgtgccaac gtgcaccgcg tcctgtgggg
 351 aactgactgg cctcacccga gcacgtcgca agccgcaggc cggacgccgg ccgacatttc accactgcgg
 421 cagatcgacg atggacgcgt gttcaatcag ttcgcgctgt gggcgccgga tgccgccgat cgaaagacga
 491 ttctggtgga caatccgggc atgctttacg gatttccacg cttatgatgg ccgcggaacg atcagtgcga
 561 acgatccgcg ctgcatcatg tgtctggacg agggcgcagc cgtcaacccg cgtgagcgtg tggcagctgc
 631 tcaagcgggc tccgttgccg gacgagctca cgattcatgt gccagcgcca gatgatgacg aaggattcag
 701 ccgaattcgg tgcccgctct gtgagtggcg gccgacgccc tcgagccgtt ggtgctgtga cggcaccgaa
 771 tcgccggagc tattgttcca agggtgtggg accgtctgga acacgttttc caccggaggg cggtgtcctg
 841 ggtgcagcca ccaatggggc tggacctcat gccttcattg cgagggctgg tccctgcacg aagattggta
 911 cgagcacgat cactagtcag tgagggtgcg gcggggtgga gcgcgtatgc agtttgcggc ccgcaagccc
 981 tcctgcgcca acgagcagag ggctcagcag cggacccact ggactcgaca gcgtattgac cgcgacggtt
1051 gccgccgcca cgaagccgag ggcggccccc aacgccgtgc tcttcacagc ggctgattcg atccagccga
1121 gacgggcagc cagaagagcg gcgccagggc tcgcgagaag accacccagg aaaccgccgg cgaagagcgc
1191 cgtgcgaccg aaggccgcgc cgccgatgga ccctgcaagg ccgccggcac cgcctgcgaa gacgaggagc
1261 agaaacagtc gcatgcgggt tgaggatcaa aggccggctg atatcatcgc catcgacacc gcgccgacag
1331 gccatcgaca agacccgctc ggccacaata tgtctacaga ctttgtatca caaagttatg gccgccgtcc
1401 aacccatgac aggtaggacg gtgatcgagt gcccgaagtg cgcggcgccg tcgccggacg ctgcggccga
1471 gtgcccgcgc tgcgggatcg tgtttgcgaa gctcgcgcag cgtgtggctg cggacggccc ggatatcgtt
1541 ccaccgatcg ccgagacgcc gggtcaggtc gcccgcgatc cccgtcgcga cgtggctcgg ctcgcgcgag
1611 cggcgctgct cctcggcctg gttgtgtgga cctggcaatc cgcgcgcgtg cccatgggtg ttgctgtgaa
1681 ggatacggtg cttcacctgc ccaacctggt ctttcacgaa gcgggacacg tgctgttcgc cctcttcggg
1751 cggttcatga ccgtcctcgg cggcagcctc ttccaattcg gtctcccgct cgcgctcgcg ggcgcctttc
1821 tgaaacagcg agatcagttc ggtgccgcgg tgtgcacttg gtgggcggga cagaacctgc tggacgttgc
1891 cccctacatc gcagatgctc gagcgttgca gctcgtcctc ctcggcggga agacgggcgc ggaggtcgag
1961 ggacacgact gggaatacct gctgacgcag atgggctggc tgcgcttcga ccgcgacctc gggctctgga
2031 cgcaccggat gggtttgatg atgatgaccg gcgcgctgat ttggggcgca atctatcttg cgaaacaccg
2101 cgaagagccc ccggatc
```

7.23 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK202

```
   1 gatccggtcc tgagcctgta tcgcgggagc accgagatcg cgcgcaacga tgactgggaa ataagccgca
  71 gcagcgccgc gatcgccgcc acggcccagc gggtcggcgc ctttgcgctc aacccggcaa gtctggacgc
 141 cgccctgctc gtcacgctcg aacccggcgc ctataccgca atgatcaccg gcgtcgacgg cgccaccggc
 211 atcgcgttga tcgaggtgta cgatgcggat tgaggttggc cctcaactct gtggccttcg tagcagccga
 281 ggtaacgagg ctggccggag ccgaggcttg aaaacccagc cccggccgat ctccggcgcc gtcgaagaag
 351 gcgggccagc ctcgttacct cggctgctac acgcgttgaa aggaaggttc tgctcgcagg tgtgcggcag
 421 aatctcgaac catagccggt cgacatgcgt ttcctccttc cgattttcgc tctcgccggc gccgcccttg
 491 ccgccgtgcc gcccgagctc gatgccgcct tgaagacgtt tcgatccgat ccgccgccgg ggtggtcttt
 561 cacgcagacg accaccgcgg agggaaaatc gaccgtcgaa cgctgcgacg ccgcgcgccc ggatttctct
 631 cgctggaaac tgctgcaaaa agacggccgc gcgccgacga cggatgaact gcgtgaatac ggcgagggtc
 701 gttcacgccg ctcccggatg ggaaccgcgc ccaaactcgc cgaccaactc gacctgccga ccgttgaaac
 771 catcgagcag accgcggagc gcgcgaccta ccggtgccga ttgcgtccgg gtgagacgcg ggacaagacc
 841 gcaccccacc ttcgcgccac cattgtgctg caccgaccga cccggacgat cgagtcggtc gaactcgcca
 911 gcgtggcgga attcagcccc acgctgggcg taagaatcgc cgcgctcaaa acgtgcatga actactgcct
 981 ccccatcggc gaatcgccca gcctgcccca actggtcacg acccacgttc gcggccgcgc gttcctgttc
1051 aagtcactgg atgcggatat ggtcgtgacg ttttcggatt atgtgaacgt gcggaaaaag tagtggccgc
1121 tgaactgaag ttacttcggg cgcggtgcaa cgaacgatct cacgtctttc gttacgtcga gcacacaccc
1191 cggcgctgcg cgtccgcccc tcttgctaga ggggagtttg attgctgcgt cgaatcacaa ggcttcgttc
1261 ttgaaaatcc cctctagcaa gaggggtgcc catgtcctcg ccatattcgg gcgacttcat tcgaaagccc
1331 gcaaatgggc ggggtgtgtg ctcgttcgaa ttgctcgtgc tacgaaccct cactcgccgc cgctccattt
1401 gaacacgcac gcactgagcg gtggcagcgt caccacgatc gactggctga acccgtcgcg ctcgagatcc
```

```
1471 tcggtgctgc ggccgccatc gttgcccagg ccgctgccgc catagaattc gctgttggtg ttcaggactt
1541 cgcgccagaa accgcgtcgc ggcacgccaa tccgataatc gcgctgggcg ccgccgaaat ggcacaccac
1611 cgcgaagagc gtctgctccg tgtgatcgct ccgcagatac gcgatgagat tggcatccgc atcatggcac
1681 gtcagccagc ggaagccctg cgcgttgaaa tcattttggc tcagcaccgg ctcggtcgtg tacagcttgt
1751 tcagatcacg caccagcaac cggacgccct cgtgatccat gtactgggaa agatgccagt cgaggctgcg
1821 atcgtgcgcc cactcgttcg actgcgcgaa ctcgccgccc atgaagagca gctttttgcc cggccacatc
1891 caggtgtgcg cataaagtgc gcgcaggttc gcggctttct cggcgatatg ccatgcgccc atcttgaaga
1961 gcatcgacgc tttgccgtgc acgacttcgt cgtgggagaa caccgtgatg aaattctcgg cgtactggta
2031 aagcatgccg aacgtgagat cgttctggtg gtgacggcgg acgatcggct ccttcgtgaa atagcgcagc
2101 gtgtcgttca tccagcccat gttccacttg tagtcgaacc cgagcccgcc gtccttcgtc ggtttgctca
2171 cgccggcaaa cgaagtgctc tcctcggcga tcatcgcgac gccggggtaa taatggtgga cgaggtcgtt
2241 gacgcgccgg atgaagtcga tcgcctcgag attttcgcgg ccgccaaact tgttcgggat c
```

7.24 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK203

```
   1 gatcccaatc atttgatctg gatcgacatg gagatgagcg gcctgtaccc ggacaccgac cgcgtgctgg
  71 agatcgcgat cgtcgtcacc gactcgcaac tcgtcactgt ggccgaagcg ccggtgaaga tcgtgcatca
 141 gccggacgcg gtgctcgacc gcatggattc atggaacaaa tccacgcaca ggaaatccgg attgatcgac
 211 aaggtcaagg cggcgaagca gagcgaggtc gaagtggagg ccgaattaat cgccttcctt ctgcagtacc
 281 tgcccgagaa tacctctccg atgtgcggca actctatctg ccaggaccgc cgcttcctcg cgcggtacat
 351 gccgaagctc gaagccttct tccactatcg caacctggat gtttccacgc tcaaggaact ggcgaggcgc
 421 tggaagccgg ggatcatggt gggcctgacc aagcacggca agcacgaagc gctggccgac gtctacgagt
 491 ccatcgatga gttgaagtat taccgcgaga attttctcaa ccttcaataa ccgtgattcg tggcacgtga
 561 tacgtgtcac gtaccaccgc tttcctcact ccagcgttat ctccccgtcg aaatcgacat tcagcccgat
 631 tgcgggaaca ctgagcttca ttttgaccgg cagtagctcg ctgcccttca gttttcccga ggccagcgcc
 701 ttcgacaccg cctgctcgat ctcgcgctgc gagcccacgc cggccatttt cagaaacttg cggatgctca
 771 tgttgaaatt ctcgtcgttc atttgtcctc cttgtttccg agtacgtatt cgatcagccg cgcggtagag
 841 gcatcgtggc cgctgcgggc cttccccgct ttcaggtctt cgagcacgcc gctggcgagt tgcttgccca
 911 gttccacgcc ccactgatcg aaggaattga tgctccatat cgcgccttgc acgaacacct tgtgttcgta
 981 gagcgcaatc agcgccccca gcgagcgcgg gtccagatgc cgcatcacga tggtattgct gggacgattg
1051 ccgggaaaag tgcgatgcgg aatcaggcgt tcggcttcgt cgccgacgat gccgcgcgcc ttgagttcgg
1121 cgcggacctc gtcggcattt ttcccccgca gcagcgcctc gctttgggcg atgcaattgg cgagcaggat
1191 ttcctggtgt tccggcagcc ggtccgcgcc gtttgccgcg acgatgaaat cggccggcgt gacttgcgtg
1261 ccctggtgca ggtgctgaaa aaacgcgtgt tggccgttgg tgcccggtgc gccccagatc accgggccgg
1331 tggcgtattc gacctccgct cccgagcggt cgacgcgttt gccgttgctc tccatatcga gctgctgcag
1401 gaacgccgga aagtgagcga ggtcctgcgc atagggcagg actgcttggg atcggtggcc cagaaagttg
1471 atattccaga ttcccgtgag cgcggcgatc accggcatgc tgctttccag gggtgccgta cggaagtgct
1541 cgtccatgtc gtatgcgccg gcgagcagtt cgtcgaagcg gttgaagccg atccccaagg cgatcggcag
1611 gccgatggcc gaccacaggg aatagcggcc ccctacccaa tcccagaacc cgaacacacg gtccggagcg
1681 atgccgaatt tcgaggtcgc ttccaggttg ctggagaccg cggcgaaatg ctgttggact gccacctccg
1751 tggccccgga agggcgcagt aatgtaagca gccactcacg cgccgagcgt gcgttggtaa gggtctcctg
1821 cgtggtgaag gtcttcgatg agaccacgaa cagggtcgtt tcggggttca ggccggagag cgttgccgcc
1891 agatgggcgc catcgatgtt cgaaacgaaa tgcaccaaca ggtcgtgaga accatatggg cgcaacgccg
1961 agcaaaccat cagcgggccc agatccgagc cgccgatgcc gatattgacc acgtcggtga acggcaggcc
2031 gctgtagccc cgggcgatgc cgccccgcac ccgctccgaa aaatcccgca cgcgcgacaa caccgcgcga
2101 acctcgggca tcacgtcctt gccgtcgagc agcagcgggc ggccggagcg gttgcgcaat gccgtgtgca
2171 gcaccgcgcg tttctcggtg acgttgatgc gtttgccttc gaacatcgcc acaatctgcg ccggcaggct
2241 ggcctcctcg gccagcgtca tcagcaggcg gcgtgtctgc cgcgacagcg ggttcttgga gtagtcgagc
2311 agcagaccgc aggctgcaac cgagaactcc tgcgcgcgcg cgggatcatt cgtgaacagg tcggctatcc
2381 gcgcctcgcg catctcgaag gcatgggcct cgagcgcctt ccaggcggga cgttccttaa ggcggagcat
2451 tctagaagcc gtgacgcgtg acacgtgatg cgtgacgcgc aaggtcgcaa accatgggca tacctggatt
2521 ctataggacg gccatgggat tccgaacccg aaaaaaaaga aagggccccg ggatcgctcc cggggccctt
2591 caagggaatc tggtctagct taagcggctt ttttcttggt cgcggcggtg tggcccgtgg
```

7.25 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK204

```
   1 gatccgcggt atcacgacga cacgccggcc tggagtcccg acggcaagtg gatcgcgttc actcgccgtt
  71 ccgtcatcga tggaaaggac gccggcatct gggcgatcgc gccggaggct ggttcggtag tgcgcgggcc
 141 attcctaagt gcagtgaccg cggtcggacg acgctctctt gtgtacggat ggtcgcccga cggcgtgtgg
 211 ctggcgatgt cacgcggcag tgaccactac gaattcttca acgtgccgct cgagatctgc ccgatccccg
 281 gccccgcagg ctgcggcggc ggaaaccttg ccgacatgat cggagatgtg tatgggggtc gagagatcgc
 351 cgactggcga cgaccagcac cgcagttcgt cggcgttttc gtcgagaacc cgcgtggcgg cgttcagtcg
 421 atccaggtcg ccgaggctcc gacggtgcaa cggcgcgtcg tcgtgcgggg cgcgaacgag aatgtgctgc
 491 tccagcggcc gcgatggcgc cccgcgtccg acgagttcct ctatctggag acacagatcg cgactgggcc
 561 acggacgacc cgcctgaaga tcgcagacgc ccgtacgggc gcgcagcgtg aggcgttcgc ccgccaggtt
 631 cccgtgtggg ccgagtggac acccgcgggc gacgagatcg cctgggtcga aaccaatggc gtcgcggtcg
 701 ccgtgcggct cgtgcgccct gacgggagcg gagagcggtc gatctacggc accggcggag tacccgaggc
 771 tcaggtgatc acggtggatt tcggtacgct ccgtttctga tgacgacggt agacgtgcgt tacatggtcg
```

```
 841 acgacgtcga cgccgcggtc gcgttctaca cgacccacct cggcttcacg ctcaactcga gcgccgctcc
 911 ggcgttcgcc gacgtgaccc gcggcgatct gcgtctgctc ctgagcggcg cgtcgagctc ggcgggtcgc
 981 ccgatgccgg atgggcgccg accggcgtcc ggcggatgga atcggttcca gatcatcgtc gacgacatcg
1051 cgagcgaggt cgctcgcctg cgggacgccg gcgtgacgtt ccgcaacgac atcatcaaag gtccgggtgg
1121 ctcgcagatc cttgtggaag atccgtcggg caacgtcgtc gagctctttc aaccgcgcta gcccgctctg
1191 cagaaattcg ccaccgtcgc ggcgacatcg tcgcgcggca cgcggtgcag gcgcgcatcg ggtagcgacg
1261 cgagcatgcg cgcgccgtac tcgcgcatga tcgcgcgccg atcgagaagg accaccgcgc cgcgatcggt
1331 gcgcgtgcgg atgagccggc cgaagccctg acgcaggcgc agggccgcct gcggcacctg gaactccgcg
1401 aatggatc
```

7.26 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK205

```
   1 gatccggcaa aggtcgagtt cgtcgccgcg tttcccggct tctcgctgcc gctcgacatc atcgtcaacg
  71 acgacagcct gtggatcacc gacctcaagc cgctgcgctt cgtgaagttg gacttcgagg gcaatcgacg
 141 ctacacctgg ctcgtgcccc cggacctgcc tgatggctac ctcgaggtgc acgcgttctc ggtggattcg
 211 gccggcaacc tgtatggcgg cgacaaccag tacggccgga cgcagaagtt cgtgccgaag ccgggggcga
 281 atcccgcgca cctgattcgc gcgccgtggg tggcgcgctg acgcggtacg ttgtagacga acgcggctga
 351 tacgaatagg atgacgggcc tatgacgccc gtctccatta ccgtcaacgg caaggtgcgc aaggcccacg
 421 tcgagccgcg cacgctcctc gtgcatttcc tgcgcgaaca cctcaatctc accggcacgc acgttggctg
 491 cgacaccagc caatgcggcg cgtgcacggt gctcgtcgac ggccgcagcg cgaagtcctg cacgatattt
 561 gccgtgcagg ccgacggctc gtcggtgcag accatcgaag ggctcgcgcc ggaaggcgag ctccatccgc
 631 tccagaaagg tttctgggaa gagcacggcc tgcagtgcgg ctactgcacg cccggcatga tcatgtcggc
 701 ggtgaacttg ttgcaggaca acgcgtcgcc gagcgagcgc gagatccgcg agggcatctc cggcaacttc
 771 tgccgctgca ccggctacca gcacatcgtc aacgccatcc agcacgccgc caaaaacggc ggcgcgaagg
 841 cgaggtaagc catggcatcc cccgtgctgc ccaagctcgt tggcgagcgc gtcaagcgcc gcgaggaccc
 911 gcgcctgatc cagggacgcg gcacttacgt cgatgacctg aagatcaccg gcatgcgcca catggcgttc
 981 aagcgcagcg acattgccca cggcaccatc acgaagatcg acaccagcgc cgccgagaag atggacggcg
1051 tcgaagccgt cttcaccggc gccgacattg ccaagatcct cgcgccgatg cccattggca cgccgttccc
1121 gtcgccgccg catttcgccg tggcggtcga tacggttcgc tacgccgggg agccggtcgc ggtcgtgatc
1191 gccgccgatc gttatgtggc gcgggacgcc gccgacgcga tcgtcgtcac ctacaatccg ctgcccgccg
1261 tcgtcgacgt cgaagcggcg atgaccggca agccgacggt gattcacaag gatttcccga acaacctcgc
1331 ggtcgcgctc gtgccgagcg gcaccggcgt ggccccggac ttctcggtga tcgacaacac ggcggtcgac
1401 aaggcattcg ccgacgccga agtgacgatc agccagcgca tggtcaacca gcgcctcgtg cccaacgcga
1471 tggagccgcg cggcgtgctc gcgcattggg agcccggcaa ggacacgatg accatctggt cgtcgacgca
1541 gaacccccac atcctcaaga cgatgatcgc ggcgatgaac ggcctgggcc agcaccaggt gcgcgccatc
1611 gctcccgaag tcggcggcgg cttcggcgcc aagatcaaca tctacgccga ggagtacgtc gcgtcggtcg
1681 tgtcgaagaa gctgggcatg ccgatcaagt ggatcgagga tcgatcggag gcgtttgtcg cgacgacgca
1751 cgggcgcgac atccttggtt acatcgatct cgcagcgaag cgcgacggca cggtgctcgg cctcaagatg
1821 cggctgatcg ccgacatcgg cgcctacaac atgctgctga ccgccgccat cccgacgctg acgatgctga
1891 tggcgaacgg cacctacaag atcccggcga ttcgcaccac gctgaccgag gtcttcacca acaagacgcc
1961 gaccgacgcg tatcgcggcg ccggccggcc ggaggccacc tacttcgtcg agcgtgccat ggacatgctc
2031 gcggccgagc tgaagatgga tc
```

7.27 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK206

```
   1 gatcctgcct cgggtgcctt ggcgggcgtg ggcttgtcgc cggacggctt gccttgcggc gtgccctgcg
  71 ggcggggctc gcccggatcg tcgatgtgca tgccgccggg cggcacgttg atctcgagtc cctggagctg
 141 cacgcggcgg agccgaagcg gccggaagat cagcccgaag acgctggcct cggccgagaa ggacgcgacc
 211 ttcacgagcg gcgggacgtc ggtgcggtgc ttgtggcgaa ggacgagtcc cgtgcccgtc agcctcggcg
 281 gcagcaccga cactgacagc gtggcgacct cgacctggct ctcgaaccgc tccccgaccg cgtcgagcag
 351 gcgctgtttg accgccggcg cgagcgcgat cggcagcgac aggatgacga tgaggatcgc gccggcgacg
 421 agcgcggctt gcgtcacccg gcgtcgattg aagggcacgc ccccctccca cgcaacttcc ttgccgtggc
 491 tcggaggccc gcagccggct cacctcggca cctggtcacc cacagtgagc gttcgccgtt acatcgccgc
 561 gagccgctcg gggcgggcag gactgaggcg gcacgagcgg ccgacttccg ccgtccttca aagggagggg
 631 ccggcttcag ccggcccacg aagggcgggc tcaagcccgc ccctccctca aaagttcagc cagaacgtgg
 701 ccgccgccgc gtggacgacg gcgagcagga tcaggagcag caggcgctta cctccggcag gcgtattgat
 771 cagcaaccag gcgtacagcg ggaactgcgc ggtgatcaag agcaggccag ccgtttcccg ctcgccgctc
 841 atgctcacgg ccgtgccgta cggaaagaac agggtcattg gcgtcatgca gcggcacgcg ccgccggcca
 911 tcccgccaat cacgaacagc acgattgtca ggccgaatcc gatcgcgatg gcggcgaggc tccggcgcat
 981 gccctacgac gtctgtgcgg ccgtctcggc gcgcgcgagc agcagcgcgc gttcgcgcgc gttccgggtg
1051 agtgaggctg cccgctcgaa ctcggttcgc gcctcggcgt gacggccgag cttcgcgagc aggtcgcccc
1121 gcaccgacgg cagcaggtga tactccgcca gcgccggctc cagtcgcagg gcgtccacga gcacgaggcc
1191 ggcggccgga ccctcggcaa acgcgacggc cacggcgcgg ttgagatcga cgaccgggga gcgcgtcagg
1261 tgcaagagct cggtatagag cgccacgatg cgccgccagt cggtgcgccc cggttcgagc gcgcgcgcgt
1331 gacacgcggc gatcgccgcc tgcagcgtgt agggtccgcg cgcgccgccg agcgcttcgg cgcgctggag
1401 cgccgccagc ccgcggccaa tcaggaggcg atcccaaagc gcgcgattct ggtcgaggag aaccaccggc
1471 tcgcccgtcg gccccacacg cgcgcgcgtc cgcgacgcct ggatctccat cagcgcgacg aggccatgca
1541 cttccggctc gtccggggcg aggcctgcga gcacccggcc caggcggagc gcatcctcgc agagcgacgg
1611 gcggatcaga tcgtccccgg cggtcgccgt gtacccctcg ttgaagatga gatagatgac ctcgagcacc
1681 gacgccaggc gttccacccg ttcggaaccg cgcggcactt cgaacggcac gcgcttctcg gccaacgtcc
1751 gcttggcgcg cacgatccgc tgcgcgatcg tcggctcggc gacgaggaac gcacgcgcga tctcctcggt
1821 cgtgagcccg ccgagcagcc ggagcgtgag cgcgagccgc gcttcggtcg agagcacggg atggcacgcc
1891 gtgaagatga gacgcagcag atcgtcgcca acgtcgtcgt ccatagccgc gtccagatcg ggggcttcgc
1961 gttcctgccc ggtttcgatg gcgtagccga gctcctcgtg cttgcggtcg aggagcttgc tgcggcggaa
```

```
2031 gtgatcgatc gcgcggcgct tggcggccgc cgtcagccag gcgccgggat tgcgcggaat gccggacgcg
2101 ggccattgct ccagcgcggc gacgagcgcg tcctgggcca gatcttcagc gagcccgacg tcgcgcacca
2171 ttcgcgcgac ggtcgcgatg acgcggggcg actcgatccg ccagaccgcc tcgatatcgg gatgaggatc
2241 ggcagctgtc acagctgccg atcacatcat cgcgaggttc cggcgcgcaa cctccggccg ggtcaggact
2311 tcctggtgag ctcgtccgcg gagccgtgcg tgctgttcga ccgccgggct ctgcccgaag ttttcgagct
2381 cgaagacctg gcggatctcc gcatctcgcc ctcttcgaag ggcacccgct tcgcccactc gatcgcctcg
2451 gccttgcgac ttcacttgaa agagacccaa gccgccaccg aggaatttgg cctcagcaga acggaccgtc
2521 actgacggcg gggcggacct tggagaaccg gacgcgcgcg cccttcgagc tcgcctgcag tccttcccca
2591 gccagcatca cgccggcctt caccatttct tcgttgtact tgcccatgtc ggccagcatt ttctacgtcg
2661 ggcagaatac cggcttcgga cttcttgtcg gacttgacga tcatcatgaa tcgcacgtca tgcctccttc
2731 ggttgttggg ctggggccgg aagcgacccg ggtgacccgc tctctactga agcgtcgaat ggggggcggc
2801 gggatcgaca aggctctgaa cccgaacctc gtgagccccg atattaggat c
```

7.28 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK207

```
   1 gatccgatcg agggctggga gtacatcgac gacctgcctg ccacagagta ttcgaccggc aaggtggtca
  71 ggctccccccg gcacatctcg aactatgaca tcgaaacgtc ggacttcacg gtcacgtaca ggattccgta
 141 ccggtggtcg aacttctcgt atgtgacccc ggttgacccc gccgaagact cgacgattgt gatgccggaa
 211 ggggcagagg atctaccccc cgcctatgca gctgcctggc tgttgtcggc cagggagatt tcccgtgggg
 281 agatcgaccg ggttaccgaa tggcaggtca gtgaacccac gaggggcggc atctctcagg ggctggtccg
 351 tgccaagtgg caggagttct accgggcttt ggacgaggtg cgcagggtgg acccgccccc tgctcgtagg
 421 cagtacctgc gtaaaccgtg gcgaggcttc cattccgccc gccgttgggg gtagggacgt atgagtttcc
 491 accctcgctt ctaccagtct ctcactgcgg ccgagttggc tgctcagaac cctgtggttc ctgccggtga
 561 gatcttcatc gctcgggata ccggtgttgc caagcgtggg catggcaact ggaacaccct gatgccgtgg
 631 tcttccggcc agaccaacta cctgcacacc ctggctgacc agtcgtcttc ggacggcacg aacctggcca
 701 acgtcgaagg gttgacgttc cccatcatcg ctgccggcgt ctatgtcgca gagttcaccc tgttccacct
 771 ggctgcagcc acgactaccg ggctggtgct gtcgttcaac gggccgacca ctccgaccat ctcgaagatg
 841 acggcgattc tgccgcagac agccacaacg gttgccttcg ctacgaccga aacctacgag acggtggtga
 911 cttctgcagc caccatctcg acgactgtcc cccaggtctc tctcgttcag gcttacgtgg tgaacggtac
 981 gacggctggc acctttgctc tccggttccg cacggaggtc aacgcttcgg ctgtgacgat tcagcggggc
1051 tcgtggggta aggtcgtcag ggtcggctga tgccggcttc ctaccagaac ttccagggtg ggctggttga
1121 agacgcaccg ttgacaaacg tggctgtcgt cttgacgtca gccgctctgg ccgatctggc tgctgttgtc
1191 gcccccgatt tcaaacggct ggtgctcgac cctgatggag tcgacgggga cccggagatc gtccacgtca
1261 cagcccaccc ggctctgggc acgacggcca cggtgtctcg tgggcaggag ggcacgtcgg cacgacagca
1331 cctggctgac acccccttgga ttcatgccgc tacgaaggct gatctggacg acctgccgca tgtagtcatg
1401 acgactacag gcgacacgat gtatgcgtcg gctgctggca cgacagcccg tctgcctgtc ggctctgccg
1471 atcaggtgat gacggttgcc tctggtattc ctgcctggca gacgttgggg aacgttgcga atgtcaccac
1541 gaagggtgac atgctggctg cgatcagctc cggcaacctg tctcgggtgg ctgtcggcac agacggccaa
1611 agcctggttg catcttcggc tgcttcaacc ggggtggcat ggggtagcgc cggtgatccg ggagacatca
1681 agtccggcat ctgggctgct gcccctaccg gctggctgct gttcggccag acgtacctca gcggccaatc
1751 cacctatccg gccctgtggg ccgttctcgt ggcttcgggg ctgacgtcct ggatgtctgg cacaagcata
1821 gtcctgcctg atctggctga ccgtgtgctg atggacggcg gcactcttgg tgccaccggt ggggccaacg
1891 cagtcactct atccacggcg aacctgccgg cccacgacca cagcatcgac cacaaccacg ggtcagtgac
1961 gtctgccggc aactcggtca accacactca cacgttctcg gacacgacgg gtggcaccgg cgagcacaac
2031 cacaacgctt ggttcgtgga tgtgactggc ggtggggctg ctagccgtgc ggctcctgcg tcgaccggtt
2101 cgggaaccaa cgctcagatc acgattgctg gcggcgggga ccacacccac acggtgtcgg gcacaaccgg
2171 tggggattcg gtggctcaca cccacgctgt ggacctgccg aactttgctg gtacgtcagg gtcggtcggt
2241 tccggcacgg ccgtcaccac acaccccggc tcacctcaga atcaactacg caatcaagta ctaagtcaga
2311 gcgttgatcc tggctgccag cagggcagac cctgcggtag acaggtgtaa gccatctgag ctgagcagcg
2381 cagggttctt gctcacctcg tagaacatgt tgatcggaga gtaccgctga tgcgggacgg aagcgaatac
2451 ctgtgcagtg atgactgcac gtcgatatgc ctgagcggtg gctgcaggaa actgtctcga agcattgtga
2521 acccagatga tggtacggtc gtctggcacc atggagacga tctgttgggt gaagatcctc cactgagcgt
2591 ctgaggtttc caccccgttc ctgtctgcca ccccaccgtc ttgcactagg acgaaccctc cgggtgctga
2661 cacggtgagc atccatctga tttcggtgac ggtggaggct cggaggtcgc agccggtggt gaacggcgca
2731 cggcacggct cggcaacgat gaacctgtcc aggctgtcga tcaggggtag ggccactttg aggatggagt
2801 ctccggagcc tacgagtcgg aacggggctg tgccttgcag gctcttccac agttcggggg attcaggtgc
2871 cgggtccagg ttgttgacgg ccagggtgaa cccgtcgagc cagaggaaac tgagcaggct ggctgcaagg
2941 aaagtgtaga actttctcat actggtactg taccactccc tgtcaagggg gttacggcgt ggcctatccc
3011 cccaagccgg cgatgtttct ccctcaggaa ccaccacccg gagtcgagaa gagactgatc tcgttctggc
3081 aggaccggcc ccggattact ccccggctgc agcttatcca caccaacggt gcctccaggg aatccaacgt
3151 ggattcctcc tacaactggg ctaaccagcc tggctccaac catacgatcc cccacatcca gttcgaccgg
3221 gacggtcgag cgatgatgat gctgccttcc gatcggaagg ggatagccaa ctaccgggct gccgacttct
3291 ctctcgggtt cgagacggca gacaccggct acctcgctga ccccaccatc tccgagttca cgcagccaca
3361 gatggagaag atcgctacag cctgtaccta ctactcgtgg ggttacgggt tcccgctcga atacccaacc
3431 gaatgggatg ggtcgggcac tgcctgccac acggaaccgt tcgcctaccc ctattggacg agttcggtcg
3501 ggaagatctg ccccggcttg aagaagaagg ctcaagtcaa gagctggatc
```

7.29 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK208

```
   1 gatccggagg acggtgagga ccgtgttgta ggcgagctgg ataccctggt tcgccagggt cgcttgaacc
  71 tcagccgcgg ttgacgggcc ggagtcccag agcacggcca ttaggtcgag ttcccgatca gtaaaggcca
 141 aaactcactt tcctcaacta agagattagt tgacaatacg ccccgggaat cggtctgtca actaatgctt
 211 taggtgaaaa agggtcaatc agcgggattt gggcgcagaa ttgaagctct tggcgatgat cacccagcgg
 281 ccattctctt tgagcagcgt catgtagtcc accaggaacg ccgacgggta gtcgagctcg atccgcccta
```

```
 351 tggccgtcgt accggttatt tgagtattgg tgatagtttg cggagggctt cgtgagcagc cggcttgccg
 421 ggtgcccttg cgatgtactt cgctgatcgg ggtgatcacg atcttcccgt cccggacgag ttgacctctg
 491 cagtgttggg gagctaagga gaatctacta agcggggatc gggggcctgt tgacaagaaa agagggctgg
 561 tatatactga accatatggt tcagtattca ccgaagctcg actctgcctt tggcgccctc gccgacccga
 631 cacgccgggg tattctcgaa cgcctcggca gatccgacgc cggcataagt gagctcgccg aggctttcga
 701 tatcaccctg acgggcatca agaagcacgt cggagtactc gaagcagcgg gcttggtgac taccgagaaa
 771 gtcggacgcg tacgccgctg caggctgggc ccgcgccgac tggatgacga gaccgcatgg atcgcaacgt
 841 atcggcggat gctcgacggc cgcctcaacc ggctcgggga attcctcgag cgtaccaggg agacacaatg
 911 acgaccacta cggagcatga acccactgtg aaagcaacaa ttacgacgcc gacggatcga gagatccaca
 981 tcgagcgcat cttcaatgcg ccgcgcgacc aggtctggaa agcgatgacc gatcccacgc tcatcgccca
1051 gtggtggggc cggggcaaca agctcgtgat cgagaagttc gagctcgagc gcggtggtca ctggagattc
1121 gtcgagcacg gtccggaggg cgtacacggc ttcgagggac gctttcgcga ggtcacgccg ccggagcggg
1191 tggttcaaac gttcgaatgg gacggaatgc ccggttatgt gataattgaa accggagtgc tcgaggacct
1261 tggcgacggt cgcacgaaat tcgtcaacac atcgctattc cacaccaccg acgagcggga cggattcctt
1331 caatcgggga tggagggcgg gctcaacgag agctacgcgg cactggatcg tctgctcgcc aagctcggct
1401 agcttcgatc cgctggatca gttgcattgc tggacgtacc cgcggccaca tgggccgcgg gtacgcccga
1471 ctgcgctaga ctacaggatt cccccgctgc gcacgcggaa gtcgacgttg tccgagatcc acttccagag
1541 ctcggtctga tcttccggtg cctcaccggc gcgatagtgc ttgcgccagg tggccatgac ctcgtcgtcg
1611 accgtccaca tccggacgcg acggcgggga actcgcttct cccagtgcac agctaccgtg ggccgcggat
1681 acagaatccg aatcgtggtg ttcttcgaga ggtactcgag accgctgacg ttgatcttct tgtacttgct
1751 caggctgtcg ttcttctccg acggcgtgtc cggcagcccg tccgtgagca tcacgatgtt gagcggagac
1821 agtaccagat tctgccgctt gacgagcgta ccgacgcgct cgaaaaacgg gttgaagtcg gtgagcccgt
1891 cattcgacgg atactccttc ctcagaaacg ccgctatctg cgggacgctc atgttctgga aggtgtggat
1961 cggctggaac gacttcgtct ctcccggctt ctctccaccg aaggagccga cgaatacggc ggtcggctgc
2031 ttcagtccac caagtccgtg aaggtgggcg tataggtagt tcgccgtgaa gtcgatcgcg ctctcatagc
2101 ggcccttgcc ctgaaacgat ccactgacgt cgataccgat gaccagcgtc gatctggcga cccgcgcgcc
2171 atccgcgggt ggcgcgcacg cgacgaccac actcagtgcg agtgccgcga gcgcgtgccc agccatgact
2241 ctgcgagggt tcctcattat gctaccctcg ttctgggatc gtgcggggtg agctttctcg cgccggagtc
2311 caacgacggg cgggcatgcg ccaatggcgt cgcagcgaga atttcctcga gcgacttgaa cggcagtgag
2381 aacattggtc gtgacttgat ggtgacgact gcgaagttga tcgcggcccg cgaggagctg gagcaccggg
2451 gagcgaaagc agctcgaaca tgcgctttgc ttcctcgtgg aaccacgcag tctccgcctt gagggcattg
2521 accggttcgc gccagagtcc tggctcgatc gctctctcga tgggccgagc cgcaccttca tgctggacag
2591 cttgacgcga cagaaccgcc aataacgctg gagttccgaa acgtccgaac aggaaccacg acattccgcg
2661 tacgcccagc catccaaacg atgccagagc gagggtagca ccaattccga ggtgcactga gccgcccgac
2731 tgctgggcga tccacggtgt gatggcgtcg atcagctcgc gatagaggaa gatcacctcg aagaacatca
2801 ccgcgctttc gacgacgagc atctgtacga tcgtgccgac cttcttttcc ttgatcgctt ctgtaacgac
2871 ctgtacgcag gcaaagcttc cggccaccag catgaacagg aacatccaca ggagcggggc catcacacgc
2941 gggttcggat cgaacccggt gagactgccg aacacttcat tgagtgtagg ctgcagcgtg aaggtgaaga
3011 ctgtcgcctc gatcgcgcac cagacggtca gcaccaggaa tgcgacccat ggcacaccgg gctggaagta
3081 acgttgcgat gaccagttga gcagcgtgaa tggcgagcgc aggatgccaa ggagaatgtt cttgaccatc
3151 aggaaggcga agcgcaccga accgattacc cagccgacga gcgcgacgcc gacgcgtagc attcccgtcc
3221 agaagagcca aatgcagcgg ccggcatccc accatgccat gagcatcgat gtgatgaagg cgccgcgtcc
3291 tgaccggaag ggaagcgtgt atatggaagc gaccgtgcac cacatgccgg ccgcgagcag aagggcaggc
3361 atcagcagtg tgacccatgc cagcacgcga gcggcggagc ttccgcctgt cgccgctatg ctgatcgtcg
3431 actgccaagc cgccagccag cgcattggcg ccagcaatgt gagcactgca ccctgccaat cggcggggga
3501 ataagagcgc aaatgattcg aacatgatca tcgacctcgg atgtgtagcg ttcgcgctgg gggcgcccga
3571 tggttcgaga ttgctgggcg acgggagaac cggcgcgtac tgttgctccg agtttgacga acaacggctg
3641 agctgggata cgccgtttcg cccggtttgc gcccgggcac ccgaacagcg ggcgaattaa cccttcccga
3711 ccgcccagag cggttgatgg cttccgccat gggagtgatt gcgctggtat acgccatgta ccaggcgtgg
3781 caacttgatc attggccaat aagaagtttc tgagcgtggc cggaagggcg gcgcgtgaca cttcacggga
3851 actgggttcc gaagagacgt ccgactccgg ccgacacggc catggcgaga gctccccaga aagcgacgcg
3921 cacggcgccc cgtccgatgg ccgcaccgcc tactcgcgcc gcgaccgcac ccagcacagt caacagaacc
3991 agcgcgctgg cggtgacgag tcgagtgagc cacgccgtcg gcgcaatcgc cgccactgct acgggtagcg
4061 tcgcgccaac tgcgaaggcg gcggccgacg cgagtgccgc ttggatcgga cgcgcagacg tcgcggggga
4131 aaggccgagt tcatcgcgcg aatgtgcgcc aagcgcgtcc cgctccatga gctgatcggc gacctgtcgg
4201 gcgagagcgg gcgtgagccc ccggtcaatg tagatgccga ccaattcatc tttctcggcg tccggtgtcg
4271 ttgcaagctc gtggcgctca cgggccaggt ccgccgactc cgtatccgcc tgtgagctga cggacacata
4341 ttcgcccgcc gccatcgaca tcgcgcctgc gactagcccg gcgacggcgg caatgaggac cgccgggcgt
4411 ccagtgccgg aagccgcgac gccgacgact aggcttgccg ttgagatgag tccatcattg gcgccgagca
4481 cggcggcgcg aagccagccg atatgcgccg tgcgatgtct ttcgaaatgg cgcacctaag ctccgaacga
4551 acgggtcgac tttctagatc gtgccgccta acgccttagt tcagctgcaa gcacagtaca accattgcgg
4621 cgaagccgca tccgaatagt gcttgtctgc tgcaacgttc gttagatggc cggcgggacg gaatctgcaa
4691 ccgctcggag catgtcaagt attgcagtat acattcgggc atgttgctct tttgccgaga tccgagcgcg
4761 gtgatcgcct ggctggaatc cgtaccagcc aaactgagaa tggttgccgc cttcgatccg tatccaacgc
4831 gtcgcctggg ggagcagtcg tcggttggct tccgactttc gttcagacgc gataccgtcg ttcgtgccta
4901 tgatcttagt gacccgcacc gtgagtgcgg caaggtcaac gtcccgtgga tgggtggtgc cgataagaac
4971 gagaccagcc agtgccgccg gatacgtcgc cgcaaagtcc gtggccgcca ccgcgccgcg cgaatgcccg
5041 gctacgaccc atcgaggcgg agctccaggc ttccgcatct gctccaatgc gcgaccgagc agggctggat
5111 cattcgcccc accgaacgcg ccccgccgcg gcaactcgac gatcgtgact ggaaagccag cggcggcgac
5181 cgcccgcgct aatggcgcgt atgcagtcgg gtccaccaat gatcgtggga aaaacaacaa tcccaccttc
5251 ggcacctgaa cggcacgcgg ggaggaaaac ttccagacgc cttcatggcg gacgttgacg acaagcgaat
5321 ccctgatcgt cgccaagtgt gcctcagcat ttgcgcgata ggcgaacagt gaccagctga cgaacacgag
5391 ggttaaggcg attcccgtcg tgatccagat tcgcctgatt agcacccatg tccggtgacc aatcatgggc
5461 gacacgttgg ttcacgggcc atctaacgcc atagttcagc tgcaagcaca ctatcaccat tgcggcgaag
5531 ccgcatccga aaagtgcttg ggatc
```

7.30 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK209

```
   1 gatcgctggg taggtcgagg cgcacgtcac gaacgcaacc gacgagcgcg tactgggacg gcgggttcag
  71 cgttctgaac ttcttcggct acatggaagg ctactacaat ccgccgcgcc gctactggct gacgctgcgt
 141 taccgatccg actgaacatg ggtgcgaatc gtgcgccgcc gcagcttttg cgggcccggt gcttgcctcg
 211 cgcccccggc gcctgattaa gtagcccggt ctttcacagc cgcgggggcc ctgagccccc gcgacgtcgt
 281 ttatgtcgac acggagactt gtcgcgtcca tggacccgct gcccaaggcc ctcgccaacc gcgccgctgc
 351 gctcactcac ctcgagcggc tcgaggcgga gagcatccag gtcatgcgcg aggtcgtcgc cgagtgtgaa
 421 cggcccgtca tgctctactc gatcggcaag gacagcgcgg tgatgctcga catcgcgctc aaggccttct
 491 acccggcgaa gccacccttc ccgctattgc acgtcgacac gaagtggaaa ttccgcgcga tgatcgagtt
 561 ccgcgaccgt atggcgcaaa agctcggtct cgatctgctg gtctacagca accccgatgg gctctcgcag
 631 ggcatcgggc cgttcacgca cggctccgcg atccacaccg acgtcatgaa gacgcaggcc ttgaagcagg
 701 cgctcgacaa gtacggcttc gacgccgcgt tcggcggcgc acgccgcgac gaggaaaaga gccgcgcgaa
 771 ggagcggatc ttctcgttcc gctcggcgca gcaccgctgg gatccgaaga accagcgccc cgagctctgg
 841 cggctctaca acgcgcgcaa gcacaagggc gagagcatcc gtgttttccc gatgtccaac tggaccgagc
 911 tcgacatctg gcagtacatc tatctgcacg acgtgcccat cgtgccgctg tatttctccg ccgtgcgccc
 981 ggtcgtcgcg cgcgacggca cgctgatcat ggtcgatgac gagcggatgc cgctcgcgcc cggcgagagg
1051 ctgctgatga aaaaggtgcg ttttcgcacg ctcggctgct acccgctcac gggcgcgatc gagagcgacg
1121 cggacacact gcctgccatc atccaggaga tgctgctcac caccagctcc gagcgacagg ggcgggtgat
1191 cgaccacgac caggcggcat cgatggagaa gaagaagcag gagggctact tctgatggcg cacgtctcgg
1261 agctgatcgg cactgacatc gaggcctatc tcgaggcgca cgagcacaag agcctgctca ggttcatcac
1331 ctgcggcagc gtggacgacg gcaagtcgac cctgatcggc cggctgctct acgactcgaa gatgatcttc
1401 gaggaccagc ttgctgcgct cgaggcggac tccaagaagg tcggtacgca gggcggggca ctcgacttcg
1471 cgctgctggt agacggactc gcggctgagc gcgagcaggg catcacgatc gacgtggcgt accggttctt
1541 ctcgaccgac aagcgcaagt tcatcgtcgc ggacacgccc ggccacgagc agtacacacg caacatggtc
1611 accggcgcct cgaccgccga cctcgccgtg atcctgatcg acgcgcgcaa gggcgtgctg acgcagaccc
1681 gccggcacag ctacatcgtc tcactgctcg gcatccggca cgttgtgctg gccgtcaaca agatggatct
1751 cgtcgactgc tcgcgcgaga tcttcgacac catcgtcgcc gagtaccgtg acttcgctcg gcagatcaag
1821 cttccggagg tcgtcgcgat ccccgtgtcg gggctgcgcg gcgacaacat caaggacccg agcaccgcga
1891 tgccgtggta tcacgggccg acgctgatgg ggcatctcga gtcggttgcg atcgaggacc acgtgacccg
1961 cgcgccgttc cggcttccgg tgcaatgggt caaccgtccg aacctggact tccggggttt tgcggggacg
2031 atcgtgagcg gggccgtgag tcccggcgac aaggtgcgtg tgctgccgtc ggcgcgcgag agccgcgtcg
2101 cgcgcgtggt ggccatgggc ggggacctga agcgcgcggt ggccggtcag tcggtcacga tcacgctcgc
2171 ggacgagatc gatgccagcc gcggcgacgt gttcgcgggg gtcgactcgc tgcccggggt cgccgaccag
2241 ttcgagacca cgatcatctg gatgagcgac gagccaatgc ttcccggccg accgtactgg atcaagatcg
2311 gcacgcgcca ggcgaccgcg accatcacgg agcccaaata caaggtgaac gtcaacacgc tggagcacct
2381 ggccgcgaag acgctggctt tgaacgagat cggcgtctgc aacctgtcgc tcgaccagat gatcgcgttc
2451 gacccctacg aagagaatcg cgacaccggc gcgttcatcc tgatcgaccg gttgagcaac gcgacgatc
```

7.31 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK210

```
   1 gatcctccgc gagtgtgtcg agctcctgac gcgccgcgtc cgccacctcc ggggcgaccg ctccaaggtt
  71 ctccacgcgt ggcaaagcag gaccagcggc gcggagcagg aaaaaccacg caagcgcggc gagcacgagc
 141 gctccagatg cgatcgctga tatcgatcga gtggcgttgc ggcgggatcg ggacacaagc ggacagggac
 211 tagggagtca ggggactggg ggactggggc actgggggac tgggggggact gggggactg gggaacagag
 281 gacttggaag actcggaagt ccccatgtcc ccgagtcccc atgtccccga gtccccatgt ccccgagtcc
 351 ccatgtcccc cagtccccga gtcccccagt ccccgagtcc cttagtcctc cagtccctac aaagttacca
 421 atcgaacttc atcccgacgc gcccgagccg cggcgcgacg atcgtcaccg gcagcaggaa cgtcgagccc
 491 gaactccacg tgatgttcga agccgggttg gcgttcgtga gattgtatcc gtccgcgaac agcgagaccg
 561 actgaccctt cgctaccttg aacaccttct cgacacgcgc gtccgccagg atgatgttgt cctgccggcg
 631 agagctgatc ggctcggtca agatgcgttg cgagccgtaa ttgatcccgt tgacggccgc cgcagaaatc
 701 gtgcggccgt acggctgacc cgcctgcatg cgtatcgccg gcgtgatctc tatgttccac ggcgctcgat
 771 aggtgccgtg caccttcgct ccccaaccgg tgaaattgta gcggccgttg tctgtgttga ttgtgtcgtt
 841 cgggttcgcc acatcctgcc gcacgcgcag gttctgaccg aagtagccgt tcgcgttgtc gcggttccag
 911 cggtacccga gaccacccgc cagcgaccac ttgccggtcg agcgcttgct ggcgctgaac tcgaacgtgt
 981 agaaatcgtc gtggcctgcc gtattgtgca agccgttgag aacaggcagt gtgagattcg ccggattcag
1051 attgaacccc ggaatcgatg cgccgtcgtc ggcgttgccg aggacgccat cgggcccggg atc
```

7.32 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK211

```
   1 gatctgggcg tgacctatcc cgttgcgctg gacaatgact tcaaggtctg gcgcgccttc aacaaccagt
  71 attggccggc gcattacttc atcgatgccc agggccgcat ccgccatcac catttcggcg aaggcgaata
 141 tgaccgctcc gaacgcgtga tccagcaatt gctggcggaa gccgggcggc gcgatgtgcc cgccggcacg
 211 gtcgatccga aggcgcaggg agcgcaagcc gccgccaacc ttggcgcggt gcgctcgccc gagacctata
 281 ccggctatag ccgcggcgcc aatttcgccg ccacgccctt tccggtgaaa tttgaccagc cggcggatta
 351 ccggacagcg acaacattgg cgctcaacca atggggattg aacggccgct ggaccgtcgg tccggagaaa
 421 tccagcctgg agcgcgccgg cggccggatc gtcttccgct tccatgcccg cgacctgcac ctggtgctgg
 491 cgccggggcc cggcggcaag ccggtgcgct tccgggtaac attggacggc cggccgcccg gcccggacca
 561 tggcatggac gccgacgtga atggcctggg caccgtcacc accgaacgcc tctaccagct ggtccgccag
 631 aaaggggcgc tggccgaccg gagcttcgag atcgaatttc tcgacccggg cgcccaaagc tttgccttca
 701 ccttcggctg agccggaccg gtccatccgg tggccgtaca ggccatctgg tcgcagtccc cagctttgga
 771 ggagtggggg ccttgccgcg cggggcacga aacccaatat tgcgagttaa cacatttgtg atgcccccca
 841 gtgcgtaacc taagggcgta accgtatttt tattgtaatt cagctatttc tggacccatg aaaaagcgcc
```

```
 911 tccctctgat tgccgccctt gccgccagcc ttgccgcggc cggctgcacc accaccgatc cccagtcgct
 981 ggcccagaac gacccgttcg agccgtccaa ccgggcgatt ttcaacttca gtatcgcggt cgacaaagcg
1051 gtcgcgcagc cggccgcgcg cttctatcgc gccgccgtgc ccgagcccgc gcgacagggt gttcacaacg
1121 cgctggaaaa tctgaatgcg cccgtggtgc tggtgaatga cgtgctgcag ggcgaaggcg aaaaggcggt
1191 caataccttt ggccgcttca tggtcaattc caccgtcggc ctggccggcc tgatcgacgt cgccaccgag
1261 ttcggcattc ccggccatgc caatgatttc ggcatcacgc tgggcaaggg cggggtgcat gaaggctcct
1331 acctggtgtt gccctttatc ggtcccaagc cgccgcgcga ccttctgggc aatacggtcg atatcgcctt
1401 cgaccccctc acctatatca cctggaacaa ctccaccctt tacatgatgg tccgcggtgg cctgaccgtg
1471 ctggacaagc gcgaagccac gctggaaacc gtggactcca tcgagcgcac ctcgatcgac ttctacgcca
1541 ccacccgcag cctctatcgc cagaaccgca atgcccagat tcgcggcgaa gcggcaaatg aggatcttcc
1611 aaacttctga acgagccacg ctggaaaaga aaagggcgcc tcaccgggcg cccttttgt ttgtcttgcc
1681 ggctgaggct attccgccgg agcggcgttg ggctcatggc cgaaagcgcc gccatagaaa cggtgccaga
1751 tgcggccgca ccagctgccg aagcgatcca gatacatgta gatcaccggc gtggtgtaga gggtcagcgc
1821 ctggctcacc accaggccgc ccacgatcga gacacccagc ggctggcgca gctcatagcc ctcgcccacc
1891 ccgatcgcca gcggcagcgc gcccaggatg gcgcccatgg tcgtcatcat gatgggacgg aagcgcagca
1961 ggcaggcgcg atagaccgcc tcgcgcggcg cgaggttttc cgcccgctgc agctggatgg cgaaatcgat
2031 catgatgatg gcgtttttct tgaccacgcc gatcagcaac atcaccccga taaaggcgat catgctgaac
2101 tcgatgcgga agagcagcag cgccagcagc gcccccacgc ccgcggacgg cagggttgag aggatggtga
2171 gcggatggat gtagctctca tagagcatgc ccagcacgat atagatgatc accaccgccg ccaggatcag
2241 ccagggcagt gacgccatgg actgctgggc cagcccggcc gtgccgataa agccgccatg gaccgagatc
2311 gggacattga tctctgccat gacgcggttg atcgccgccg tcgactgacc gagcgtgacg ccttccggca
2381 cgctgtagga gaaggtggtg gagacgaacc cgtcctgatg ggcgatcgac agcggcgcaa tgcccggccc
2451 catgctgacg aaggccgaca gcggcaccat cttctcgacg cgggtggaga cagcggcgct ggtggagccg
2521 ccgccgcggc cgccggtcag cgaattctgc tgctggttgc gcaccgcttc cgccgcggcc tgcgaggcgg
2591 aaagatc
```

7.33 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK212

```
   1 gatcccgata ccggacgtat cttctgggtc aagttcaacc agggttcggc gcccgcgccg aaccgggaag
  71 tggccttctc ggacgatggt ggatcgacct ggactgtcgc gtcagcgtgt tgcctcgaag cggaaaactc
 141 acggttgatt accgccgctc cgacacctgg gggaccgcaa ccggtcggct atcccaacgt ggtctatctt
 211 tgctctaaca cgtcgctgct cggtggcgtc gggttccccg gcggcggccg agtgtgctct cgatcactcg
 281 acggcgggat cacgtacacg atcgtaagcc tgctgttctc gaagccgatc cccaagtacg aggagtgcct
 351 gccctacggg gaatattttg gagccagcga gggcgcgtat cccgaagccg ggcccaacgg atcgttgtac
 421 gtcatggtgc actgcggcat cggccatatc gttgcctcct acctcgcgcg cagcgacgac gaaggcgtga
 491 cctggccgat tctgagggag attccgttcg gacaggagtt gcgcgtggat tccgacggga acctgtacat
 561 ggctcgcacg aacccggtga acgatgcgcc cttgctgcaa atttctcgcg atgaaggccg cacttggacc
 631 cactccgttg agatcacgcc gcccggcgtt gaagctcact cgcaccatcc cgagaacaac gcgttccaga
 701 ccacagtccg tgccgcctat tggcccgacg agttcacctc gtatcagtgg tacatgcagg tgttcgcccc
 771 gggcgtgatc gcgttcaact tctacggacg acaagcccct cgctcggagt gggatgggtg gatcagcatg
 841 agtcgcgatg cgctcgcatc cgagcccgtt tggtgggcgg catcaacaaa cccgccgtcg ctctctctta
 911 ccaacggggc attcgccggc gagtacagct acggaaacga gcacgtcggg ctcggtttcg ggtcagacgg
 981 aagcccgtgg gggagcttca ctgatggtgc aaccggatac gccggacgcc tgctgtggcc ttgatgtgcc
1051 tggactgatt catcatcgag cggcaaacgg ccgcgattcc atccagcatg agcacgatgc cctccagacg
1121 aggacggcgt cctgcgtcgg accgtaactg ccaccaatcg tcggtcccag gtccgaggtc agcggcgatt
1191 cgatgacaag tgaacgaagc gccgtgccga aagccatccc gtgctcggct gctctcgttg ccgtcaagac
1261 gagatcggca tgctgacacc agatgaacac gctcatgagt tctgaggtgc tgagcgttcg cggtggaacg
1331 gccgcggctt cccatgtcgt ccggcacgtg ctctggacga aggtctctgc atgcgaacgc atgtaccagg
1401 gaacccgaag cgatgtgtga gccagtgttc cgtcgaaggc ggccggatac gtttcgttcc tgacggcgtc
1471 gtgcgcatcg gagacgacgt acgtgaacgg ccggccgaga acggacgctt gtgcgaccca gcgtcgctgc
1541 gtgtccattg gtgcggcgaa cagaacaaca tcaacgccca acgaggcgaa atcgcgcacg gagtcggtga
1611 cctccgtcgg tgaggagccg tcgagatagg ccgcacgtag cacgttgatt cccatcgatc gcatacgcgc
1681 gactgcggcg tcggtggcaa atgccgatga gcggacgccg atgacgccga ccttgccggc gagcgttccg
1751 ctgtttttgc cccaccggcc gaggtcgctg aggctctcct cgagtccgcg ccggctggaa agcacttgcc
1821 cgcctccgcc caccggcgga gcatcgccgt cggcgtcaaa ggcgatc
```

7.34 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK213

```
   1 gatccagtcg gacgatagga cctggacgga caccaacaga gacaacatcg cgcaggaaac cgagatcggg
  71 ccgagcaaca acgcggcatt cgggctgccg ttcctatcgc gccggcctga tcctgacgga ctggatcgcg
 141 aatacgacat cgagaccagc ctcgctattc agcacgagct gatgcgtggc ctctcagtat ctggttcatg
 211 gttccggcgc tcgaggctca acgagctgcg caccgacaac cagttgatca gcttcgccga ctacttccca
 281 gtgaacgtgt acagcccgat cgatggtgag gagataacgg tttacaactt gaatcaagac aagcgtgccc
 351 gcttctccag atcgacacca actccacaga cggcgacaag cgttccagga tctacaacgg gctcgagttc
 421 gggatgaccg gtcgcctcca tggcgcgtcg ttcttcggcg gctggaccgt cgataacttg atcaatgtgg
 491 actgcgacac ggtcgacaat ccgaacaacc tgaggttctg cgaccagcgc aactacgata tgcccctgcg
 561 gcacgagttc aagctgtcgg ggtcgtacac actcccgtac gacattcaag tgaacgcggc tctccagagc
 631 tatgcgggtc cggttcgtgg aacgacctgg agcatcgcca cgacgacgcg ctacgctgcg gattgcctcg
 701 gcgcgtgcac ccccggcgcg ttcgtgattc cgaacctgct acccgccccg ggtggcggaa cgacactcag
 771 tgtggccttg gccgagccgg gatc
```

7.35 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK214

```
   1 aaaaaacact tacttccatc ggataatata ccaaatcctg tacaatgtac tcccatggca ttgtcgtatg
  71 ataatgttta aaggctgcag catcatctat ttttcttaat aaaatcccct gtccgcccac ttccggcttt
 141 acaatgaaag ggtaatttat tttatgttgc agtaactttt gctctagaat gaaaaaatcc tcctttggaa
 211 gtacataaaa tgtaggtgga taaaagccat gaggtaataa cgcatacatt tccttttag gttcaccttc
 281 cattccccca aaggttaatt ttggattact ggatgtaaaa aaccaaaccg caccggattt tccggtatac
 351 cataaccaaa aaaccgacaa cggagtgtaa atcaatttaa atggccaggc ttcccaatta gtaattttat
 421 taattattct atttgctata ttcatttgaa ccgcaaaaat aacatgaaaa aagtaacaat aaacactccc
 491 cctaaaacat caaacaatta gttacatttg ccttactgaa acataaatgt tatgcacgta ccaacaatgg
 561 cggaaatgat ggcgaagggc gaaagtcctg atgttttatt ttgggtaggt tgtgcaggaa gttatgacca
 631 gcgggctcaa aaaataacaa aggcatttgc aacaatcctt aataaagtag gcattaattt tgcaattttg
 701 ggtaacgagg aagcttgcac cggagatccg gcaagacgcg ctggtaacga atttatgttt caaatgatgg
 771 catatcagaa tattcaaata ttgaatggct acggcatcaa aaaaatcgtt acagcgtgcc cacattgtct
 841 taatacatta aaaaatgaat accccgaatt agggggaaat tatgaagtaa tacaccatgc tactttttta
 911 caacaattga tagacgaggg taaaataatc atgaaggaag ggggcacttt taaggggaag aaaattacgt
 981 atcatgatag ttgttactta gggagggcca acaatattta tgatgccccc cgtaaagtat tggaggcatt
1051 ggacatagaa ttggttgaaa tgaaacgttg taaatcgaat ggtttatgct gtggtgctgg aggtgcacaa
1121 atgtttaaag aagaggaaaa aggagtcacc cgtattaact ttgaaagaag caatgaagca atagccaccg
1191 gcgctggcat cattgcggca gcctgtcctt tttgtaatac catgctgtta gacggagtta aaaacagcaa
1261 taaagaagaa gccgtacagg tacttgatat agctgaatta atagcagtat ccatttaaaa tatttattat
1331 gaacctacaa ttccagcaac agctaccagc cgactttcac gattcatcaa gggtatggat ctaccagagc
1401 agccgtttat tctttataag cgaggcttta caaattgaag aaatacttga aaattttgtt ggagaatgga
1471 agagccatgg tgctgctgta aagggctatg ccaatatctt ttttggacag tttattgttt tgatggcaga
1541 cgaaacctcg ataggtgtgg gaggttgtag tacagacagt tctgtacggg tgatcaggga aatagaaaag
1611 ttaatgaacg tacaactttt tgaaaggcaa aacctggcat tttttgtaaa agaaaaaata cagttattac
1681 cgctgtctca atttacttac gctgtggaaa ataaatttat tgacgaggat accttgtatt tcaataatac
1751 agtcttaaca aaaaaagagt tgctccaaaa ctggatc
```

7.36 Nukleotidsequenz des Inserts von pAK215

```
   1 gatcctgaat tcttttcagt cacctttggt gcgggcggtt ctaccactga ccgtaccaaa gaaaccgtat
  71 ttgaaattca ggcagagggt tatcatgctg cgccgcatat ttcttgtatc tcttctagca aggaagaaat
 141 tcgtgaattg ctggcggcat atcaagccaa aggcattaag cgcctcgtca ccttgcgtgg tgatgtgccg
 211 tcaggcgagg tgagtgcggg tgatttaag tatgccaatg agttggtgag ctttatccgc caagagacag
 281 gtgattggtt tcacctggaa gtggcggctt atccagagtt tcacccggag gcgctatccg cagctaaaga
 351 tatggccaat tttaagcgta aggttgaagc tggagctaat tcggcgatta cacagtactt ttacaactct
 421 gatgcgtatt ttaggtttgt ggatagttgt gtggcggatg gcattagtgt gccaattgtg cctggtatta
 491 tgcctattta taactacact caattagcac gtttctcagg cgtgtgtggt gctgaaattc cgcgttggtt
 561 gcgtctgcgc ttagaggctt atgcagacga catgccttcg ttacgtgcgc ttggcattga tgtggtgagt
 631 gaattatgcg aagttttatt ggcagggggc gtgcccagtt tgcattttta caccttaaac caagctggca
 701 ttattagcac gattatcaat aatgttggtt tggaagacgc cacgactcag aaacgtaatt aaagccaaag
 771 gcttagttaa acctgcatga cagaaaaatt agtgaatggt gaggccacgc gggttaaata tggcgtcctc
 841 tacaaataaa taatcttttt cgcgacctgc attccatagt gcaatcatgg taatccaacg catttcttca
 911 atctggatat gctcttgctt gagcgccatc gcgcggtcaa taattaaatc gcgttcaaca tcgttaatga
 981 ctttggcttg ttgtagaaat aaaataaagc tgatgctttc agtattgatt tttttaagtt caatgtcagc
1051 gaacatacgc gttgctgtat cttgatgtgc ataaaccgta gcgggttgat gcagcatggt tttcatctca
1121 tcaaaccagc tcaccgcccc ataaatatca gattgtgcaa atcctgctgc ggacagttca atggtcaata
1191 cttcgctgtc aggctgtgcg tgatttgcaa agtaattttc aaacatgaac actaaaactt caaacatagt
1261 cacccctata atttaagatg gaatctattt ttattactta gtattctcgc gactgaaatt taaatcaggc
1331 gctgatattg gttgcctgca acggttgtca ctttaccttc caattccaac atcataagca tggctgaaag
1401 tgtttcagtc gtcaatgctg tgcgatc
```

Danke !

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk für die Überlassung des Themas, das Ermöglichen eines selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitens, sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit und die mir stets gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. Rolf Daniel danke ich für die freundschaftliche Betreuung während der Promotion, viele interessante Gespräche, die gewissenhafte und engagierte Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit ...und natürlich die erstklassige ärztliche Versorgung bei Notfällen.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Labors 201 Susanne, Corinna, Anke, Caro, Luciana, Tanja W., Claudia, Jessica, Frank, Falk, Baris, Tanja L., Maike, Elke, Alan, Sebastian, Söhnke und Jörg möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und auch den für Spaß bei gemeinsamen Aktionen außerhalb des Laboralltages bedanken.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht dabei an Susanne, die mir in der zweiten Hälfte der Promotion mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke auch für die vielen schönen Gespräche. Liebe Susanne, ohne dich hätte ich das niemals geschafft !

Auch bei Tanja möchte ich mich noch einmal fürs unermüdliche Platten gießen, Elektroporieren und Platten auswerten bei der Suche und Auffindung der ADHS bedanken. Danke für die große Unterstützung !

Furthermore, I would like to thank Mr. Gregg Whited and his collaboraters for the nice time at Genencor in Summer 2001. Thank you Gregg for the fast (sometimes very fast) introduction into the secrets of protein purification without His_6-tag and for showing San Fancisco to me !

Allen Mitgliedern der G2L, die an der manchmal doch sehr mühseligen Sequenzierung all meiner Plasmide beteiligt waren, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft. Ein besonderer Dank geht dabei an Anke für die Beschaffung diverser „Extra-Gele".

Noch ein Dank an Tanja und an Anke, die beim Lesen des Manuskripts dieser Arbeit dem Fehlerteufel immer dicht auf den Fersen waren.

Ein Dank geht außerdem an die jetzigen und die ehemaligen Mitglieder des Werkstatt-Teams mit Olaf Waase, Gerd Birke Charly Bertram und Jürgen Steckel für die vielen kleinen und großen Hilfen in den vergangenen Jahren.

Weiterhin möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und meine große Schwester Beate für ihre liebevolle Unterstützung aus nah und fern !

Meinem liebsten Michael danke ich für seine Liebe und sein Verständnis. Danke, dass es dich in meinem Leben gibt !

Lebenslauf

12.02.1973	geboren in Salzgitter
1979 – 1983	Besuch der Grundschule in Salzgitter-Gebhardshagen
1983 – 1985	Besuch der Orientierungsstufe in Salzgitter-Gebhardshagen
1985 – 1992	Besuch des Gymnasiums am Fredenberg in Salzgitter
Oktober 1992	Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen für das Studienfach Biologie
Oktober 1994	Diplomvorprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
Februar 1998	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie (Hauptfach), Immunologie und Organische Chemie
März 1998 – Mai 1999	Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik unter Anleitung von Prof. Dr. G. Gottschalk und Dr. Rolf Daniel mit dem Titel „Identifizierung neuartiger Glycerin-Dehydratasen“
Juni 1999	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation