

Vorkommen, Verbreitung und biochemische Charakterisierung bakterieller Arylmalonat- Decarboxylasen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie

eingereicht an der

Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

von

Janine Maimanakos

geboren am 2. Juli 1982 in Blankenburg/Harz

Hamburg 2015

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Wolfgang R. Streit
 2. Dissertationsgutachter: Jun. Prof. Dr. Mirjam Perner
- Tag der Disputation: 13.11.2015

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang R. Streit für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas bedanken, sowie für seine Betreuung und Unterstützung während dieser Zeit. Mein Dank geht auch an Jun.-Prof. Dr. Mirjam Perner für ihre Unterstützung und Motivation während ihrer Funktion als Koordinatorin der C1-REM-Graduiertenschule der Landesexzellenzinitiative Hamburg.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine „Labor-Familie“, die ich zweitweise während meiner Doktorarbeit häufiger zu Gesicht bekam als meine Familie zu Hause. Der Platz reicht leider nicht aus, um euch alle namentlich aufzuführen und alle Anekdoten anzureißen. Ihr wart meine Psychotherapeuten, Physiotherapeuten, Motivationstrainer, Ernährungsberater, Babysitter und Laufpartner. Wir haben zusammen gefeiert, geschlemmt und gefastet. Danke für euer offenes Ohr bei allen fachlichen Fragen, sowie für fruchtbare Diskussionen, Ideen und Denkanstöße. Ein besonderer Dank geht hier an Dr. Jennifer Chow, meiner langjährigen „Schreibtisch-Schwester“, für ihre konstruktive Kritik und hilfreichen Anmerkungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank geht an Regina Liebram und Angela Jordan, die mich bei meiner Arbeit im Labor unterstützten. Eure Motivation und Einsatzbereitschaft für mein Projekt war beeindruckend. Ich konnte mich immer auf euch verlassen! Auch bei Birhanu Mekuaninte Kinfu und Dr. Ines Krohn-Molt möchte ich mich an dieser Stelle für ihre Hilfe bei Laborarbeiten während meiner Schwangerschaft sehr herzlich bedanken.

Ein lieber Dank geht an meine Freunde für ihre stetige Unterstützung in Form von aufbauenden Gesprächen, motivierenden E-Mails und Paketen mit Schokolade. Constanze, Julia und Melek, ihr seid die Besten!

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken, deren Vertrauen, Zuspruch und Hilfe mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit auch mit zwei Kindern zu einem erfolgreichen Abschluss zu führen. Allen voran gilt mein Dank meinem Mann Thomas und meiner Mutter, die viel Zeit alleine mit unseren Mädels verbrachten, einkauften, mich bekochten, meine Wäsche wuschen und die Wohnung putzen, damit ich mich meiner Doktorarbeit widmen konnte. Ihr habt meine Zweifel zerstreut, meine Launen ertragen und mich immer wieder motiviert. Ohne euch hätte ich das nie geschafft!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IIIX
Zusammenfassung	X
Abstract	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Decarboxylasen.....	1
1.1.1 Kofaktoren	2
1.1.2 Kofaktor-unabhängige Decarboxylasen.....	4
1.2 Arylmalonat-Decarboxylasen (AMDasen).....	6
1.2.1 Entdeckungsgeschichte.....	7
1.2.2 Struktur und Reaktionsmechanismus	8
1.2.3 Substratspektrum der AMDasen	11
1.2.4 AMDasen auf ihrem Weg zu Biokatalysatoren für industrielle Anwendungen	11
1.3 Protein-Superfamilie Aspartat/Glutamat-Racemasen.....	15
1.4 Metagenomik	16
1.5 Zielstellung der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Behandlung von Geräten und Lösungen.....	18
2.2 Organismen, Vektoren und Konstrukte	18
2.3 Nährmedien und Zusätze	20
2.3.1 LB-Medium	20
2.3.2 Indikatormedium (Horn 2007)	20
2.3.3 Screening-Medium.....	20
2.3.4 Zusätze	21
2.4 Anzucht von Flüssigkulturen	22
2.5 Bestimmung der Zelldichte	22
2.6 Heterologe Überexpression	22
2.7 Induktion der Fosmid-Klone	23
2.8 Gewinnung von Zellrohextrakt	23
2.9 Konservierung von Bakterienkulturen	23

2.10	Enzymaktivitätstest in der Küvette	23
2.11	Enzymaktivitätstest mittels Indikatorplatten	24
2.12	Enzymaktivitätstest mit Hilfe der HPLC	24
2.12.1	Prinzip der HPLC.....	24
2.12.2	Aktivitätstest.....	25
2.12.3	Probenvorbereitung für die HPLC.....	25
2.12.4	HPLC-Applikation zur Substrat-und Produktdetektion	25
2.13	Proteinbestimmung (Bradford 1976)	26
2.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.14.1	Herstellung des SDS-Polyacrylamidgels	27
2.14.2	Probenvorbereitung.....	28
2.14.3	Elektrophorese	28
2.15	Coomassie Blue Färbung	29
2.16	Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie	29
2.17	Dialyse	30
2.18	Molekularbiologische Methoden beim Arbeiten mit DNA	31
2.18.1	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.18.2	Isolierung genomischer DNA per Kit.....	32
2.18.3	Isolierung genomischer DNA mittels CTAB	32
2.18.4	Plasmidisolierung hochwertiger DNA	33
2.18.5	Plasmidisolierung durch Alkalische Lyse (Birnboim and Doly 1979)	34
2.18.6	Gelextraktion	34
2.18.7	Reinigung und Konzentration von DNA	35
2.18.8	Analyse der DNA-Konzentration und Reinheit.....	35
2.18.9	Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkten.....	35
2.18.10	Ligation von DNA	366
2.18.11	Herstellung chemisch kompetenten Zellen verschiedener <i>E. coli</i> -Stämme	377
2.18.12	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	37
2.18.13	Blau-Weiß-Screening.....	38
2.18.14	Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
2.18.15	Fällung von DNA	41
2.18.16	Konstruktion einer Genombank	422

2.18.17	Sequenzierung	42
2.18.18	Bioinformatische Analyse.....	44
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Sequenzbasiertes Suche nach AMDasen in Datenbanken.....	45
3.1.1	Erstellung einer 12-Punkte-Liste zur Sequenzbasierten Suche nach AMDasen in Datenbanken	45
3.2	Untersuchung der Isolate aus Bodenproben auf AMDase-Aktivität.....	48
3.2.1	pH-abhängiger Nachweis der AMDase-Aktivität.....	48
3.2.2	Nachweis von AMDase-Genen mittels PCR	49
3.2.3	Sequenzanalyse der PCR-Fragmente	50
3.3	Konstruktion einer Genombank des Stammes <i>Variovorax</i> sp. HH02 (14 ² (3))	52
3.3.1	Suche nach Fosmidklonen mit <i>amd</i> in der Genombank des Stammes <i>Variovorax</i> sp. HH02	52
3.4	Funktionelle Screenings zum Nachweis von AMDasen	54
3.4.1	Konstruktion einer Positivkontrolle.....	54
3.4.2	Platten-Screening.....	54
3.4.3	HPLC-Screening.....	55
3.4.4	Auswertung des Metagenomscreenings	56
3.5	Klonierung und heterologe Expression der <i>amd</i> -Gene in <i>E. coli</i>	56
3.5.1	Klonierung in Expressionvektor pET-21a	56
3.5.2	Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i> BL21	57
3.6	Biochemische Charakterisierung	59
3.6.1	Temperaturoptimum	59
3.6.2	Temperaturstabilität.....	60
3.6.3	pH-Optimum.....	63
3.6.4	Einfluss von Salzen und möglichen Kofaktoren.....	65
3.6.5	Lösungsmitteltoleranz.....	66
3.7	Klassifizierung der bekannten AMDasen	68
3.7.1	Konservierte Sequenzmotive der AMDasen	68
3.7.2	Vorkommen und Verbreitung der AMDasen	70
3.7.3	AMDasen und ihre nächsten Verwandten.....	75
3.8	AMDasen innerhalb der <i>Variovorax</i> -Gattung	78

3.8.1	Die Gattung <i>Variovorax</i>	78
3.8.2	Genomsequenzierung der Isolate <i>Variovorax</i> sp. HH01 und <i>Variovorax</i> sp. HH02	79
3.8.3	Vorkommen der AMDase-Gene innerhalb der Gattung <i>Variovorax</i>	84
3.8.4	Möglicher Abbauweg des Substrats Phenylmalonat	86
4	Diskussion	90
4.1	Bewertung der Screening-Verfahren	90
4.1.1	HPLC-Screening	91
4.1.2	Suche nach AMDasen in (Meta)genombanken und Isolaten mittels Plattenscreening	92
4.1.3	Sequenzbasiertes Screening	93
4.1.4	Metagenomischer Ansatz	93
4.2	Biochemische Charakterisierung	95
4.3	Klassifizierung der AMDasen	98
4.3.1	Konservierte Sequenzmotive	98
4.3.2	Protein-Superfamilie der Aspartat/Glutamat-Racemasen	99
4.3.3	Vorkommen und Verbreitung von AMDasen	101
4.3.4	Clusterbildung der AMDasen innerhalb der <i>Proteobacteria</i>	105
4.3.5	Putativer Abbauweg und Energiebilanz des Substrates Phenylmalonat am Beispiel von <i>Variovorax paradoxus</i> S110	111
4.3.6	AMDase-Aktivität innerhalb der Gattung <i>Variovorax</i>	1144
4.3.7	Hypothesen zum seltenen Vorkommen der AMDasen	115
4.4	Ausblick	1177
5	Literaturverzeichnis	1188
6	Publikationen	130
7	Anhang	136
7.1	Abkürzungen	13030
7.2	Sequenzen	1311
8	Versicherung an Eides statt	1186

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Reaktionsschema der Decarboxylasen.	1
Abbildung 2:	Kofaktor-abhängige Decarboxylierung am Beispiel von Pyridoxal-5'-Phosphat.	3
Abbildung 3:	Substrate und Decarboxylierungsreaktion der AMDasen.....	6
Abbildung 4:	Strukturformeln einiger α -Arylpropionsäurederivate.	7
Abbildung 5:	Struktur der AMDase aus <i>Bordetella bronchiseptica</i>	8
Abbildung 6:	Möglicher Mechanismus der Decarboxylierungsreaktion der AMDasen.	10
Abbildung 7:	Einfluss der Aminosäuren Cys188 und Gly74 auf die Enantioselektivität der AMDasen.....	10
Abbildung 8:	Übersicht über die Optimierung der AMDase aus <i>Bordetella bronchiseptica</i>	13
Abbildung 9:	12-Punkte-Identifikation von AMDasen.	46
Abbildung 10:	Aminosäuresequenz-Alignment der 11 putativen und bestätigten AMDasen.	48
Abbildung 11:	pH-abhängiger Nachweis der AMDase-Aktivität mittels Plattentest.	49
Abbildung 12:	Ausschnitt aus Nukleotidsequenz-Alignment putativer und verifizierter <i>amd</i> -Gene.....	49
Abbildung 13:	2%-iges Agarose-Gel der PCR-Proben mit spezifischen Primern für <i>amd</i>	50
Abbildung 14:	Aminosäure-Sequenz des PCR-Produkt des Isolates 15 ² (1)2 im Vergleich mit einer Asp/Glu/Hydantoin Racemase und einer AMDase aus <i>Achromobacter</i>	52
Abbildung 15:	2%-iges Agarose-Gel mit Proben des PCR-Screenings der Genombank <i>Variovorax</i> sp. HH02.	53
Abbildung 16:	Sequenzumgebung der AMDase-Gene der Stämme <i>Variovorax</i> sp. HH01 und <i>Variovrax</i> sp. HH02.	53
Abbildung 17:	Fosmidklon-ähnliche Positivkontrolle zum Nachweis von AMDase-Aktivität in Metagenombanken.	54
Abbildung 18:	Nachweis der AMDase-Aktivität der Positivkontrolle mittels Platten-Screening.	55
Abbildung 19:	Ablauf des HPLC-Screenings der Metagenombanken am Beispiel der Positivkontrolle.....	55
Abbildung 20:	Plasmide pET-21a:: <i>amdP</i> und pET-21a:: <i>amdV</i>	57
Abbildung 21:	pH-abhängiger AMDase-Schnelltest mit Rohextrakt der induzierten Kulturen <i>E. coli</i> BL21 pET-21a:: <i>amdV</i> und <i>E. coli</i> BL21 pET-21a:: <i>amdP</i>	57
Abbildung 22:	SDS-PAGE der Reinigungsschritte der Enzyme AmdV und AmdP.....	58
Abbildung 23:	Einfluss der Temperatur auf die AMDase-Aktivität.	59
Abbildung 24:	Temperaturstabilität der AMDase-Aktivität bei 22°C und 4°C.....	61
Abbildung 25:	Temperaturstabilität der AMDase-Aktivität bei -20°C.....	63
Abbildung 26:	Einfluss des pH-Wertes auf die AMDase-Aktivität.	644

Abbildung 27:	Einfluss von Kofaktoren und Salzen auf die AMDase-Aktivität.	66
Abbildung 28:	Einfluss von Lösungsmitteln auf die AMDase-Aktivität.	67
Abbildung 29:	Aminosäuresequenz-Alignment der bekannten und putativen AMDasen mit konservierten Sequenzbereichen.	69
Abbildung 30:	Stammbaum der Bakteriengattungen mit <i>amd</i> -Genen basierend auf den 16S-rRNA-Gensequenzen.	70
Abbildung 31:	Stammbaum (PhyML, LG) putativer und bekannter AMDasen basierend auf Aminosäuresequenz-Alignment ClustalW2.	71
Abbildung 32:	Vergleich der Sequenzumgebung der <i>amd</i> -Gene putativer und bekannter AMDasen.	72
Abbildung 33:	Homologe Sequenzabschnitte in unmittelbarer Umgebung von <i>amd</i>	74
Abbildung 34:	Radialer Stammbaum (PhyML, LG) der putativen und bekannten AMDasen mit möglichen Enzymclustern.	74
Abbildung 35:	Stammbaum der AMDasen und ihrer nächsten Verwandten.	76
Abbildung 36:	AMDase-spezifische Aminosäuren innerhalb der konservierte Sequenzmotive.	77
Abbildung 37:	Stammbaum der Gattung <i>Variovorax</i>	79
Abbildung 38:	Funktionsvorhersage für putative Proteine des <i>Variovorax</i> sp. HH01 basierend auf der COG-Datenbank.	81
Abbildung 39:	Funktionsvorhersage für putative Proteine des <i>Variovorax</i> sp. HH02 basierend auf der COG-Datenbank.	82
Abbildung 40:	Synteny-Dot-Plots der Nukleotidsequenzen verschiedener <i>Variovorax</i> -Stämme.	83
Abbildung 41:	Vergleich der Genumgebung verschiedener <i>Variovorax</i> -Stämme.	85
Abbildung 42:	Stammbaum der Gattung <i>Variovorax</i> basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen.	86
Abbildung 43:	putativer aerober Abbauweg der Phenyllessigsäure in <i>E. coli</i> K12 und <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.	87
Abbildung 44:	Übersicht über am Phenylacetatabbau beteiligte Gene, Genprodukte und putative Teilschritte des Stoffwechselwegs.	88
Abbildung 45:	GC-Gehalt der AMDase-Gene in Abhängigkeit zum GC-Gehalt der Genome.	104
Abbildung 46:	Vorkommen der Gene der TTT-Familie in der Sequenzumgebung des <i>amd</i> -Gens.	108
Abbildung 47:	putative Elektronentransportketten am Beispiel von <i>Variovorax paradoxus</i> S110.	113
Abbildung 48:	Hypothesen zum seltenen Vorkommen der AMDasen.	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.....	18
Tabelle 2:	Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden	19
Tabelle 3:	Konstrukte, die während dieser Arbeit hergestellt bzw. genutzt wurden	19
Tabelle 4:	Zusätze, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	21
Tabelle 5:	Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Gelen	28
Tabelle 6:	Zusammensetzung von Restriktionsansätzen	35
Tabelle 7:	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.	39
Tabelle 8:	Auflistung der 12 Suchkriterien zur Identifizierung von AMDasen in Datenbanken.	47
Tabelle 9:	Isolate mit putativer AMDase-Aktivität.....	511
Tabelle 10:	Auflistung der konservierten Sequenzmotive mit katalytisch aktiven Aminosäuren der AMDasen und deren Funktionen.	68
Tabelle 11:	Sequenzierungsdetails der Genome von <i>Variovorax</i> sp. HH01 und <i>Variovorax</i> sp. HH02.....	80
Tabelle 12:	biochemische Eigenschaften charakterisierter AMDasen.....	96
Tabelle 13:	Übersicht über Organismen mit konserviertem <i>amd</i> und deren Ursprungshabitat, sowie Isolierungsort.	102
Tabelle 14:	Übersicht über AMDase-Cluster.	106

Zusammenfassung

Arylmalonat-Decarboxylasen (AMDasen) sind sehr seltene und bisher wenig erforschte Enzyme. Zurzeit gibt es nur vier bekannte und biochemisch charakterisierte Vertreter. Ihre Fähigkeit zur Kofaktor-unabhängigen Decarboxylierung α -disubstituierter Malonsäure-Derivate zu homochiralen Produkten macht sie jedoch als Biokatalysatoren für industrielle Prozesse äußerst attraktiv. Ziel dieser Arbeit war es daher, weitere, bisher unbekannte Vertreter dieser Enzymklasse aufzufinden, biochemisch zu charakterisieren und so zu einem besseren Verständnis hinsichtlich des Vorkommens, der Verbreitung und der Funktionsweise der AMDasen beizutragen. Neben funktionellen und sequenzbasierten Screeningmethoden wurde eine Datenbankrecherche durchgeführt. Basierend auf publizierten Daten wurde ein Suchalgorithmus erarbeitet, um eine sichere Vorhersage über die AMDase-Aktivität potentieller Kandidaten zu treffen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden zwei Enzyme biochemisch charakterisiert. Dabei handelte es sich um das aus dem Bodenisolat *Variovorax* sp. HH02 stammenden AmdV und das per Datenbanksuche ermittelte AmdP aus *Polymorphum gilvum*. Die höchste Enzymaktivität zeigten die Enzyme bei 30°C (AmdV) bzw. 37°C (AmdP) und einem pH von 7. Die Enzymaktivität der AMDasen konnte durch keinen der getesteten Effektoren gesteigert werden, was eine Kofaktor-unabhängige Katalyse vermuten lässt. Beide Enzyme zeigten ihre größte Lösungsmitteltoleranz in Ansätzen mit 10% DMSO. Die AMDasen erreichten noch 50±4% (AmdV) bzw. 82±7% (AmdP) der ursprünglichen Enzymaktivität.

Basierend auf spezifischen Sequenzmotiven und Screeningverfahren konnten in dieser Arbeit 20 zusätzliche AMDasen identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass Arylmalonat-Decarboxylasen mit konservierten Sequenzmustern des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica* extrem seltene Enzyme sind, begrenzt auf die Klassen der α -, β - und γ -*Proteobacteria* mit möglichem Ursprung im Boden. Homologien der Aminosäuresequenzen und Vergleiche der Sequenzumgebung ermöglichten die erstmalige Einteilung in sieben Enzymcluster. Auffällig ist die Häufung von Genen, kodierend für verschiedene Transporter der TTT-Familie, TRAP-Transporter und ABC-Transporter, sowie Genen für Mandelat-Racemasen/Muconat-laktonisierende Enzyme, die in einem funktionellen Zusammenhang mit der Substrataufnahme bzw. dem Abbau von AMDase-Produkten stehen könnten.

Abstract

Arylmalonate-Decarboxylases (AMDases) are very rare and hitherto underexplored enzymes. Currently only four known and biochemically characterized representatives exist. However, their capability of cofactorless decarboxylation of α -disubstituted malonic acid derivatives to homochiral products make them attractive and promising candidates for the use as biocatalysts in industrial processes. The intention of this work was to discover further yet unknown representatives of this enzyme class and to biochemically characterize them, resulting in a better understanding regarding to occurrence and distribution of AMDases. Besides functional and sequence-based screening methods a data base search was performed. Based on published data a search algorithm was developed for a reliable prediction of AMDase activity of potential candidates. In the further course of this work two enzymes were biochemically characterized. These are AmdV from *Variovorax* sp. HH02, originated from soil and AmdP from *Polymorphum gilvum* found by data base search. The enzymes displayed their highest enzyme activity at 30°C (AmdV) respectively 37°C (AmdP) and pH 7. The enzyme activity could not be increased by any tested effector, which leads to the assumption of a cofactor-independent catalysis. Both enzymes showed their highest tolerance to organic solvents with 10% DMSO. The AMDases still reached 50±4% (AmdV) and 82±7% (AmdP) of their unaffected enzyme activity, respectively.

Based on specific sequence patterns and screening methods 20 additional AMDases could be identified in this work. It became apparent that arylmalonate decarboxylases with the conserved sequence pattern of *Bordetella bronchiseptica*'s prototype are extremely rare enzymes, limited to the classes of α -, β - und γ -*Proteobacteria*, possibly arisen from soil. Amino acid homologies and comparison of gene surrounding sequences enabled the classification of seven enzyme clusters for the very first time. Particularly striking is the accumulation of genes coding for different transporters of the TTT family, TRAP transporters and ABC transporters as well as genes coding for mandelate racemases/muconate lactonizing enzymes, which might be involved in substrate uptake or degradation of AMDases' products.

1 Einleitung

1.1 Decarboxylasen

Decarboxylasen gehören zur Enzymklasse der Lyasen (EC 4) und umfassen in dem Zweig der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Lyasen (EC 4.1) die sogenannten Carboxy-Lyasen (EC 4.1.1). Diese Enzyme entfernen Carboxylgruppen organischer Substrate unter Freisetzung von Kohlendioxid (Abbildung 1).

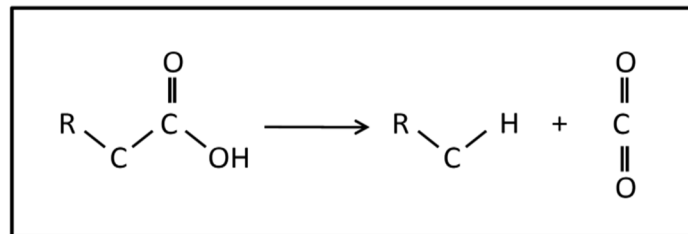


Abbildung 1: Reaktionsschema der Decarboxylasen. Die Carboxylgruppe einer organischen Verbindung wird abgespalten und als Kohlenstoffdioxid freigesetzt. R:Rest

Zurzeit besteht diese Enzymklasse, den Empfehlungen des Nomenklaturkomitees der internationalen Vereinigung für Biochemie und Molekularbiologie entsprechend (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC4/>), aus 96 verschiedenen Decarboxylasen. Dabei wurden sowohl bakterielle, archaeale, sowie eukaryotische Enzyme erfasst. Decarboxylierungen gehören zu den zentralen und ubiquitären Stoffwechselreaktionen, die an einer Vielzahl metabolischer Prozesse beteiligt sind, wie z.B. an der Säure-Stressantwort (Richard and Foster 2004; Moreau 2007), am Aufbau eines elektrochemischen Gradienten (Dimroth 1980; Dimroth and Schink 1998) oder an der Synthese von Zellbausteinen (Yablonski et al. 1996; Schuiki and Daum 2009). Durch ihr breites Substratspektrum und selektive Katalyse haben einige Vertreter bereits Einzug in die industrielle Anwendung gefunden und werden u.a. für die Herstellung von Bier und optisch reiner Zwischenprodukte bei der Produktion von Medikamenten oder Lebensmittelzusätzen genutzt (Liese et al. 2006). Neben ihrer Decarboxylierungsaktivität sind einige Enzyme in der Lage, die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen zu knüpfen (Iding et al. 2000; Meyer et al. 2011). Eine besondere Herausforderung ist dabei die Katalyse der Umkehrreaktion, die Fixierung von Kohlendioxid, welche eine Aktivierung des CO₂ voraussetzt (Dimroth and Hilpert 1984; Glueck et al. 2010). Ein Beispiel für Carboxylase-aktive Decarboxylasen ist die regioselektive β -Carboxylierung von *para*-Hydroxystyrenen zu (*E*)-Zimtsäure durch bakterielle Phenolsäure-

Decarboxylasen (Wuensch et al. 2015). Diese enzymkatalysierte Reaktion ist bemerkenswert, da sie kein direktes Äquivalent in der traditionellen, chemischen Synthese besitzt (Wuensch et al. 2012).

Die katalytische Herausforderung bei einer Decarboxylierung ist die Destabilisierung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zwischen Substrat und abzuspaltender Carboxylgruppe und die Stabilisierung des negativ geladenen Übergangszustands. Während einer Decarboxylierung kommt es nach der Abspaltung des Kohlendioxids zur Bildung eines instabilen Carbanions. Die Stabilisierung des Intermediats wird durch die Delokalisierung der negativen Ladung ermöglicht. Die Bewältigung dieser katalytischen Herausforderung ist abhängig vom Substrat und aktivem Zentrum des jeweiligen Enzyms.

1.1.1 Kofaktoren

Es gibt eine Reihe von Kofaktoren (Li et al. 2012), die an Decarboxylierungen beteiligt sind und helfen, die Aktivierungsenergie der Enzymreaktion zu verringern. Oft fungieren sie als Elektronensenken und tragen zur Resonanzstabilisierung der Übergangszustände bei, wie Pyridoxal-5'-Phosphat (Eliot and Kirsch 2004), Thiamin-Diphosphat (Bunik et al. 2013), Metallionen (Piccirilli et al. 1987) oder eine Pyruvoyl-Gruppe (Poelje and Snell 1990). Auch die Polarisierung der Substratstruktur ist eine wichtige Aufgabe der Kofaktoren. Bei Pyridoxal-5'-phosphat und Pyruvoyl-abhängigen Enzymen geschieht dies durch die Ausbildung eines Imins (Schiffsche Base) (Gallagher et al. 1989; Toney 2005). Beide Kofaktoren sind am Aminosäurestoffwechsel und der Bildung biogener Amine beteiligt. Der allgemeine Reaktionsablauf einer Pyridoxal-5'-phosphat abhängigen Decarboxylierung ist in Abbildung 2 dargestellt. Thiamin-Diphosphat, ein Derivat des Vitamins B1, bewerkstelligt die Polarisierung durch die Bildung eines Ylids, welches ein tetraedrales Zwischenprodukt mit dem Substrat bildet (Kluger and Tittmann 2008). Ein Ylid ist ein Zwitterion mit Kohlenstoff als Anion, wobei die Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung sowohl kovalenten als auch ionischen Charakter besitzt. Der Kofaktor ermöglicht die Decarboxylierung von α -Ketosäuren und kommt u.a. bei Enzymen des Zitronensäurezyklus und der alkoholischen Gärung vor. Neben diesen nichtoxidativen Reaktionen ist Thiamin-Diphosphat auch an einer Reihe oxidativer Katalysen beteiligt.

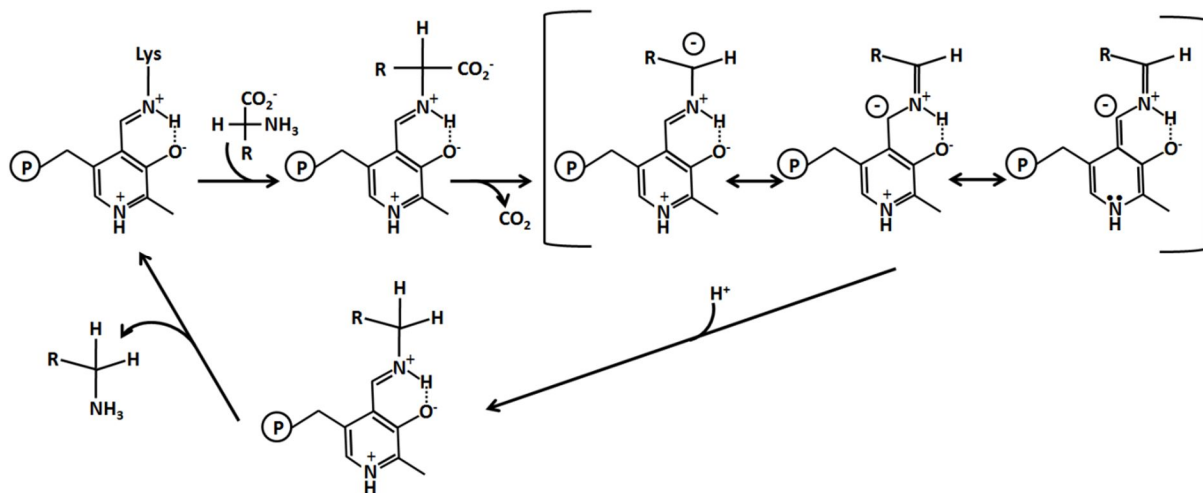


Abbildung 2: Kofaktor-abhängige Decarboxylierung am Beispiel von Pyridoxal-5'-Phosphat. Das aminogruppentragende Substrat wird über eine Transaminierung auf das enzymgebundene Pyridoxal-5'-Phosphat übertragen. Nach der Abspaltung der Carboxylgruppe erfolgen eine Protonierung und eine weitere Transaminierungsreaktion mit einer Aminogruppe eines Lysins im aktiven Zentrum, die zur Freisetzung des Produktes führt. Mesomere Grenzstrukturen des Zwischenproduktes sind in Klammern dargestellt und tragen zur Stabilisierung des Intermediats durch Delokalisierung der negativen Ladung bei. Details können im Einzelfall variieren. P: Phosphatidylgruppe, R: Rest

Einige Enzyme nutzen die Bildung von Radikalen, um die Abspaltung von Kohlendioxid zu begünstigen. Beispiele sind Glycinderadikal-Enzyme (Martins et al. 2011; Feliks et al. 2013), welche an der Tyrosinfermentation in Clostridien beteiligt sind oder die Mangan-abhängige Oxalat-Decarboxylase, welche die Umsetzung von Oxalat zu Formiat und Kohlendioxid katalysiert (Tanner et al. 2001; Anand et al. 2002; Just et al. 2007; Imaram et al. 2011; Li et al. 2012).

Auch Biotin ist als prosthetische Gruppe von Enzymen an Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen beteiligt. Gut untersucht ist die Decarboxylierung von Dicarbonsäuren, meist α -Ketosäuren, und Thioestern, gekoppelt an den Transport von Natrium-Ionen, zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten (Dimroth 1980; Dimroth 1986; Huder and Dimroth 1995; Dimroth and Schink 1998). Der Übergang der Carboxylgruppe des Substrates auf Biotin wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Enzym und Carbonylgruppe des Substrats, sowie zwischen Enzym und Carbonylgruppe des Biotins erleichtert. Diese beiden Oxyanion-Höhlen unterstützen die Polarisierung des Substrates.

Substrate der Flavin-abhängigen Decarboxylasen tragen ein endständiges Cystein, dessen Carboxylgruppe im Laufe der Enzymkatalyse entfernt wird. Der allgemeine Reaktionsablauf umfasst die Oxidierung der Thiolgruppe des Cysteins zu einem Thioaldehyd und die Reduktion des Flavin-Kofaktors, sowie die spontane Decarboxylierung, begünstigt durch die

Delokalisierung der negativen Ladung durch die benachbarte Thioaldehydgruppe (Blaesse et al. 2000; Strauss and Begley 2001; Hernández-Acosta et al. 2002; Strauss et al. 2004; Li et al. 2012).

Metallionen kommen in einer Vielzahl von Decarboxylasen zum Einsatz, oft in Verbindung mit einem organischen Kofaktor. Die Aufgaben der Metallionen reichen von der Stabilisierung der Proteinstruktur (Chang and Tong 2003) über Koordination des Substrates (Dimroth et al. 2000) oder des Kofaktors (Versées et al. 2007) bis hin zur Beteiligung an der Katalyse (Piccirilli et al. 1987; Imaram et al. 2011; Jiménez et al. 2013).

NAD(P)⁺-abhängige, decarboxylierende Enzyme katalysieren die oxidative Decarboxylierung eines Substrates unter Bildung der reduzierten Form des Coenzym. Vertreter dieser Gruppe zählen zu den Dehydrogenasen. Substrate der Enzyme sind meist β -Hydroxysäuren. Das allgemeine Prinzip des Reaktionsmechanismus (Hurley et al. 1991; Adams et al. 1994; Hwang et al. 1998; Chang and Tong 2003) ist die Oxidation des jeweiligen Substrates zur β -Ketosäure und die damit verbundene Übertragung eines Hydrids auf das Nicotinamid, um NAD(P)H zu generieren. Die Polarisierung der gebildeten Ketogruppe durch das Metallion unterstützt die Decarboxylierung.

Derivate des Coenzym A sind an Decarboxylierungsreaktionen der biotinabhängigen (EC 4.1.1.89) und biotinunabhängigen Malonat-Decarboxylasen (EC 4.1.1.88) beteiligt. Der genaue Reaktionsmechanismus ist noch nicht verstanden. Der Kofaktor ermöglicht die Übertragung des Substrats Malonat auf das Acylcarrier-Protein (ACP) unter Ausbildung eines Thioesters und der Freisetzung einer am ACP gebundenen Acetylgruppe. Die Decarboxylierung des aktivierten Malonylthioesters führt zur Freisetzung von Kohlendioxid und einer am Kofaktor verbleibenden Acetylgruppe, die für eine neue Katalyserunde zur Verfügung steht (Handa et al. 1999). In biotinabhängigen Malonat-Decarboxylasen wird das Kohlendioxid an den Biotin-Kofaktor gebunden und führt zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten (Berg and Dimroth 1998).

1.1.2 Kofaktor-unabhängige Decarboxylasen

Es gibt eine kleine Gruppe von Decarboxylasen, die in der Lage sind, Carboxylgruppen ihrer Substrate ohne die Verwendung von Kofaktoren abzuspalten. Spezielle Substratstrukturen und/oder Tertiärstrukturen der Enzyme sind Voraussetzung, um die bereits erwähnte katalytische Herausforderung zu meistern und beschränken so die Anzahl der Vertreter

dieser Gruppe. Kofaktor-unabhängige Decarboxylasen sind u.a. Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase (EC 4.1.1.23), 2-Oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazolin-Decarboxylase (EC 4.1.1.-), Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase (EC 4.1.1.3) aus *E. coli*, Phenolsäure-Decarboxylase (EC 4.1.1.-) und die Arylmalonat-Decarboxylase (4.1.1.76), die im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben wird.

Der allgemeine Mechanismus umfasst die Destabilisierung der abzusplittenden Carboxylgruppe des Substrates und die Stabilisierung der negativen Ladung bzw. des freien Elektronenpaares des Übergangszustandes. Eine Destabilisierung kann durch elektrostatischen Stress bewirkt werden, wie für die Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase vermutet (Wu et al. 2000). Ungünstige Wechselwirkungen zwischen der abzusplittenden Carbonylgruppe und sauren Aminosäuren des aktiven Zentrums haben einen destabilisierenden Effekt (Ho et al. 2009; Iiams et al. 2011). Dieser Effekt kann durch eine hydrophobe Umgebung der Carboxylgruppe verstärkt werden (Benning et al. 2000; Wu et al. 2000; Okrasa et al. 2008). Ansammlungen gleicher Ladungen erhöhen die Energie des Enzym-Substrat-Komplexes und senken dadurch die Aktivierungsenergie der Reaktion. Dies trägt zur Destabilisierung des Grundzustandes bei (Kourist et al. 2014). Die Stabilisierung des Übergangszustandes wird durch Delokalisierung der negativen Ladung in sogenannten Elektronensenken bewerkstelligt. Als Elektronensenken dienen Iminbindungen (Schiffsche Basen) zwischen einer β -Ketogruppe und einer ε -Aminogruppe eines Lysins im aktiven Zentrum (Warren et al. 1966; Ho et al. 2009) oder π -Elektronen-Systeme der aromatischen Reste oder Vinylgruppen des Substrates (Okrasa et al. 2008; Okrasa et al. 2009; Rodríguez et al. 2010). Desweiteren kann bei β -Ketosäuren eine Stabilisierung des Übergangszustandes durch Polarisierung der Carbonylgruppe bewirkt werden. Dies wird durch Wechselwirkungen mit katalytisch aktiven Aminosäuren ermöglicht. Ein Beispiel ist die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, bei der die negative Ladung des Enolats über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird (Benning et al. 2000).

Besonders nennenswert unter den Kofaktor-unabhängigen Decarboxylasen ist die Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase (OMPDC). Die OMPDC katalysiert den letzten Schritt in der Synthese von Pyrimidin, einem wichtigen Baustein der DNA- und RNA-Moleküle und gehört zu den leistungstärksten Enzymen, die bisher bekannt sind. Die Reaktionsbeschleunigung der enzymkatalysierten Reaktion im Vergleich zur unkatalysierten liegt bei Größenordnungen von 10^{17} (Radzicka and Wolfenden 1995). Diese herausragende Leistung

rückte die Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase in den Fokus unzähliger Forschungen. Trotzdem konnte der Reaktionsmechanismus der Substratdestabilisierung und Stabilisierung des Übergangszustands bis zum heutigen Tage nicht eindeutig geklärt werden. Die Destabilisierung könnte über elektrostatischen Stress durch einen stark konservierten Asparaginrest und eine hydrophobe Bindungstasche in unmittelbarer Umgebung der abzusplittenden Carboxylgruppe bewirkt werden, während Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sauerstoffatom an Position 4 des Substrates und der Aminogruppe eines Lysin- oder Serinrestes zu einer Stabilisierung des Übergangszustandes beitragen. Konformationsänderungen während der Katalyse könnten zum Ausschluss von Wassermolekülen aus dem aktiven Zentrum führen und die Entstehung eines Mikromilieus ermöglichen, dass durch eine verringerte Dielektrizitätskonstante die Stabilisierung des Übergangszustands begünstigt (Chan et al. 2009; Jamshidia et al. 2015).

1.2 Arylmalonat-Decarboxylasen (AMDasen)

Substrate der Arylmalonat-Decarboxylasen (EC 4.1.1.76) sind Arylmalonsäurederivate, welche unter Abspaltung von Kohlendioxid zu Arylalkansäurederivaten umgewandelt werden (Abbildung 3).

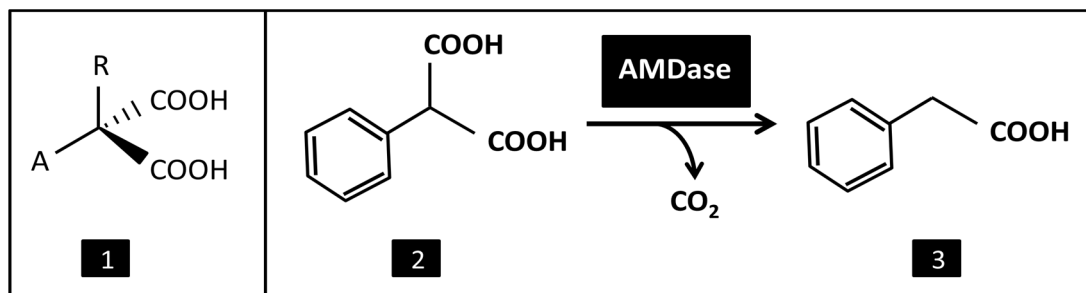


Abbildung 3: Substrate und Decarboxylierungsreaktion der AMDasen. Aromatische Malonsäurederivate [1], wie z.B. Phenylmalonsäure [2], werden durch AMDasen zu Phenyllessigsäure [3] oder anderen Arylalkansäuren und Kohlendioxid umgewandelt. A: Arylgruppe, R: Rest

In dieser Arbeit wurde das Substrat Phenylmalonsäure (CAS 2613-89-0) verwendet. Phenylmalonsäure (Abbildung 3) ist eine Dicarbonsäure, bestehend aus drei Kohlenstoffatomen und einer Phenylgruppe als aromatischem Rest. Das Substrat ist wasserlöslich und liegt als weißes Pulver vor mit einem charakteristisch süßlich-stechenden Geruch. Es ist aufgrund seiner einfachen Struktur, Wasserlöslichkeit und guten Umsetzung durch AMDasen bestens als Substrat geeignet und wird vorrangig bei der Arbeit mit diesen Enzymen genutzt.

1.2.1 Entdeckungsgeschichte

α -Arylpropionsäuren zählen zu der bedeutenden Gruppe nicht-steroidaler, entzündungshemmender Medikamente (NSAID), zu denen u.a. die Wirkstoffe Naproxen, Ibuprofen, Ketoprofen und Flurbiprofen gehören (Abbildung 4).

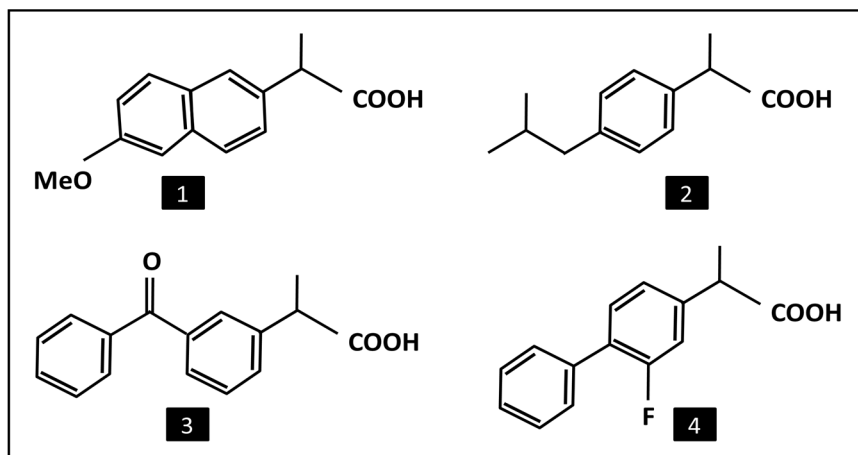


Abbildung 4: Strukturformeln einiger α -Arylpropionsäurederivate. Dargestellt sind die Strukturformeln der α -Arylpropionsäurederivate Naproxen [1], Ibuprofen [2], Ketoprofen [3] und Flurbiprofen [4].

Anfang der 90er-Jahre liefen die Patente für den entzündungshemmenden Wirkstoff Naproxen aus. Dies ermöglichte die Produktion kostengünstiger Generika. Naproxen wurde 1976 von der Firma Syntex auf den Markt gebracht und erreichte 1995 einen Jahresumsatz von 1,05 Milliarden US\$ (Harrington and Lodewijk 1997). Entscheidend ist, dass das (*S*)-Enantiomer der Verbindung etwa 28fach wirksamer ist als das (*R*)-Enantiomer (Harrison et al. 1970). 1988 wurden etwa zwei Drittel der Produktionskosten durch die Racemattrennung verursacht (Harrington and Lodewijk 1997). Dies führte zu einer Vielzahl von Forschungsansätzen mit dem Ziel, eine kostengünstigere Synthese des (*S*)-Enantiomers zu ermöglichen. Neben chemischen Verfahren zur Racemattrennung und stereoselektiven Synthese (Sonawane et al. 1992) wurde auch nach enzymatischen Lösungen gesucht (Effenberger and Böhme 1994; Layh et al. 1994; Tsai and Wei 1994). Die große Aufmerksamkeit, die zu dieser Zeit den α -Arylalkansäuren und ihrer Herstellung gewidmet wurde, führte 1992 zur Entdeckung der ersten und bestuntersuchtesten Arylmalonat-Decarboxylase aus *Bordetella bronchiseptica* durch Miyamoto und Ohta (Miyamoto and Ohta 1992a).

Arylmalonat-Decarboxylasen (EC 4.1.1.76) sind in der Lage Kohlenstoffdioxid aus prochiralen, α -disubstituierten Malonsäurederivaten abzuspalten und so die Bildung von homochiralen

Produkten zu ermöglichen. Weitere Enzyme wurden durch selektive Anreicherungen von Bodenproben auf dem Substrat Phenylmalonat in den Organismen *Achromobacter* sp. KU1311 (Miyamoto et al. 2007), *Enterobacter cloacae* KU1313 (Miyamoto et al. 2008), *Chelativorans* sp. BNC1 (Okrasa et al. 2008) und *Variovorax* sp. HH01 (unveröffentlichte Daten, Maimanacos 2009) entdeckt. Die fünf Enzyme sind bis zum heutigen Tag die einzigen Decarboxylasen mit nachgewiesener AMDase-Aktivität. Dies macht Arylmalonat-Decarboxylasen zu interessanten Forschungsobjekten.

1.2.2 Struktur und Reaktionsmechanismus

Die Struktur und der putative Reaktionsmechanismus der AMDasen wurden von Matoishi et al. und Okrasa et al. näher beschrieben (Matoishi et al. 2004; Okrasa et al. 2008). Kristallstrukturanalysen (Kuettnner et al. 2008; Okrasa et al. 2008; Okrasa et al. 2009; Obata and Nakasako 2010; Lind and Himo 2014) des Enzyms aus *Bordetella bronchiseptica* ermöglichten Einblicke in den Aufbau der AMDase und die möglichen Abläufe im aktiven Zentrum. Das Enzym ist ein Monomer (24,7 kDa), bestehend aus zwei viersträngigen, parallel angeordneten β -Faltblättern, umgeben von α -Helices. Das aktive Zentrum befindet sich in einem Spalt zwischen zwei β -Faltblättern (Abbildung 5A).

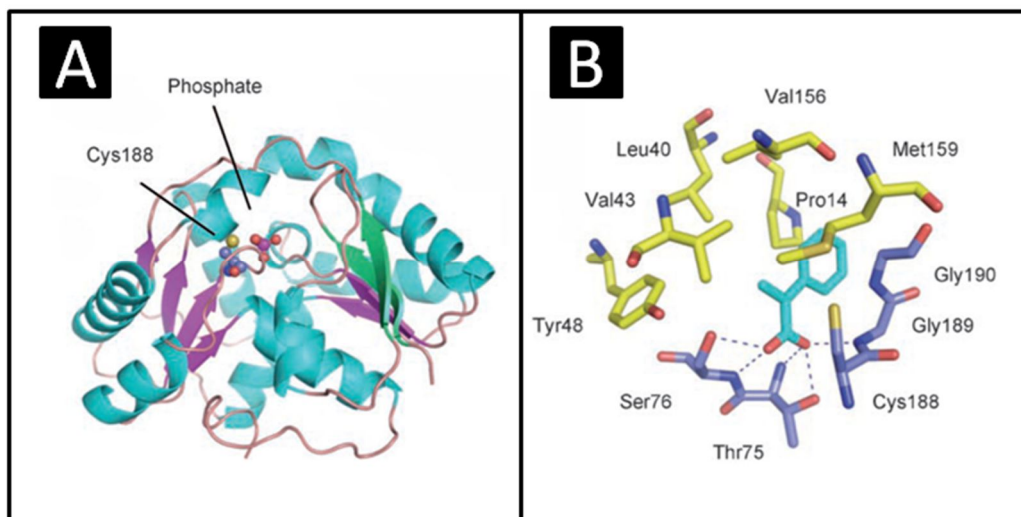


Abbildung 5: Struktur der AMDase aus *Bordetella bronchiseptica*. [A] Bändermodell der Kristallstruktur des Enzyms. Zu sehen sind ein Phosphat-Molekül (rosa und rot), das Cys188 (gelb und blau), β -Faltblattstrukturen (Pfeile) und α -Helices (Spiralen). β -Faltblattstrukturen nahe dem Lösungsmittel-zugänglichen Tunnel sind grün.[B] Modell des aktiven Zentrums mit gebundenem 2-Methyl-2-phenyl-1,1-endiolat. Aminosäuren der kleinen Bindungstasche, welche den Methylrest umgeben, sind gelb dargestellt, Aminosäuren der Dioxanion-Höhle sind blau. Tyr126, welches auch eine WBB zum Intermediat ausbildet, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit entfernt. Abbildungen wurden Okrasa et al. 2008 entnommen.

Für die Katalyse wichtige Strukturen sind eine große Aromaten-Bindungstasche, eine kleine hydrophobe Bindungstasche und die Dioxyanion-Höhle. Die große Aromaten-Bindungstasche erlaubt mit der Entfernung von 8 Å zwischen der Aminosäure Pro14 und der Amidbindung der Aminosäuren Gly89 und Gly90 die optimale Wirkung der Van der Waals-Kräfte zur Stabilisierung des aromatischen Restes der Substrate (Okrasa et al. 2008), wobei sich die Nummerierung der Aminosäuren auf die Aminosäuresequenz der ersten beschriebenen AMDase aus *Bordetella bronchiseptica* (Miyamoto and Ohta 1992a) bezieht. Die koplanare Orientierung des Aromaten zum π -System des putativen Endiolat-Zwischenproduktes würde zur Delokalisierung der negativen Ladung und somit zur Stabilisierung des Intermediats beitragen (Okrasa et al. 2008). Leu40, Val43, Tyr48, Val156 und Met159 sind Bausteine der hydrophoben Bindungstasche (Abbildung 5B). Es wird vermutet, dass die Destabilisierung der abzuspaltenden Carboxylgruppe in der hydrophoben Bindungstasche durch die Aminosäuren Leu40, Val43, Tyr48, Val156 die Decarboxylierungsreaktion unterstützt. Die Dioxyanion-Höhle besteht aus zwei angrenzenden Oxyanion-Höhlen, welche über sechs Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) die am Substrat verbleibende Carboxylgruppe des Endiolats stabilisieren. An den WBB zum Substrat sind die Aminosäuren Thr75, Ser76, Tyr126 und Gly189 beteiligt. Das Cys188 ist für Protonierung des postulierten Endiolat-Zwischenproduktes verantwortlich und somit für die Konfiguration der chiralen Produkte (Okrasa et al. 2008). Gly74 ist eine entscheidende Aminosäure bei der Differenzierung zwischen Decarboxylasen und strukturell und mechanistisch verwandten Aspartat- und Glutamat-Racemasen (Hwang et al. 1999; Tanner 2002), die an dieser Stelle ein zweites katalytisch aktives Cystein besitzen, welches die Racemase-Aktivität ermöglicht. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die kofaktorunabhängige Decarboxylierungsreaktion der AMDasen vermutlich durch eine optimale Positionierung des Substrates bewirkt wird, für die mindestens drei Faktoren ausschlaggebend zu sein scheinen: Die Stabilisierung des putativen Endiolats über Wasserstoffbrückenbindungen zur verbleibenden Carboxylgruppe (1) in der Dioxyanion-Höhle und durch die Delokalisierung der negativen Ladung im aromatischen Rest (2), sowie das Fehlen von elektrostatischen Wechselwirkungen in der hydrophoben Bindungstasche, welche die abzuspaltende Carboxylgruppe destabilisiert (3).

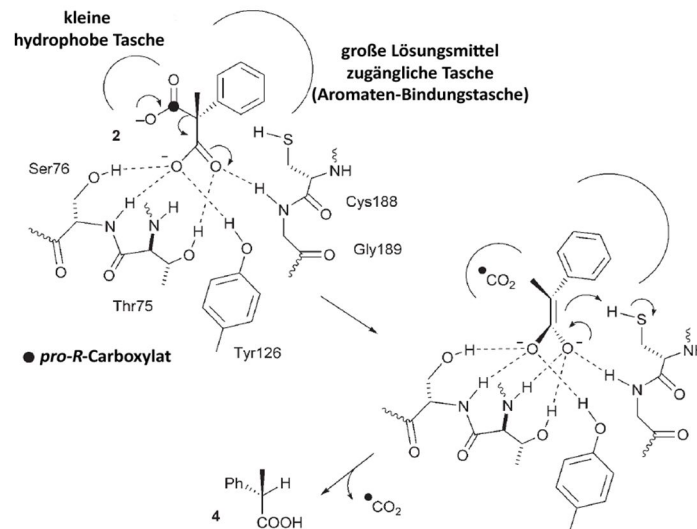


Abbildung 6: Möglicher Mechanismus der Decarboxylierungsreaktion der AMDasen. Dargestellt sind die Aminosäuren der Dioxanion-Höhle, welche WBB zum Substrat α -Methyl- α -phenylmalonat ausbilden und nach der Decarboxylierung das putative Endiolat stabilisieren. Die Abspaltung der *pro-R*-Carboxylgruppe und die anschließende Protonierung durch Cys188 auf der *Si*-Seite führen zur Bildung des (2R)-Phenylpropionats. Abbildung wurde Okrasa et al. 2008 entnommen.

Wie bereits erwähnt, führt die enantioselektive Decarboxylierung prochiraler Substrate zur Bildung von homochiralen Produkten. So sind AMDasen z.B. in der Lage α -Methyl- α -phenylmalonat zu (2R)-Phenylpropionat umzusetzen (Miyamoto et al. 1992; Miyamoto and Ohta 1992a; Okrasa et al. 2008). Der in Abbildung 6 vorgeschlagene Reaktionsprozess soll in zwei Schritten ablaufen: (1) die Bildung eines planaren Endiolat-Zwischenproduktes durch die Decarboxylierung der *pro-R*-Carboxylgruppe und (2) die anschließende Protonierung des Intermediats auf der *Si*-Seite durch die Aminosäure Cys188 (Miyamoto et al. 1992; Okrasa et al. 2008).

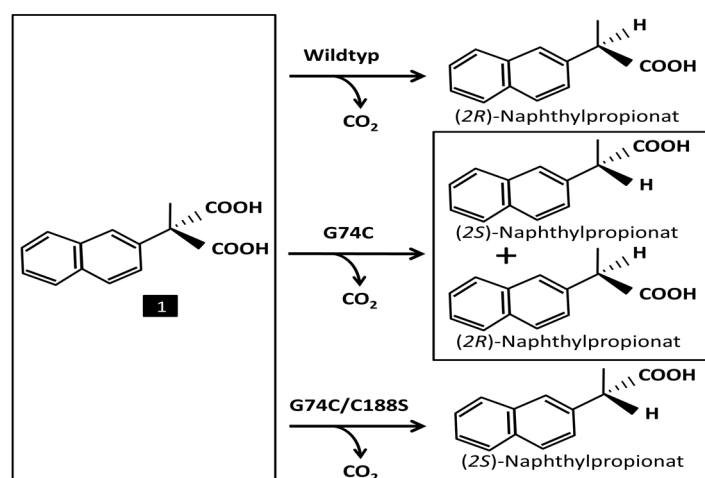


Abbildung 7: Einfluss der Aminosäuren Cys188 und Gly74 auf die Enantioselektivität der AMDasen. α -Methyl- α -Naphthylmalonat wird durch den Wildtyp zu (2R)-Naphthylpropionat umgesetzt. Die G74C-Mutante des Enzyms führt zu einer Racemase-Aktivität und der Produktion eines racemischen Gemisches aus beiden Enantiomeren. Die Doppelmutante G74C/C188S bewirkt eine Inversion der Enantioselektivität.

Die Schlüsselrolle, die das Cys188 bei der enantioselektiven Decarboxylierung spielt, wurde bereits in mehreren Publikationen bestätigt. So führte ein Austausch der Aminosäure mit einem Serin mittels ortsgerichteter Mutagenese zu einem starken Abfall der Enzymaktivität (Miyazaki et al. 1997). Der Austausch der für AMDasen charakteristischen Aminosäure Gly74 mit einem Cystein brachte eine Racemase-Aktivität des Enzyms hervor während die Doppelmutante Gly74Cys/Cys188Ser eine Inversion der Stereoselektivität bewirkte (Abbildung 7) (Ijima et al. 2005; Terao et al. 2006; Obata and Nakasako 2010).

1.2.3 Substratspektrum der AMDasen

AMDasen können eine Vielzahl von Malonsäurederivaten umsetzen. Das natürliche Substrat des Enzyms ist unbekannt, die Struktur gibt jedoch Hinweise auf chemische Verbindungen, deren Umsetzung möglich ist. Bereits 1992 wurde in einer ausführlichen Studie über das Substratspektrum der Arylmalonat-Decarboxylase aus *Bordetella bronchiseptica* der Einfluss einzelner Substituenten auf die Enzymkatalyse beschrieben (Miyamoto and Ohta 1992a). Es wurde gezeigt, dass Elektronen-ziehende Substituenten in *para*-Stellung des Bezolrings die Reaktion beschleunigen, während Elektronen-liefernde Substituenten die Decarboxylierung verlangsamen. Die höchste relative Aktivität lieferten Substrate mit durch Chlor und Fluor *meta*-substituierten Benzolringen. Die katalytische Effizienz α -disubstituierter Malonsäuren war deutlich geringer als die einfach substituierten Verbindungen. Als Grund wurden sterische Effekte vermutet, was spätere Untersuchungen bestätigten (Okrasa et al. 2008; Okrasa et al. 2009; Miyauchi et al. 2011). Die Forscher erkannten bereits zu diesem Zeitpunkt die wichtige Bedeutung der am α -Kohlenstoff substituierten Arylgruppe für den Ablauf der Reaktion. Darüber hinaus wurde berichtet, dass die AMDase eine intramolekulare Aldolreaktion katalysieren kann (Terao et al. 2007). Gerichtete Mutagenese und „Protein Engineering“ führten bereits zu einer Inversion der Enantioselektivität des Enzyms und zur Racemase-Aktivität (Ijima et al. 2005; Terao et al. 2006; Kourist et al. 2011).

1.2.4 AMDasen auf ihrem Weg zu Biokatalysatoren für industrielle Anwendungen

Es ist ein stetiges Bestreben von Unternehmen ihre Produktionskosten zu senken, indem sie z.B. die Effizienz von Herstellungsprozessen optimieren. Dies ist u.a. durch Senkung des Energiebedarfs, gesteigerter Produktionsraten und günstiger Ausgangsmaterialien der Endprodukte möglich. Eine verbesserte Qualität führt zudem zu einer dominanten Marktposition und höheren Gewinnen. Auch umweltschonende Herstellungsprozesse sind

aufgrund verschärfter Umweltschutzauflagen und steigendem Umweltbewußtsein der Verbraucher für Unternehmen interessant (Rückert-John et al. 2013; Küchler-Krischun et al. 2014). Die Nutzung von Enzymen als Biokatalysatoren findet bereits seit Jahrzehnten in der chemischen sowie Lebensmittel- und Pharmaindustrie Anwendung. Enzyme ermöglichen gegenüber der herkömmlichen chemischen Synthese, unerwünschte Reaktionen wie Isomerisierungen, Epimerisierungen und Racemisierungen zu minimieren (Patel 2004). Dies ist eine wichtige Eigenschaft von Biokatalysatoren, da die Notwendigkeit der Produktion von enantiomerenreinen Zwischenprodukten, z.B. zur Herstellung von Medikamenten und Agrarchemikalien immer mehr an Bedeutung zunimmt.

AMDasen besitzen einige Vorzüge, die sie für die Verwendung als Biokatalysatoren attraktiv machen. Ein großer Vorteil dieser Enzyme ist die Kofaktor-unabhängige Katalysereaktion. So bleiben kosten- und zeitaufwendige Regenerierungsschritte erspart. Auch die Robustheit der Enzyme macht sie zu interessanten Kandidaten für die industrielle Nutzung. Die Arylmalonat-Decarboxylase aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 konnte beispielsweise sechs Monate bei 4°C gelagert werden ohne nennenswerte Aktivitätsverluste (Miyamoto and Ohta 1992a). Vor allem aber ihre Fähigkeit zur asymmetrischen Decarboxylierung von α -disubstituierten Arylmalonaten unter Herstellung optisch reiner α -Arylalkansäuren rückte sie in den Fokus der Forschung. Mögliche Anwendung (Miyamoto and Ohta 1992a) könnten diese Verbindungen u.a. bei der Synthese von künstlichen Insektiziden, den Pyrethroiden (Elliott and Janes 1978) und als Material für ferroelektrische Flüssigkeitskristalle (Kusumoto et al. 1990), sowie bei der Produktion von Profenen finden.

Unter Profenen versteht man Derivate der α -Methylpropionsäure, wie z.B. Naproxen, Ibuprofen, Flurbiprofen oder Ketoprofen. Diese Verbindungen zählen zu den nicht-steroidalen, entzündungshemmenden Wirkstoffen (NSAID) und werden zur Behandlung von Fieber, Entzündungen und Schmerzen in optisch reiner Form eingesetzt. Das unerwünschte (*R*)-Enantiomer hat eine deutlich geringere pharmakologische Wirkung und das gesundheitsgefährdende Potential dieses Stereoisomers ist nicht geklärt.

Struktur und Reaktionsmechanismus der AMDasen sind gut untersucht und in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben (siehe 1.2.2). Neben dem Grundverständnis der Abläufe während der Decarboxylierungsreaktion, stand auch bereits die Optimierung des Enzyms für industrielle Anwendungen im Mittelpunkt der Forschung (Abbildung 8).

1992	2005	2006	2011
Wildtyp	G74C/C188S	S36N/G74C/C188S	Y48F/G74C/M159L/C188G
(<i>R</i>)-selektiv	(<i>S</i>)-selektiv	(<i>S</i>)-selektiv	(<i>S</i>)-selektiv
	↓ 750 x	↓ 70 x	↓ 20 x
	↑ 10 x vs. G74C/C188S		↑ 920 x vs. G74C/C188S
			

Abbildung 8: Übersicht über die Optimierung der AMDase aus *Bordetella bronchiseptica*. Aufgeführt sind der Wildtyp (Miyamoto and Ohta 1992a), die verschiedenen Mutationen (Ijima et al. 2005; Terao et al. 2006; Miyauchi et al. 2011) und deren Enantioselektivität bezüglich der Substrate α -Methyl- α -naphthylmalonat (links) und Phenylmalonat (rechts). Das aus der Decarboxylierung des Phenylmalonats entstehende Produkt Phenylacetat ist nicht chiral. Weiterhin sind die Verluste der katalytischen Effizienz (↓) im Vergleich zum Wildtyp angegeben, sowie die Steigerung der Enzymaktivität (katalytische Effizienz) im Vergleich zur G74C/C188S-Variante des Enzyms (↑).

Die erste Herausforderung, die es zu bewältigen galt, war die Umkehrung der Stereokonfiguration des Produkts. Das Wildtypenzym aus *Bordetella bronchiseptica* vermag nämlich nur die (*R*)-Variante des α -Methyl- α -naphthylpropionats aus α -Methyl- α -naphthylmalonat zu bilden (Miyamoto et al. 1992; Miyamoto and Ohta 1992a; Okrasa et al. 2008). Für die Produktion von nicht-steroidalen, entzündungshemmenden Wirkstoffen wird allerdings die pharmakologisch wirksame (*S*)-Form benötigt (Kourist et al. 2011). Ijima et al. gelang 2005, mit der Einführung zweier Mutationen durch ortsspezifische Mutagenese, die Inversion der Enantioselektivität und die Produktion des (*S*)-Enantiomers des α -Methyl- α -naphthylpropionats (Ijima et al. 2005). Dies war ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Verwendung von AMDasen bei Herstellung von NSAIDs. Die Mutationen betrafen die Aminosäuren Cys188 und Gly74. Cys188 ist für die Protonierung des Endiolat-Zwischenproduktes verantwortlich und bedingt die Stereoselektivität des Enzyms (Miyazaki et al. 1997; Miyamoto et al. 2007; Okrasa et al. 2008). Der Austausch der Aminosäure Cys188 durch ein Serin, mit deutlich geringerer Protonen-liefernder Eigenschaft, aber ähnlichem Raumbedarf, führte, wie erwartet, zu einem starken Abfall der AMDase-Aktivität.

Der Austausch der Aminosäure Gly74 durch ein Cystein, wie bei den strukturell und mechanistisch verwandten Asp/Glu-Racemasen, bewirkte auch bei AMDasen eine Racemase-Aktivität. Ermöglicht wird dies durch die nun zwei katalytisch aktiven Cysteine in Position 74 und 188, welche das Zwischenprodukt sowohl von der *Si*- als auch von der *Re*-

Seite protonieren können (Ijima et al. 2005; Obata and Nakasako 2010). Die Beobachtungen der Einfachmutanten C188S und G74C führten zu der Annahme, dass die Kombination beider Aminosäure-Austausche die Inversion der Enantioselektivität der Arylmalonat-Decarboxylase bewirken müsste. Und tatsächlich bildete die Doppelmutante G74C/C188S Produkte, welche eine zum Wildtyp entgegengesetzte Stereokonfiguration aufwiesen (Ijima et al. 2005). Leider blieb die Decarboxylase-Aktivität der Doppelmutante weit hinter dem Wildtyp zurück. Die relative Enzymaktivität war um den Faktor 750 reduziert (Ijima et al. 2005). Die nächste Hürde, die es zu bewältigen galt, war folglich die Verbesserung der Enzymaktivität. Terao et al. schufen 2006 die Dreifachmutante S36N/G74C/C188S. Der Austausch des Serins an Position 36 durch ein Asparagin führte zu einer zehnfach erhöhten Decarboxylase-Aktivität im Vergleich zur Doppelmutante. Weitere Versuche zeigten, dass die Enantiotoposelektivität (in diesem Fall Abspaltung der gleichen Carboxylgruppe aus prochiraler Verbindung) der Dreifachmutante mit der des Wildtyps übereinstimmt, wohingegen die Protonierungsseite des Endiolats verschieden ist und so zu einer entgegengesetzten Stereokonfiguration des Produktes führt (Miyamoto et al. 2007).

Weitere für die industrielle Anwendung interessante Verbindungen sind Produkte der asymmetrischen Decarboxylierung aliphatischer, α -disubstituierter Malonate, welche aber bisher zu diesem Zeitpunkt nicht von AMDasen umgesetzt werden konnten. 2009 gelang es Okrasa et al. jedoch durch strukturgeleitete, gerichtete Evolution Mutanten zu erstellen, welche ein breiteres Spektrum an α -Aryl- und α -Alkenylmalonaten aufwiesen und verbesserte Umsatzraten zeigten (Okrasa et al. 2009). Bioinformatische Analysen des Substrates α -Methyl- α -propylmalonat brachten die Forscher zu der Annahme, die Nichtumsetzung der inerten Verbindungen liege am wahrscheinlichsten in ladungsverändernden Effekten begründet anstatt in sterischen Ursachen. Deshalb wurden Aminosäuren der hydrophoben Bindungstasche als Ziel ausgesucht, deren Austausch einen größeren destabilisierenden Effekt auf die abzusplattende Carboxylgruppe ausüben sollte. So verdoppelte sich die kinetische Effizienz der Decarboxylierung des Substrates 2-(2-Methyl-1-propenyl)methylmalonat durch die Mutante M159V im Vergleich zum Wildtyp, während bei der Verwendung von Phenylmalonat die Aktivität gar um das 50fache gesteigert werden konnte (Okrasa et al. 2009).

Der Ansatz der strukturgeleiteten, gerichteten Evolution führte bei Miyauchi et al. 2011 zu Mutanten, welche die katalytische Aktivität der (S)-selektiven Arylmalonat-Decarboxylase

G74C/C188S unter Verwendung des Substrats Phenylmalonat um das 920fache verbesserten (Abbildung 8). Der Austausch des Serin mit einem Glycin an Position 188 erbrachte eine 5,6fache Steigerung der Enzymaktivität im Vergleich zur Mutante G74C/C188S. Weitere Screening-Schritte konzentrierten sich auf Aminosäuren der hydrophoben Bindungstasche und führten zu den Mutationen Y48F und M159L. Die so entstandene Vierfachmutante Y48F/G74C/M159L/C188G erreicht die bereits erwähnte 920fach erhöhte katalytische Effizienz. Auch Vorstufen des Naproxens konnten mit einer um das 220fach gesteigerten Enzymaktivität und verbesserter Enantioselektivität (>99% *ee*) durch die Mutante G74C/M159L/C188G im Vergleich zur G74C/C188S-Variante umgesetzt werden.

Desweiteren wurde auch die Racemase-Aktivität der Arylmalonat-Decarboxylase näher untersucht und verbessert (Kourist et al. 2011). Die Mutante G74/CV43A zeigte eine gegenüber der Decarboxylierung um das 20fache erhöhte Racemase-Aktivität. Darüber hinaus verfügte die Mutante G74/CV43A über ein erweitertes Substratspektrum im Vergleich zur G74C-Variante und eine 30fach erhöhte Aktivität bei der Umsetzung von Ketoprofen.

Die bisherigen Erfolge bei Optimierung der Arylmalonat-Decarboxylasen für verschiedenste Substrate beweisen eindrucksvoll das Potenzial dieser Enzyme und ihren Nutzen für die umweltschonende, asymmetrische Decarboxylierung disubstituierter α -Aryl- und α -Alkenylmalonate zur Herstellung enantiomerenreiner Produkte (>99% *ee*).

1.3 Protein-Superfamilie Aspartat/Glutamat-Racemasen

Arylmalonat-Decarboxylasen (EC 4.1.1.76) gehören neben Aspartat-Racemasen (EC 5.1.1.13), Glutamat-Racemasen (EC 5.1.1.3), Hydantoin-Racemasen (EC 5.1.99.5) und Maleat-*cis-trans*-Isomerasen (5.2.1.1) zur Superfamilie der Aspartat/Glutamat-Racemasen. Aspartat- und Glutamat-Racemasen katalysieren die Umwandlung von L-Aminosäuren in ihre D-Form, welche als Bestandteil des Peptidoglykans (Bellais et al. 2006; Vollmer et al. 2008) für den Aufbau der bakteriellen Zellwand benötigt werden. Dies macht sie zu interessanten Zielen für antimikrobielle Wirkstoffe (Fisher 2008). Hydantoin-Racemasen setzen D-5-monosubstituiertes Hydantoin in seine L-Form um und werden bereits in der Herstellung von Aminosäuren eingesetzt. Sie sind Teil der als „Hydantoin Prozess“ (Altenbuchner et al. 2001; Clemente-Jiménez et al. 2008) bekannten Reaktionskaskade, bei der D,L-5-monosubstituiertes Hydantoin in enantiomerenreine Aminosäuren umgesetzt werden.

Maleat-Isomerasen katalysieren die *cis-trans*-Isomerisierung von Maleat zu Fumarat während des letzten Schritts des Nikotinabbaus (Kato et al. 1995; Hatakeyama et al. 2000). Die konservierte Struktur der Superfamilie besteht aus zwei pseudosymmetrischen Rossmann-Faltungsdomänen (Hwang et al. 1999; Okrasa et al. 2008; Fisch et al. 2010; Chen et al. 2013) mit jeweils einem katalytisch aktiven Cystein. Bei den Racemasen fungieren sie als Säure/Base-Katalysatoren. Man geht davon aus, dass ein Cystein die Deprotonierung am C α -Atom verursacht und zur Bildung eines planaren Endiolat-Zwischenproduktes führt, während die Protonierung durch das gegenüberliegende Cystein eine Inversion der Konfiguration bewirkt (Hwang et al. 1999; Tanner 2002). AMDasen besitzen jedoch nur ein katalytisch aktives Cystein, was eine asymmetrische Decarboxylierung ermöglicht (Okrasa et al. 2008). Für die Maleat-*cis-trans*-Isomerasen wird ein nukleophiler Angriff des Cys76 vermutet, der zur Bildung eines kovalenten Succinyl-Cysteins als Zwischenprodukt führt und so die katalytische Diversität der Superfamilie erweitert (Fisch et al. 2010; Dokainish et al. 2014). Strukturanalysen verschiedener Glutamat-Racemasen und Arylmalonat-Decarboxylasen zeigten eine Dioxyanion-Höhle als gemeinsames Strukturmotiv zur Bindung von Carboxylatgruppen und zur Stabilisierung des Endiolat-Zwischenproduktes (Okrasa et al. 2008).

1.4 Metagenomik

Wie bereits erwähnt, sind bisher nur wenige Vertreter der Arylmalonat-Decarboxylasen bekannt. Alle fünf Enzyme stammen aus Organismen, welche aus Bodenproben angereichert wurden. Schätzungen zufolge sind aber bis zu 99% der Mikroorganismen in den verschiedensten Lebensräumen nicht kultivierbar (Amann 1995). Bekannt wurde dies unter dem Phänomen der „great plate count anomaly“ (Staley and Konopka 1985). Es beschreibt die große Diskrepanz zwischen der Zahl lebender Zellen einer Probe, zu beobachten unter dem Mikroskop, im Vergleich zu der Zahl kultivierbarer Mikroorganismen auf Agarplatten. Deswegen sollte auf der Suche nach weiteren Arylmalonat-Decarboxylasen auch eine kultivierungsunabhängige Methode genutzt werden. Metagenomik umfasst die funktionelle und sequenzbasierte Analyse des gesamten mikrobiellen Genoms einer Umweltprobe, unabhängig von der Kultivierbarkeit der Organismen. Der metagenomische Ansatz eröffnet somit Einblicke in die genetische Diversität, Populationsstrukturen und in die Ökologie mikrobieller Lebensräume. Das Grundprinzip ist die Isolierung der gesamten genomischen

DNA einer Umweltprobe mittels probenspezifischer Methoden, die Zerlegung der DNA in Fragmente, welche mit Vektoren ligiert werden und die Übertragung in kultivierbare und gut untersuchte Wirtsorganismen (Handelsman et al. 1998; Liebl et al. 2014). Die Idee zur dieser Herangehensweise stammt von Lane (Lane et al. 1985) und wurde erstmals 1991 von Schmidt (Schmidt 1991) umgesetzt. Die stetige Weiterentwicklung von Methoden und Werkzeugen zur Konstruktion und Untersuchung der Metagenombanken, sowie der entstehenden Sequenzdaten (Gabor et al. 2007; Taupp et al. 2011; Kim et al. 2013; Liebl et al. 2014), führte dazu, dass seither eine Vielzahl von Genen entdeckt wurden, welche Proteine kodieren, die für die industrielle Anwendungen interessant und nützlich sein könnten wie z.B. Lipasen und Esterasen, Oxidoreductasen, Stärke modifizierende Enzyme, Proteasen oder Nitrilasen (Schloss and Handelsman 2003; Streit and Schmitz 2004; Steele et al. 2009).

Der AG Streit und der AG Perner stehen eine beträchtliche Zahl an Metagenombanken aus verschiedensten Umweltproben zur Verfügung, z.B. Banken, konstruiert mit DNA, isoliert aus Elefantendung, Sedimenten der Elbe, Gesteinen der Tiefsee oder Heizungswasser. Es sind bereits einige interessante Enzyme durch funktionelle und sequenzbasierte Screenings dieser Metagenombanken entdeckt worden, zu denen u.a. Lipasen, Glykosyltransferasen, Cellulasen, RubisCO und Biofilm hemmende Proteine zählen (Schipper et al. 2009; Bijtenhoorn et al. 2011; Chow et al. 2012; Ilmberger et al. 2012; Rabausch et al. 2013; Böhnke and Perner 2014; Ilmberger et al. 2014).

1.5 Zielstellung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, das Vorkommen und die Verbreitung von Arylmalonat-Decarboxylasen zu untersuchen, von denen zu Beginn dieser Arbeit nur fünf Vertreter mit nachgewiesener AMDase-Aktivität bekannt waren. Dafür sollte sowohl eine Datenbankrecherche durchgeführt werden, als auch funktionelle und sequenzbasierte Screeningmethoden zum Einsatz kommen. Für letzteres sollten die der AG Streit zur Verfügung stehenden (Meta)genombanken genutzt werden. Putative Gene, die für eine Arylmalonat-Decarboxylase kodieren, sollten im Anschluß überexprimiert, gereinigt und biochemisch charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Die Sterilisation von hitzestabilen Lösungen und Geräten erfolgte durch Autoklavieren (20 min, 2 bar, 121°C). Hitzesensitive Lösungen wurden steril filtriert.

2.2 Organismen, Vektoren und Konstrukte

Die während dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Vektoren und Konstrukte, sowie ihre Eigenschaften und Herkunft, sind in nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaft ¹⁾	Referenz/Herkunft
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZ ΔM15)</i> <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland; (Hanahan 1983; Bethesda_Research_Laboratories 1986))
<i>E. coli</i> EPI300	Wirtsstamm für Fosmidbänke <i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1</i> <i>araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK λ-</i> <i>rpsL nupG</i>	Epicentre [®] (Madison, WI, USA)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F⁻, ompT, hsdS B (r_B⁻ m_B⁻) gal, dcm,</i> <i>λDE3</i>	Novagen/Merck (Darmstadt, Deutschland)
<i>Achromobacter</i> sp. HH01	<i>amd</i>	Bodenprobe Botanischer Garten Duisburg, Anreicherungskultur auf Phenylmalonsäure als einziger C- Quelle
<i>Variovorax</i> <i>boronicumulans</i>	Typstamm, DSM-21722	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
<i>Variovorax defluvii</i>	Typstamm, DSM-27259	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
<i>Variovorax dokdonensis</i>	Typstamm, DSM-18312	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
<i>Variovorax ginsengisoli</i>	Typstamm, DSM-25185	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
<i>Variovorax paradoxus</i>	Typstamm, DSM-30034	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
<i>Variovorax soli</i>	Typstamm, DSM-18216	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)

Stamm	Eigenschaft ¹⁾	Referenz/Herkunft
Variovorax sp. HH01	<i>amdA</i>	Bodenprobe Botanischer Garten Duisburg, Anreicherungskultur auf Phenylmalonsäure als einziger C-Quelle, Isolat 15 ²⁽¹⁾ 1
Variovorax sp. HH02	<i>amdV</i>	Bodenprobe Botanischer Garten Duisburg, Anreicherungskultur auf Phenylmalonsäure als einziger C-Quelle, Isolat 14 ²⁽³⁾ 3

¹⁾ Geno- und Phänotypen nach (Bachmann 1983).

Tabelle 2: Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Vektor	Eigenschaften ¹⁾	Größe(kb)	Referenz/Herkunft
pDrive	TA-Klonierungsvektor, <i>oriEc</i> , <i>P_{lac}lacZ</i> , <i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i> , T7-Promotor	3,85	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
pET-21a	Expressionsvektor, <i>lacI</i> , <i>Amp^R</i> , T7- <i>lac</i> -Promotor, Sequenz kodierend für C-terminales His ₆ -Tag und N-terminales T7-Tag	5,44	Novagen/Merck (Darmstadt, Deutschland)
pMCL210	Niedrigkopienvektor, <i>p15A ori</i> , <i>lacZα</i> , <i>cat</i>	2,535	(Nakano et al. 1995)
pCC1fosTM	Fosmidvektor, <i>Chl^R</i> , <i>redF</i> , <i>oriV</i> , <i>ori2</i> , <i>repE</i> , <i>parA</i> , <i>parB</i> , <i>parC</i> , <i>cos</i> , <i>loxP</i> , <i>lacZα</i> , T7 Promotor	8,139	Epicentre [®] (Madison, WI, USA)
pEXA	Klonierungsvektor, <i>Amp^R</i> , <i>P_{lac}lacZ</i> , <i>pUC ori</i>	2,450	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)

¹⁾ Geno- und Phänotypen bezogen auf Angaben der Hersteller

Tabelle 3: Konstrukte, die während dieser Arbeit hergestellt bzw. genutzt wurden

Konstrukt	Vektor	Insertgröße (kb)	Eigenschaften
pMCL210::<i>camdA</i>	pMCL210	3,2	<i>amdA</i> aus <i>Variovorax</i> sp. HH01 mit umliegender Sequenz (Abbildung 17), eingefügt über <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle, Positivkontrolle für Screenings
pET-21a::<i>amdA</i>	pET-21a	0,708	<i>amdA</i> aus <i>Variovorax</i> sp. HH01, eingefügt durch Restriktionsschnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III Sequenz kodierend für C-terminales His ₆ -Tag, <i>Amp^R</i> (Maimanacos 2009)
pET-21a::<i>amdV</i>	pET-21a	0,712	<i>amdV</i> aus <i>Variovorax</i> sp. HH02, eingefügt durch Restriktionsschnittstellen <i>Xho</i> I und <i>Nde</i> I, Sequenz kodierend für C-terminales His ₆ -Tag, <i>Amp^R</i>
pET-21a::<i>amdP</i>	pET-21a	0,745	<i>amdP</i> aus <i>Polymorphum gilvum</i> SL003B-26A1, eingefügt durch Restriktionsschnittstellen <i>Xho</i> I und <i>Nde</i> I, Sequenz kodierend für C-terminales His ₆ -Tag, <i>Amp^R</i>

2.3 Nährmedien und Zusätze

Nährmedien und Zusätze wurden nach der Herstellung sterilisiert (2.1) Nährmedien und Puffer mit Zusätzen wurden bei 4°C gelagert. Bei der Herstellung fester Nährböden wurde der Ansatz zusätzlich mit 1,4 % (w/v) Agar versetzt.

2.3.1 LB-Medium

Komplex-Medium "Lysogeny Broth" (Bertani 2004)

- 1% (w/v) Trypton
- 0,5% (w/v) Hefeextrakt
- 0,5% (w/v) NaCl

2.3.2 Indikatormedium (Horn 2007)

- 0,1% (w/v) KH_2PO_4
- 0,1% (w/v) Hefeextrakt
- 0,2% (w/v) NaCl
- 0,2% (w/v) $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$
- 20 mM Phenylmalonsäure
- 0,005% (w/v) Kresolrot
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Der pH wurde mittels KOH/HCl auf pH 6 eingestellt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca. 50°C, wurden der pH-Indikator Kresolrot (gelöst in 70%igen Ethanol) und Phenylmalonsäure (gelöst in H_2O , pH 6 KOH) durch Sterilfiltrieren hinzugegeben.

2.3.3 Screening-Medium

- 0,02% (w/v) KH_2PO_4
- 0,2% (w/v) NaCl
- 0,2% (w/v) $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$
- 1,4 % (w/v) Agar

Das Medium wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Der pH wurde mit NaOH auf pH 6 eingestellt.

SL8, pH 6,5 (Biebl and Pfenning 1978):	14 mM	EDTA-Na ₂ x H ₂ O
	7,5 mM	FeCl ₂ x H ₂ O
	0,5 mM	ZnCl ₂
	0,5 mM	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	1 mM	H ₃ BO ₃
	0,8 mM	CoCl ₂ x 6 H ₂ O
	0,1 mM	CuCl ₂ x 2 H ₂ O
	0,1 mM	NiCl ₂ x 6 H ₂ O,
	0,15 mM	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
	H ₂ O _{bidest}	

Vitaminlösung: 0,5 % (w/v) Thiaminhydrochlorid
 0,5 % (w/v) Nicotinsäure

Kresolrot: 0,005% (w/v) in 70%igem Ethanol

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca. 50°C, wurden der pH-Indikator Kresolrot (gelöst in 70%igen Ethanol) und 5 mM Phenylmalonsäure (gelöst in H₂O, pH 6 KOH) durch Sterilfiltrieren hinzugegeben, sowie Leucin, MgSO₄, CA [12,5 µg/ml], CaCl₂, CopyControl™ Induction Solution (Tabelle 4), SL8 [0,1 % (v/v)] und eine Vitaminlösung [0,2 % (v/v)].

2.3.4 Zusätze

Tabelle 4: Zusätze, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Zusatz	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/mL]	Arbeitskonzentration [µg/mL]
Ampicillin (Amp)	Ethanol (70%)	100	100
Chloramphenicol (CA)	Ethanol (70%)	50	12,5 bzw. 25
Tetrazyklin (Tet)	Ethanol (70%)	5	5
IPTG	H ₂ O	100	100
X-Gal	DMSO	50	50
L-Arabinose	H ₂ O	1 M	1 mM
CopyControl™ Induction Solution (Epicentre®, Madison, WI, USA)	---	---	siehe Herstellerangaben

Zusatz	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/mL]	Arbeitskonzentration [$\mu\text{g/mL}$]
Leucin	Wasser	10	100
MgSO ₄	Wasser	1 M	1 mM
CaCl ₂	Wasser	1 M	0,5 mM

Die einzelnen Stämme wurden einmal pro Woche auf selektive LB-Agarplatten überimpft und über Nacht bei 30°C (Isolate aus Bodenproben) bzw. 37°C inkubiert. Danach wurden sie mit Parafilm verschlossen und bei 4°C aufbewahrt.

2.4 Anzucht von Flüssigkulturen

Die Anzucht der Organismen im Flüssigmedium erfolgte in LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Konzentration bei der optimalen Wachstumstemperatur des jeweiligen Organismus unter aeroben Bedingungen in Erlenmeyer-Kolben oder Reagenzgläsern. Bei der Inkubation in Erlenmeyer-Kolben wurde maximal 1/3 des Kolbenvolumens als Kulturvolumen verwendet.

2.5 Bestimmung der Zelldichte

Das Wachstum der Kulturen wurde anhand der optischen Dichte (OD) festgestellt. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer (SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, BIO RAD, Hercules, CA, USA) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Ab einer OD von 0,8 wurde die Kultur mit Medium verdünnt. Ein Wert von 0,1 (OD₆₀₀) entspricht für *E. coli* etwa einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml.

2.6 Heterologe Überexpression

IPTG

Stammlösungen: 100 mM

Endkonzentration: 0,1 mM

Flüssigmedien wurden mit einer Übernachtskultur des zu untersuchenden *E. coli* BL21-Klons angeimpft, eine Start-OD₆₀₀ von 0,04 eingestellt und bei 37°C im Erlenmeyer-Kolben aerob inkubiert. Ab einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mM induziert und anschließend für 20h bei 22°C inkubiert.

2.7 Induktion der Fosmid-Klone

Für das HPLC-Screening wurden die Metagenombanken (Mikrotiterplatten) auf Deep Well-Platten (1 mL LB mit Chloramphenicol [12,5 µg/ml] pro Vertiefung) überstempelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein 2 L-Kolben mit 360 ml LB (mit Chloramphenicol [12,5 µg/ml]) befüllt und mit 40 ml der Übernachtskulturen (48er oder 96er Pools) angeimpft. Zur Induktion des Fosmids pCC1fos wurde den Kulturen 400 µl CopyControl™ Induktionslösung (Epicentre, Madison, WI, USA) oder L-Arabinose in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt und erneut 5 h – 6 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Metagenom-Pools abzentrifugiert (15 min, 4°C, 15180 g) und die Zellpellets bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.8 Gewinnung von Zellrohextrakt

Bakterienkulturen wurden für 20 min bei 4°C und 15180 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in einem geringen Volumen Puffer gelöst und die Zellen anschließend mittels French Press aufgeschlossen. Die Zellen wurden dabei einem hohen Druck (6,9 MPa) ausgesetzt, welcher beim schnellen Absinken dazu führte, dass die entstehenden Scherkräfte die Bakterienzellwand zerstörten. Das Gemisch aus gelösten Substanzen und Zelltrümmern wurde aufgefangen und für 30 Minuten bei 4°C und 15180 g zentrifugiert. Der Überstand (Zellrohextrakt) wurde in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt und konnte für weitere Arbeiten verwendet werden.

2.9 Konservierung von Bakterienkulturen

Zur Konservierung von Bakterienkulturen wurden Glycerinkulturen angelegt. Übernachtskulturen der verschiedenen Stämme wurden in sterile Reaktionsgefäße überführt und mit Glycerin in einer Endkonzentration von 30% versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.10 Enzymaktivitätstest in der Küvette

Verwendete Puffer und Lösungen:

Substratlösung, pH 6,5: 20 mM Phenylmalonsäure
 10 mM Tris

Indikatorlösung: 0,5% (w/v) Bromthymolblau
70% Ethanol

In eine Küvette wurden 1 ml Substratlösung, 10 µl Indikatorlösung und 10 µl Rohextrakt gemischt. Als Nullwert diente ein Ansatz mit 10 mM Tris (pH 6,5) anstelle des Rohextraktes. Der Nachweis beruht auf einem pH-Anstieg infolge der Decarboxylierung der Phenylmalonsäure durch die Arylmalonsäuredecarboxylase im Rohextrakt. Der pH-Anstieg konnte durch eine Erhöhung der Absorption bei 600 nm mittels Spektralphotometer (SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, BIO RAD, Hercules, CA, USA) gemessen und durch einen Farbumschlag von grün nach blau beobachtet werden.

2.11 Enzymaktivitätstest mittels Indikatorplatten

Indikatorplatten wurden wie unter 2.3.2 hergestellt. Die Platten enthielten das Substrat Phenylmalonsäure und den pH-Indikator Kresolrot, der eine Alkalisierung des Mediums durch einen Farbumschlag von gelb nach rosafarben sichtbar machte und somit auf eine AMDase-Aktivität hindeutete. Indikatorplatten wurden mit den zu untersuchenden Isolaten beimpft und drei Tage bei 30°C inkubiert, bevor sie ausgewertet wurden. Für das Screening von Metagenombanken wurden Screening-Platten (2.3.3) genutzt. Dazu wurden 48 Einzelkolonien aus einer Mikrotiterplatte der jeweiligen (Meta)genombank auf die Screening-Platten überstempelt. Die Platten wurden 5 Tage bei 37°C und anschließend für 48 Stunden bei 8°C inkubiert. Danach erfolgte die Überprüfung der Screening-Platten auf mögliche rosafarbende Höfe um Einzelkolonien. Als Kontrolle diente der unter 3.4.1 beschriebene Klon EPI300 pMCL210::*camdA*.

2.12 Enzymaktivitätstest mit Hilfe der HPLC

2.12.1 Prinzip der HPLC

HPLC steht für Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie und ist ein Trennverfahren, bei dem Stoffe in einer mobilen (flüssigen) Phase unter hohem Druck über eine stationäre Phase transportiert werden. Der hohe Druck (100-200 bar) ermöglicht eine schnellere und bessere Auftrennung von Substanzen über relativ kurze Säulen im Vergleich zu herkömmlichen Flüssigkeits-Chromatographien. Für die Versuche kam das Verfahren der Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed-Phase-Chromatographie) zum Einsatz, bei der die mobile Phase

polarer ist als die stationäre. Bei der Umkehrphasen-Chromatographie nutzt man die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Substanzen in der mobilen und stationären Phase zur Trennung von unpolaren bis wenig polaren Stoffen.

2.12.2 Aktivitätstest

Für das Screening der Metagenombanken wurden 600 µl Substratlösung (1 mM Substrat, gelöst in 50 mM Puffer) mit 100 µl Rohextrakt versetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die biochemische Charakterisierung erfolgte durch 45-minütige Inkubation von 600 µl Substratlösung (10 mM Substrat in 50 mM Puffer) mit gereinigtem Enzym bei 37°C. Zur Optimierung der Aktivitätstest wurden anfänglich 10 µl der Proteinlösung (250 µg Protein/ml) verwendet und anschließend Proteinkonzentrationen und Volumen an die jeweiligen Enzymaktivitäten angepasst. Als Kontrollen dienten Ansätze mit Substratlösung und Puffer bzw. mit Puffer und Rohextrakt. Die Reaktionen wurde durch Hitzeschock (20 min, 80°C) oder Ansäuerung auf pH 3-4 mit 2M HCL gestoppt.

2.12.3 Probenvorbereitung für die HPLC

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Enzymreaktionen durch Ansäuerung (pH 2-4) mit 2 M HCL (biochemische Charakterisierung) bzw. Hitzeschock (20 min, 80°C, Screening der Metagenombanken) beendet. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 14.100 g zentrifugiert und der Überstand in HPLC-Untersuchungsfläschen überführt. Für das Screening der Metagenombanken wurden die Abnahme des Substrats und die Entstehung des Produkts qualitativ bestimmt. Für die biochemische Charakterisierung der Decarboxylasen wurde die Substratkonzentration der Proben quantifiziert und die Abnahme der Substratkonzentration nach der jeweiligen Inkubationszeit ermittelt. Die Ergebnisse wurden in übersichtlichen Tabellen und Diagrammen dargestellt.

2.12.4 HPLC-Applikation zur Substrat-und Produktdetektion

Für die HPLC wurde eine Anlage der Serie LaChrom Elite® von VWR-Hitachi (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Anlage verfügte über einen Autosampler und DAD-Detektor. Die Auswertung der Messungen wurde mit Hilfe des Programms EZChrom Elite (Version 3.2.1, lizenziert, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Zur Probentrennung wurden RP-18 Säule (LiChroCART 125-3, Puropsher RP-18E und LiChroCART 125-4, Purospher RP-18, VWR International GmbH,

Darmstadt, Deutschland) genutzt und mit 2 μ l (biochemische Charakterisierung) bzw. 50 μ l (Screening der Metagenombanken) Probenvolumen injiziert.

2.12.4.1 Laufbedingungen zur Detektion von Phenylmalonat und Phenylacetat

- konstante Flussgeschwindigkeit: 0,5 ml/min
- Laufmittel: 20 % Methanol und 80% Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,8)
- Isokratisch
- Wellenlänge: 214 nm

2.13 Proteinbestimmung (Bradford 1976)

Verwendete Lösungen:

4xBradford-Lösung: 400 mg Coomassie Blue G-250
200 ml 95% (v/v) Ethanol
400 ml 85% (w/v) H_3PO_4

Die Lösung wurde auf 1 l mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt, filtriert und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die quantitative Proteinbestimmung basiert auf der Methode von Bradford (1976). In diesem Test nutzt man die Interaktion der in phosphorsauren Lösung vorliegenden Anionen des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 mit den positiv geladenen Aminogruppen der Proteine aus. Durch die Bindung an das Protein wird die rotbraune Leuko-Form in die intensiv blau gefärbte Form des Farbstoffes überführt, dessen Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. 750 μ l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und 250 μ l 4x Bradfordlösung wurden in einer Küvette vorgelegt, 10 μ l Probe dazugegeben und vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln wurde der Ansatz erneut gemischt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen. Als Nullwert diente ein Ansatz mit Puffer anstelle der Probe.

Eine direkte Korrelation zwischen Absorption und Proteinkonzentration war nur im Linearitätsbereich der Eichkurve gegeben. Proben, die oberhalb des linearen Bereichs lagen, mussten mit Puffer verdünnt werden. Eine Eichgerade wurde mit Hilfe bekannter Konzentrationen (0,2-1 mg/ml) an BSA erstellt, indem die Absorption bei 595 nm gegen die Proteinkonzentrationen graphisch aufgetragen wurde.

2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine durch Denaturieren und Anlagern negativ geladener SDS-Moleküle in ihre Untereinheiten zerlegt und im elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt. Die Mobilitäten der Proteine im SDS-Gel stehen in Verbindung mit ihrem Molekulargewicht. Die Größenbestimmung der Proteine erfolgte durch den Vergleich mit dem Unstained Protein Marker #SM0661 (Fermentas) oder dem Prestained Protein Marker #SM0671 (Fermentas). Die Gelelektrophorese wurde mit Mini-Gelen (85 x 70 x 1 mm) in entsprechenden vertikalen Gelkammern (Biorad, München, Deutschland) durchgeführt.

2.14.1 Herstellung des SDS-Polyacrylamidgels

verwendete Lösungen:

40% (w/v) Acrylamid-Stammlösung

Trenngel-Stammlösung, pH 8,8: 1,5 M Tris/HCl
 0,4% (w/v) SDS
 ad 250 ml H₂O_{bidest}

Stammgel-Stammlösung, pH 6,8: 0,5 M Tris/HCl
 0,4% (w/v) SDS
 ad 100 ml H₂O_{bidest}

Ammoniumpersulfat: 10 % (w/v) in H₂O_{bidest}

Um eine erhöhte Trennschärfe zu erreichen, wurden Trenn- und Sammelgel mit unterschiedlicher Konzentration verwendet. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Wasser überschichtet, um einen geraden Abschluss zu erhalten. Nach einer Polymerisationszeit von 20 min wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Durch das vorsichtige Einstecken eines Kamms konnten sich Taschen im Sammelgel bilden. Nach weiteren 20 min war das Gel vollständig auspolymerisiert. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Gelen

Lösung	Trenngel (15 %)	Sammelgel (6%)
Acrylamid	3,75 ml	0,6 ml
Trenngel-Stammlösung	2,5 ml	----
Sammelgel-Stammlösung	----	0,96 ml
TEMED	11 µl	2 µl
APS	55 µl	38 µl
H ₂ O _{bidest}	3,75 ml	2,42 ml
Summe	10,066 ml	4,02 ml

2.14.2 Probenvorbereitung

verwendete Puffer:

2xSDS-Probenpuffer: 150 mM Tris/HCl, pH 6,8
 4% (w/v) SDS
 50% (w/v) Glycerin
 0,02% (w/v) Bromphenolblau
 100 mM DTT
 1 mM EDTA
 30 mM NaCl
 ad 10 ml mit H₂O_{bidest}

Probe und 2xSDS-Probenpuffer wurden im Verhältnis 1:1 verdünnt. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und kurz zentrifugiert (2 min, 14.100 g, RT) um eventuell ausgefallenen Substanzen am Boden des Reaktionsgefäßes abzusetzen.

2.14.3 Elektrophorese

verwendete Puffer:

10xSDS-Laufpuffer: 3% (w/v) Tris
 14,4% (w/v) Glycin
 1% (w/v) SDS
 ad 1 l mit H₂O_{bidest}

1xSDS-Laufpuffer: 100 ml 10xSDS-Laufpuffer
ad 1 l mit H₂O_{bidest}

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA pro SDS-Gel bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Stromstärke auf 30 mA pro Gel erhöht. Als Laufpuffer wurde ein Tris/Glycin-Puffer mit SDS verwendet. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Lauffront das Ende des Polyacrylamidgels erreicht hatte.

2.15 Coomassie Blue Färbung

Verwendete Lösungen:

Coomassie Blue Färbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie Blue R-250
40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
ad 1 l mit H₂O_{bidest}

Entfärberlösung: 20% Essigsäure

Nach erfolgter SDS-PAGE (2.14) wurden die SDS-Gele kurz mit Wasser gewaschen und über Nacht in Coomassie Blue Färbelösung geschwenkt. Danach wurde das Gel kurz mit Wasser gespült und zusammen mit Entfärberlösung erneut geschwenkt, bis der Hintergrund des Gels farblos war. Die Entfärberlösung wurde zwischendurch gewechselt und das Gel zur Dokumentation eingescannt. Coomassie-Blue R-250 ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Aminosäureseitenketten von Proteinen lagert und so deren Nachweis ermöglicht.

2.16 Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie

verwendete Puffer und Lösungen:

Ni-NTA Agarose

Waschpuffer, pH 8: 50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
20 mM Imidazol

Elutionspuffer, pH 8: 50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
250 mM Imidazol

Für die Proteinaufreinigung wurde Ni-NTA Agarose der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Ni-NTA Agarose besteht aus Ni-NTA, welche an Sepharose® CL-6B gebunden ist. NTA (Nitrilotriessigsäure) besetzt 4 der 6 Bindungsstellen des Nickels, an die restlichen zwei Bindungsstellen können die Imidazolringe des 6xHis-Tags binden. Auch Imidazol kann an die Ni-NTA-Matrix binden und unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix lösen. Durch geringe Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer können schwache Wechselwirkungen von Proteinen ohne His-Tag unterbrochen werden. Bei höheren Imidazolkonzentrationen werden auch die Proteine mit 6xHis-Tag von der Matrix verdrängt und eluiert.

Für die Proteinaufreinigung wurde Rohextrakt mit 0,25 ml Ni-NTA Agarose pro ml Rohextrakt versetzt und 1h bei 4 °C inkubiert. Das Gemisch wurde auf eine Säule gegeben, wobei die Ni-NTA Agarose in der Säule zurück gehalten wurde. Die Matrix wurde mit 2 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend erfolgte die Elution in 6 Schritten mit jeweils 0,5 ml Elutionspuffer. Der Durchlauf, die Wasch- und die Elutionsschritte wurden auf Eis aufbewahrt und anschließend mittels SDS-PAGE (2.12) überprüft.

2.17 Dialyse

verwendete Lösungen und Materialien:

10 mM EDTA, pH 7,5

SERVAPOR® Dialyseschlauch (SERVA, Heidelberg, Deutschland), Ø 16 mm, MWCO 12000-14000

Die Dialyse dient dazu, den Puffer einer Proteinlösung auszutauschen und niedermolekulare Bestandteile der Lösung zu entfernen. Die Proteinlösung wird in einen Dialyseschlauch gefüllt, der aus einer semipermeablen Membran besteht. Die Porengröße der Membran sorgt dafür, dass größere Bestandteile der Lösung zurückgehalten werden, während niedermolekulare Verbindungen in die Pufferlösung diffundieren.

Nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden die Elutionsschritte, die im SDS-Gel Banden gesuchter Größe aufwiesen, vereinigt und gegen den entsprechenden Puffer dialysiert. Es wurden Dialyseschläuche mit einem Durchmesser von 16 mm verwendet. Die

Schläuche wurden für 10 min in 10 mM EDTA, pH 7,5 aufgekocht und bis zur weiteren Verwendung in 1 mM EDTA, pH 7,5 bei 4°C gelagert. Das Eluat wurde in die Schläuche gefüllt, die Enden der Schläuche wurden umgeschlagen und mit Klemmen verschlossen. Der befüllte Dialyseschlauch wurde in ein Becherglas mit Puffer gelegt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Puffer gewechselt und das Eluat für weitere 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Das Dialysat wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.18 Molekularbiologische Methoden beim Arbeiten mit DNA

2.18.1 Agarose-Gelelektrophorese

verwendete Puffer und Chemikalien:

0,8 %-ige (w/v) Agarose-Lösung mit 1xTAE-Puffer

50xTAE-Puffer: 242 g Tris
 57,1 ml Eisessig
 37,2 g EDTA

Der pH-Wert des Puffers liegt nach dem Ansetzen bei ~ pH 8,5.

1xTAE-Puffer: 20 ml 50x TAE-Puffer
 980 ml H₂O_{bidest}

4xElektrophorese-Ladepuffer: 0,2% (w/v) Saccharose
 0,05% Bromphenolblau
 0,05% Xylencyanol
 20 mM EDTA
 ad 10 ml H₂O_{bidest}

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA (bzw. RNA) Molekülen nach ihrer Größe. In einem elektrischen Feld wandert die in der Summe negativ geladene DNA zur Anode in Abhängigkeit von ihrer Größe und der Porengröße des Agarosegels. Kleinere DNA Moleküle legen in der gleichen Zeit eine größere Wegstrecke in einem Agarosegel zurück als größere. Die Größenbestimmung der Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit einem Standard (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder) der Firma Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Für die Agarose-Gelelektrophorese kamen die Gelkammern „Hoefer™ HE-33 mini horizontal

submarine unit“ der Firma Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA) zum Einsatz. Es wurden 0,8%-ige Agarosegele (w/v) verwendet. Für Fragmente kleiner als 500 bp, kamen 2%-ige Agarosegele (w/v) und der GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) zum Einsatz. Als Laufpuffer diente 1xTAE-Puffer. Die DNA Proben wurden mit 1/4 Volumen Elektrophorese-Ladepuffer vermischt und anschließend vorsichtig in die Geltaschen gegeben. An das Gel wurde für 30 min eine Spannung von 100 Volt angelegt (40 min bei 2%-igen Agarosegelen). Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem 1%-igen Ethidiumbromidbad (w/v) 15 min gefärbt und anschließend 5 min in einem Wasserbad entfärbt. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht ($\lambda=254$ nm) mit einer BIO-RAD Gel Doc XR (München, Deutschland) fotografiert, welche mit der Software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) ausgestattet war.

2.18.2 Isolierung genomischer DNA per Kit

Für die Isolierung genomischer DNA wurde das „peqGOLD Bacterial DNA Kit“ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Für die Gewinnung genomischer DNA aus *Variovorax*-Stämmen wurde allerdings auf die Lysozym-Behandlung verzichtet.

2.18.3 Isolierung genomischer DNA mittels CTAB

verwendete Puffer und Lösungen:

10%	SDS
10 mg/ml	RNase A
10 mg/ml	Proteinase K
5 M	NaCl
10%	CTAB/0,7 M NaCl
Isopropanol (-20°C)	
TE-Puffer (pH8):	10 mM Tris
	1 mM EDTA

Für die Isolierung genomischer DNA aus *Variovorax* sp. HH02 wurden Kulturen (LB, 30°C, aerob) des Stammes in der exponentiellen Wachstumsphase für 15 min auf Eis inkubiert, um den Stoffwechsel der Zellen zu verlangsamen. Dann wurden die Zellen geerntet (4°C, 10 min,

12.000 g), der Überstand verworfen und das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer resuspendiert, so dass sich eine $OD_{600} = 1$ ergab. Nach Zugabe der SDS-Lösung [Endkonzentration 0,5 %] und RNase A [Endkonzentration 0,2 mg/ml] erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei 60°C. Anschließend wurde Proteinase K [Endkonzentration 0,18 mg/ml] hinzugegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit NaCl [Endkonzentration 500 mM] versetzt und gut gemischt. Nun wurde die 65°C warme CTAB/NaCl-Lösung [Endkonzentration 1%] hinzugefügt, die Probe gut durchmischt und für weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Nach der Zugabe von 1/3 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wurde das Reaktionsgefäß mehrfach vorsichtig invertiert und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (12.000 g). Die obere, wässrige, nicht viskose Phase wurde in einen neuen Probenbehälter überführt, mit 1/3 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gemischt und erneut für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (12.000 g). Die wässrige, obere Phase wurde abermals abgenommen, mit einem Volumen Chloroform vorsichtig gemischt und wieder 10 min bei Raumtemperatur und 12.000 g zentrifugiert, um evt. Phenolreste zu entfernen. Die obere Phase wurde erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 0,8 Vol Isopropanol und 1/50 Vol 5 M NaCl gemischt und nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min bei 12.000 g zentrifugiert, das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend wieder 5 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das Pellet vollständig bei Raumtemperatur getrocknet und über Nacht bei 8°C in 100 µl – 500 µl TE-Puffer resuspendiert. Zur Kontrolle wurden 1 µl – 2 µl der DNA-Lösung mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.18.1) überprüft.

2.18.4 Plasmidisolierung hochwertiger DNA

Zur Isolierung von Vektor-DNA für Sequenzierungen wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Plasmidtragende *E. coli*-Zellen wurden über Nacht bei 37°C aerob inkubiert. Anschließend wurde nach dem Protokoll „Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge“ verfahren.

2.18.5 Plasmidisolierung durch Alkalische Lyse (Birnboim and Doly 1979)

verwendete Puffer und Chemikalien:

P1-Puffer: 50 mM Tris-HCl
10 mM EDTA
H₂O_{bidest} ad 100 ml

Es wurde ein pH-Wert von 8 eingestellt. Direkt vor der Nutzung wurde RNase A in einer Endkonzentration von 1 mg/ml hinzugefügt.

P2-Puffer: 200 mM NaOH
1% (w/v) SDS
H₂O_{bidest} ad 200 ml

P3-Puffer: 3 M K-Acetat
H₂O_{bidest} ad 200 ml

Es wurde ein pH-Wert von 5,5 mit Essigsäure eingestellt.

Alle Lösungen wurden sterilfiltriert.

1 ml-3 ml einer Übernachtskultur wurden 2 min bei 14.100 g zentrifugiert und der Übertsand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl P2-Puffer hinzugefügt und das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert bis die Zellsuspension aufklarte. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und 150 µl P3-Puffer wurde erneut mehrfach geschwenkt. Der Ansatz wurde 2 min bei 14.100 g zentrifugiert, die obere Phase (400 µl) in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, mit eiskaltem, 96%-igem Ethanol versetzt und 30 min bei -20°C oder 10 min bei -70°C inkubiert. Die gefällte Plasmid-DNA wurde für 20 min bei 4°C und 15700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet zweimal mit 0,5 ml eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 4°C 15700 g) wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet bei 50°C getrocknet und in 20 µl -50 µl sterilem H₂O_{bidest} resuspendiert.

2.18.6 Gelextraktion

Zur Extraktion von PCR-Produkten oder Fragmenten von Restriktionsansätzen aus Agarosegelen wurde das „Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit“ (Avegene life science, Taipei, Taiwan, China) verwendet und das Protokoll gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden in 20 µl bis 50 µl sterilem H₂O_{bidest} resuspendiert.

2.18.7 Reinigung und Konzentration von DNA

Die Reinigung von DNA erfolgte mittels „Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit“ (Avegene life science, Taipei, Taiwan, China). Dabei kam das Protokoll „PCR cleanup“ zur Anwendung. Die Elution erfolgte mit sterilem H_2O_{bidest} (70°C, 20 µl – 50 µl). Die Konzentration kleiner Volumina DNA wurde in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vorgenommen. Zeit und Temperatur richteten sich nach Volumen und DNA-Konzentration.

2.18.8 Analyse der DNA-Konzentration und Reinheit

Die Bestimmung der Quantität und Reinheit der DNA erfolgte photometrisch (SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, BIO RAD, Hercules, CA, USA) unter Verwendung einer UV-Küvette (Plastibrand®, Brand, Wertheim, Deutschland) bei 260 nm gegen H_2O_{bidest} . Für die Messung wurden 2 µl DNA-Lösung in 68 µl H_2O_{bidest} verdünnt. Bei Bedarf wurde der Verdünnungsfaktor angepasst und die Messung wiederholt. Die Reinheit der DNA ergab sich aus dem Quotienten $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, der im Bereich 1,8 bis 2,0 liegen sollte (Sambrook and Russel 2001).

2.18.9 Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Restriktionsendonucleasen erkennen und spalten enzymspezifische, palindromische Sequenzen von vier bis acht Nukleotiden Länge in doppeltsträngiger DNA. Dies ermöglicht die gezielte Herstellung von DNA-Fragmenten mit glatten oder überlappenden Enden, welche für analytische Zwecke oder weitere Klonierungsschritte genutzt werden können.

Für den Vreau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurden, abhängig vom weiteren Verwendungszweck, Restriktionsansätze nach folgendem Schema (Tabelle 6) angesetzt:

Tabelle 6: Zusammensetzung von Restriktionsansätzen

	Analytischer Ansatz	Präparativer Ansatz
DNA	0,4-1 µg	4-10 µg
Restriktionsenzym [10 U/µl]	0,5 µl	2 µl
10 x Restriktionspuffer	1 µl	10 µl
steriles H_2O_{bidest}	ad 10 µl	ad 100 µl

Es kamen ausschließlich Typ II-Restriktionsendonucleasen und die dazugehörigen Puffer der Firma Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) zum Einsatz. Reaktionstemperatur, Dauer des

Verdaus und evt. Inaktivierung der Ansätze richteten sich nach Empfehlungen des Herstellers, sowie eingesetzten DNA-Mengen und Verwendungszweck.

2.18.10 Ligation von DNA

2.18.10.1 Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pDrive

DNA-Fragmente, amplifiziert mittels *Taq*-Polymerase, wurden mit den Klonierungsvektor pDrive (Tabelle 2) nach Angaben des Herstellers („PCR cloning kit“, QIAGEN, Hilden, Deutschland) ligiert:

2 µl	gereinigtes Insert
0,5 µl	pDrive
2,5 µl	Master Mix

Die Ligation erfolgte bei 16°C für 2 Stunden oder über Nacht.

Der pDrive-Vektor liegt in linearisierter Form mit U-Überhängen vor und kann mit PCR-Produkten mit A-Überhängen, entstanden durch die Verwendung einer *Taq*-Polymerase, ligiert werden. Die Plasmide wurden anschließend in chemokompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert (2.18.12).

2.18.10.2 Ligation von DNA in ein restringiertes Plasmid

Die Ligation von DNA in ein restringiertes Plasmid mit überlappenden Enden erfolgte mittel T4 DNA-Ligase der Firma Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) nach Angaben des Herstellers.

20-100 ng	linearisierte Vektor-DNA
1:1 bis 5:1	Verhältnis Insert-DNA zu Vektor
2µl	10x T4 DNA-Ligase-Puffer
1 u	T4 DNA-Ligase
ad 20 µl	H ₂ O _{bidest}

Die Inkubation erfolgte 1 h bei 22°C oder über Nacht bei 16°C.

2.18.11 Herstellung chemisch kompetenten Zellen verschiedener *E. coli*-Stämme

TFB1-Puffer: 100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
30 mM Kaliumacetat
10 mM CaCl₂
15% Glycerin
H₂O_{bidest} ad 100 ml

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt, die Lösung wurde steril filtriert.

TFB2-Puffer: 10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15% Glycerin
ad 20 ml mit H₂O_{bidest}

Der pH-Wert wurde mit KOH auf pH 6,8 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des jeweiligen *E. coli*-Stammes inokuliert und aerob bei 37°C über Nacht inkubiert. 250 ml vorgewärmtes LB-Medium wurden mit der Übernachtskultur 1%-ig angeimpft und aerob bei 37 °C für 90-120 min inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Die Kultur wurde für 5 min auf Eis gekühlt und anschließend in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt. Die Zellen wurden bei 4°C und 4000 g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, während das Pellet stets auf Eis gekühlt wurde. Die Zellen wurden in 75 ml und 4 °C kalten TFB1-Puffer resuspendiert und die Suspension in sterile Falcon-Gefäße überführt. Die Zellen wurden für 90 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 4°C und 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in jeweils 5 ml kaltem TBF2-Puffer resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen zu Aliquots von 100 µl in Reaktionsgefäße gefüllt und bei -70 °C gelagert.

2.18.12 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden bei -70°C gelagerte, kompetente Zellen des jeweiligen *E. coli*-Stammes verwendet. Kurz vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen (100 µl) für 5 min auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurden 5 µl des Ligationsansatzes

hinzugegeben und für 30 min erschütterungsfrei auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C. Der Transformationsansatz wurde anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Nach drei Minuten wurden 0,8 ml kaltes LB-Medium zugegeben und für 45 min bei 37°C aerob inkubiert. Unterschiedliche Volumina (50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl) des Transformationsansatzes wurden auf selektiven LB-Agar-Platten (2.3) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.18.13 Blau-Weiß-Screening

E. coli-Stämme mit einer Deletion des *lacZ* Gens können keine aktive β -Galactosidase bilden, sondern nur die C-terminale ω -Untereinheit des Enzyms. Plasmide, die für ein Blau-Weiß-Screening genutzt werden können, kodieren die N-terminale α -Untereinheit des Enzyms, welche eine MSC enthält. Für das Screening werden diese Plasmide, nach erfolgter Ligation mit einem Insert, in einen geeigneten *E. coli*-Stamm transformiert und auf selektiven Agarplatten mit dem Induktor IPTG und dem artifiziellen Glycosid X-Gal ausplattiert. Klone mit Plasmiden ohne Insert bilden beide Untereinheiten und somit eine aktive β -Galactosidase. Die intakte β -Galactosidase spaltet das chromogene X-Gal und die anschließende Oxidation durch den Sauerstoff der Luft führt zur Bildung eines blauen Farbstoffs. Klone mit Insert tragendem Plasmid können kein aktives Enzym produzieren und bilden folglich weiße Kolonien.

2.18.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können ausgewählte DNA-Bereiche amplifiziert werden. Zunächst wird die DNA durch Erhitzen denaturiert und liegt einzelsträngig vor. Oligonukleotidprimer binden an komplementäre Basensequenzen der DNA-Matrize (Annealing) und werden in Anwesenheit von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) durch eine DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Für die meisten Zwecke wurde die im Rahmen der Praktika der Mikrobiologie-Abteilung selbsthergestellte *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Die *Taq*-Polymerase besitzt keine Korrekturlesefunktion und arbeitet mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 min/kb. Für 16S rRNA-Genamplifikationen wurde die *Taq*-Polymerase der Firma Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) genutzt. Die zum Einsatz gekommenen Primer sind in Tabelle 7 aufgeführt. Für einen PCR-Ansatz (25 µl) wurden, wenn nicht anders beschrieben,

2,5 µl 10xTaq-Puffer
 0,25 µl Forward-Primer (5 µM)
 0,25 µl Reverse-Primer (5 µM)
 0,25 µl dNTPs (10 mM)
 0,5 µl DNA-Matrize
 1,25 µl DMSO
 0,25 µl *Taq*-Polymerase

auf Eis pipettiert und auf 25 µl mit sterilem H₂O_{bidest.} aufgefüllt. Die DNA wurden in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) nach folgendem Programm amplifiziert:

- (1) 95°C 3 min
- (2) 95 °C 35 s
- (3) x°C 35 s
- (4) 72°C x min
- (5) 34malige Wiederholung der Schritte (2)-(4)
- (6) 72°C x min

Tabelle 7: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Primer	Nr.	Sequenz (5'→3')	Länge [bp]	GC- Gehalt[%]	T _m [°C]	Ursprung
616V	1	AGAGTTTGATYMT GGCTCAG	20	40	55	<i>E. coli</i> 16S rDNA, Positionen 8 bis 27 (Brosius et al. 1981)
1492R	2	CGGYTACCTTGTT ACGAC	18	50	55	(Lane 1991)
M13-20 for	3	GTAAAACGACGG CCAGT	17	53	59	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
M13 rev	4	CAGGAAACAGCT ATGACC	18	50	56	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Variovorax_for	5	CACCTCGCTGAGC TTCTTTC	20	55	59,3	diese Arbeit
Variovorax_2for	6	GCACCTCGCTGAG CTTC	17	65	57,6	diese Arbeit
Variovorax_rev	7	GCACGAGATGAG GATGCC	18	61	58,2	diese Arbeit
Variovorax_p_rev	8	CCGCACGAGATG AGGAGG	18	67	60,5	diese Arbeit

Primer	Nr.	Sequenz (5'→3')	Länge [bp]	GC- Gehalt[%]	T _m [°C]	Ursprung
Bordetella_for	9	ATGGGCACCTCGC TCAGC	18	67	60,5	diese Arbeit
Bordetella_rev	10	GCCGCAAGACAG CAGGATG	19	63	61	diese Arbeit
Alcaligenes_for	11	GGGACCTCACTGA GCTTTTACC	22	55	62,1	diese Arbeit
Alcaligenes_rev	12	GCAAGACAGCAG CAGACC	18	61	58,2	diese Arbeit
Mesorhizobium_for	13	GGAACATCGCTCA GCTTCTTCC	22	55	62,1	diese Arbeit
Mesorhizobium_rev	14	GCAGGAAATCAA GACGGCGTCTG	22	59	64	diese Arbeit
Mesorhizobium_2rev	15	CCCGCAGGAAATC AAGACG	19	58	58,8	diese Arbeit
Amorphus_for	16	GGGACGTCGCTCA GCTTC	18	67	60,5	diese Arbeit
Amorphus_rev	17	CGCCGCAGGAAA TCAGAAG	19	58	58,8	diese Arbeit
Pseudomonas_for	18	ACCTCGCTGAGCT TCTACC	19	58	58,8	diese Arbeit
Pseudomonas_rev	19	CGCCGCAGGACAT GAAC	17	65	57,6	diese Arbeit
Polymorphum_for	20	ACATCGCTGAGCT TCTACC	21	57	61,8	diese Arbeit
Polymorphum_rev	21	CCGCAGGAGACC AGCAG	17	71	60	diese Arbeit
cADPK_Bam_for	22	GGATCCGCGTCAT TCCACGAAAGG	24	58	69	diese Arbeit
cADPK-Bam-rev	23	GGATCCAGCAGG TGCTGGTGGAGA AC	26	61,5	69,5	diese Arbeit
T7 Promoter Primer	24	TAATACGACTCAC TATAGGG	20	40	54	Epicentre® (Madison, WI, USA)
pCC1™ Reverse Sequencing Primer	25	CTCGTATGTTGTG TGGAATTGTGAGC	26	46	66	Epicentre® (Madison, WI, USA)
amd_for	26	ATGGGCACCTCGC TGAGCTTC	21	61	69	diese Arbeit
Sc_VHH01_rev	27	CCGCACGAGATG AGGATGCCG	21	66	69	diese Arbeit

2.18.14.1 PCR-Screening

Für das PCR-Screening der Isolate der Bodenprobe wurde standardmäßig 1 ml einer Übernachtskultur geerntet (5 min, 14.100 g), in 2 ml sterilem Wasser gelöst und 10 min bei 95°C inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (15 min, 9650 g) und der Überstand für die PCR-Reaktion verwendet. Die Klone der Genombank des Isolates *Variovorax* sp. HH02 wurden in DeepWell-Platten überstempelt (1 ml LB-Chloramphenicol [12,5 µg/ml]), induziert mittels CopyControl™ Induction Solution (Epicentre, Madison, WI, USA) und über Nacht bei 37°C aerob inkubiert. Abhängig von der Poolgröße wurde ein bestimmtes Volumen pro Well abgenommen und mit weiteren Klonen vereinigt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (5 min, 14.100 g), der Überstand verworfen und das Zellpellet in Wasser oder TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation bei 95°C wurde die Probe erneut zentrifugiert und der Überstand als DNA-Matrize (0,5 µl-4 µl) eingesetzt. Die Annealingtemperatur betrug 59°C bei einer Elongationszeit von 30 sec. Die Versuchsbedingungen wurden, wenn nötig, in einzelnen Experimenten leicht abgewandelt.

2.18.14.2 Kolonie-PCR

Kolonie-PCRs wurden genutzt, um zu überprüfen, ob Klone Plasmide mit der korrekten Insertgröße enthielten.

Eine kleine Menge Zellmaterial einer Bakterienkolonie wurde in 20 µl sterilem H₂O_{bidest} suspendiert und 2 µl der Zellsuspension als DNA-Matrize für die PCR verwendet. Der restliche Ansatz entsprach der unter 2.18.14 beschriebenen Zusammensetzung. Zum Aufschließen der Zellen wurde der erste Reaktionsschritt auf 10 min verlängert. Primer wurden abhängig vom verwendeten Plasmid gewählt.

2.18.14.3 Reinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.18.1) größenabhängig aufgetrennt und anschließend aus dem Gel ausgeschnitten. Die Reinigung erfolgte mittels „Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit“ (Avegene life science, Taipei, Taiwan, China) nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden in 20 µl -50 µl sterilem H₂O_{bidest} gelöst.

2.18.15 Fällung von DNA

Für die Fällung von DNA wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen an Chloroform versetzt und gemischt, bis eine weiße Emulsion entstand. Anschließend wurde die Probe für

5 min bei 14.000 g zentrifugiert und die obere, wäßrige Phase in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 2,5 Vol eiskaltem Ethanol (96%) wurde der Ansatz für 10 min bei -70°C gelagert und danach für 20 min bei 15700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal in 70%-igem Ethanol gewaschen. Die Trocknung des Pellets wurde in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vorgenommen (10 min, 65°C). Das Pellet wurde anschließend in 20 µl – 50 µl sterilem H₂O_{bidest} gelöst und bis zur weiteren Verwendung der DNA bei -20°C gelagert.

2.18.16 Konstruktion einer Genombank

Zur Herstellung einer Genombank aus genomischer DNA (2.18.3) des Isolates *Variovorax* sp. HH02 (14²(3)) wurde das CopyControl™ Fosmid Library Production Kit™ der Firma Epicentre® (Madison, WI, USA) genutzt und das Protokoll entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde jedoch auf den Schritt der DNA-Scherung verzichtet und gleich DNA der Größe von etwa 40 kb aus einem LMP-Agarosegel (LMP steht für „low melting point“, Agarose mit einer geringen Schmelztemperatur) nach erfolgter Elektrophorese ausgeschnitten und für den „End-repair“ mit nachfolgender Dialyse genutzt. Zur Kontrolle der hergestellten Fosmidklone wurden 12 zufällig ausgewählte Klone von verschiedenen Platten mittels Restriktion (*Bam*HI und *Hind*III) auf das Vorhandensein eines Inserts überprüft (2.18.9). Bei drei Klone wurden die Insertenden ansequenziert (2.18.17.1, Primer 24 und 25), um eine Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen. Zur Feststellung der durchschnittlichen Insertgröße wurden 5 Klone mit den Enzymen *Hind*III, *Nde*I, *Xho*I und *Eco*RI verdaut (2.18.9) und aus den Schnittmustern die Insertgrößen bestimmt. Nach erfolgreicher Prüfung der Qualität der Bank, wurden weitere Klone in Mikrotiterplatten mit 100 µl LB-Chloramphenicol [12,5 µg/ml] pro Well überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit 100 µl 86%-igem Glycerin versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.18.17 Sequenzierung

2.18.17.1 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden

Die Sequenzierung wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schreiber am Institut für klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt. Dabei kam das Sequenziergerät *ABI 3730XL DNA Analyzer* (Applied Biosystems) zum Einsatz.

Pro Reaktion wurden 3 µl gereinigtes Plasmid mit einer DNA-Konzentration von 100 ng/µl und 1 µl Primer mit einer DNA-Konzentration von 4,8 pmol/µl eingesetzt. Für die Auswertung und Editierung der erhaltenen Sequenzen wurden die Software-Programme *Chromas Lite* (Technelysium Pty Ltd) und Clone Manager Suite 9 (SciCentral Software, lizenziert) verwendet.

Desweiteren bestand die Möglichkeit, Proben über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenzieren zu lassen. Die Zusammensetzung der Proben richtete sich nach den Anweisungen, zugänglich auf der Homepage der Firma (<http://www.eurofinsgenomics.eu/>).

2.18.17.2 Illumina-Sequenzierung

Illumina-Sequenzierung gehört zu den sogenannten „high-throughput next generation sequencing“-Methoden (Pareek et al. 2011) und ermöglicht die Generierung einer großen Zahl an Sequenzdaten in kurzer Zeit. So kann das Genome Analyzer_{IIIX}-System für einen 2x100 bp-Lauf bis zu 6,5 Gb Daten pro Tag produzieren (Specification Sheet: Illumina® Sequencing).

Für die Sequenzierung werden zufällig gebildete DNA-Fragmente an spezielle Adapter gebunden und als Einzelstrang auf der Oberfläche einer Flusszelle befestigt. Nach einer Festphasen-Amplifikation entstehen bis zu 1000 Kopien jeder DNA-Matrize in unmittelbarer Nähe. Für die Sequenzierung werden vier fluoreszenzmarkierten dNTPS parallel genutzt. So kann für jeden Cluster die Position einer Nukleotidbase pro Zyklus festgestellt werden (Technology Spotlight: Illumina® Sequencing).

Die Illumina-GAii-Sequenzierung der Proben der Isolate *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02 wurde durch Dr. Anja Pöhlein und Mitarbeiter (G2L, Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland) vorgenommen. Sequenzdaten wurden anschließend auf der IMG Plattform (Markowitz, 2014) zur Verfügung gestellt. Die Assemblierung der Daten erfolgt mittels SPAdes und ergab 6.525.159 Basen (*Variovorax* sp. HH01) bzw. 7.152.209 Basen (*Variovorax* sp. HH02).

2.18.18 Bioinformatische Analyse

Zur Bearbeitung und Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden folgende Programme und Datenbanken verwendet:

2.18.18.1 Programme

- BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)
- Clone Manager Suite 9 (SciCentral Software, lizenziert)
- *Chromas Lite* (Technelysium Pty Ltd)
- Quantity One (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland)
- Staden Package mit Pregap und Gap4 (<http://staden.sourceforge.net/>)
- SeaView 4.5.1 und 4.3.4 (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>) (Gouy et al. 2010)

2.18.18.2 Datenbanken

- BRENDA Enzyme database (<http://www.brenda-enzymes.info/>)
- ClustalW2 multiple alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)
- IMG (integrated microbial genomes; <https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/er/main.cgi>)
- NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- BLAST Alignment tools (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- GenBank® Sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)
- RCSB PDB (Protein Data Base; <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do>)
- UniProt (Swiss-Prot and TrEMBL, <http://www.uniprot.org/>)

3 Ergebnisse

Arylmalonat-Decarboxylasen gehören zur Superfamilie der Aspartat-Glutamat-Racemasen und können α -disubstituierte Malonsäure-Derivate zu homochiralen Produkten umsetzen. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es nur vier bekannte Enzyme mit nachgewiesener AMDase-Aktivität und eine Vielzahl von putativen Genen, deren korrekte Annotation experimentell nicht belegt ist.

Ziel der Arbeit war es, das Vorkommen und die Verbreitung der bisher wenig bekannten Arylmalonat-Decarboxylasen näher zu untersuchen. Dafür wurden Isolate aus Bodenproben, die auf Phenylmalonsäure als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnten, auf ihre AMDase-Aktivität untersucht und näher charakterisiert. Darüber hinaus wurden anhand von konservierten Sequenzmotiven Datenbanken nach weiteren Enzymen durchsucht, um einen Einblick in das Vorkommen und die Verbreitung von Arylmalonat-Decarboxylasen zu erhalten. Zwei putative *amd*-Gene aus *Variovorax* sp. HH02 und *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 wurden heterolog exprimiert, die Proteine gereinigt und biochemisch charakterisiert.

Desweiteren wurde ein Großteil der Genome der Isolate *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02 mittels Illumina-Sequenzierung erschlossen und die Sequenzdaten ausgewertet.

3.1 Sequenzbasiertes Suche nach AMDasen in Datenbanken

3.1.1 Erstellung einer 12-Punkte-Liste zur Sequenzbasierten Suche nach AMDasen in Datenbanken

Um mehr über das Vorkommen und die Verbreitung von AMDasen und ihren kodierenden Genen zu erfahren, wurden mit Hilfe der bis dahin veröffentlichten Fachliteratur einige Suchkriterien für putative AMDasen zusammengestellt. Ziel war es, anhand einer einfachen Kontrollliste Sequenzübereinstimmungen besser bewerten und so eine sichere Vorhersage über die AMDase-Aktivität von Proteinen machen zu können. Für das Aminosäuresequenz-Alignment (Abbildung 9) wurden Enzyme ausgewählt, die (i) eine nachgewiesene AMDase-Aktivität in der Größenordnung des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 besaßen und (ii) sowohl Phenylmalonat, als auch komplexere, prochirale Substrate umsetzen konnten. Es wurden die charakterisierten Proteine aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201,

Achromobacter sp. KU1311, *Enterobacter cloacae* KU1313, *Chelativorans* sp. BNC1 und *Variovorax* sp. HH01 (unveröffentlichte Daten) zur Erstellung des Alignments genutzt und die für den postulierten Reaktionsmechanismus (Okrasa et al. 2008) entscheidenden Aminosäuren markiert (Abbildung 9).

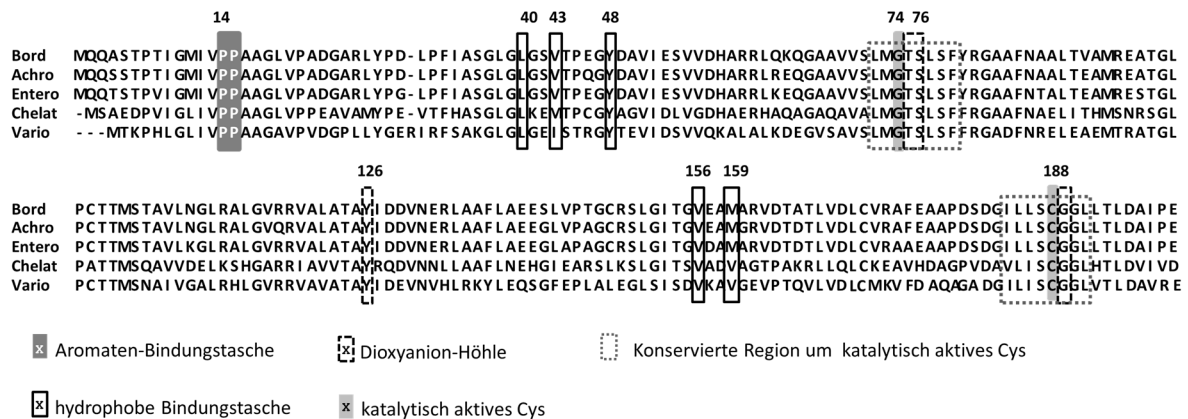


Abbildung 9: 12-Punkte-Identifikation von AMDasen. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines Aminosäuresequenz-Alignments charakterisierter AMDasen aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201, *Achromobacter* sp. KU1311, *Enterobacter cloacae* KU1313, *Chelativorans* sp. BNC1 und *Variovorax* sp. HH01. Hervorgehoben wurden Aminosäuren und Sequenzbereiche, die für die katalytische Reaktion entscheidend sein sollen (siehe Legende in Abb.). Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Aminosäuresequenz des Organismus *Bordetella bronchiseptica* KU1201. Das katalytisch aktive Cystein an Position 74 in Racemasen ist bei AMDasen durch ein Glycin ersetzt. Das Alignment wurde mittels ClustalW2 erstellt. Die Sequenzmerkmale (siehe auch Tabelle 8) wurden für die Identifizierung weiterer putativer AMDasen in diversen Datenbanken (2.18.18.2) und Metagenomsequenzen der AG Streit genutzt.

Markierten Aminosäuren und konservierten Bereiche wurden als Identifizierungsmerkmale für weitere AMDasen genutzt und leiten sich aus dem bereits gut untersuchten Reaktionsmechanismus der Arylmalonat-Decarboxylasen ab (Matoishi et al. 2004; Okrasa et al. 2008; Okrasa et al. 2009). Für die katalytische Reaktion entscheidende Aminosäuren sind Thr75, Ser76 und Tyr126 und Glyc189 der Dioxyanion-Höhle, Pro14 und Pro15 der Aromaten-Bindungstasche, Cys188 zur Protonierung des postulierten Endiolat-Zwischenproduktes und Leu40, Val43, Tyr48, Val156 und Met159 als Bausteine der hydrophoben Bindungstasche. Gly74 ist eine entscheidende Aminosäure bei der Differenzierung zwischen Decarboxylasen und strukturell und mechanistisch verwandten Aspartat- und Glutamat-Racemasen, die an dieser Stelle ein zweites katalytisch aktives Cystein besitzen, welches die Racemase-Aktivität ermöglicht. So ist die Enzymvariante G74C nicht in der Lage eine enantioselektive Decarboxylierung zu katalysieren und bildet racemische Arylpropionate bei der Zugabe von Arylmalonaten als Substrate (Terao et al. 2006). Desweiteren wurde auf die konservierten Sequenzmotive LMGTSLSF und ILLSCGGL geachtet, die sich im aktiven Zentrum befinden und das katalytisch aktive Cys188, sowie das

für die enantioselektive Decarboxylierung notwendige Gly74 einschließen. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Aminosäuresequenz der ersten beschriebenen AMDase aus *Bordetella bronchiseptica* (Miyamoto and Ohta 1992a).

Tabelle 8: Auflistung der 12 Suchkriterien zur Identifizierung von AMDasen in Datenbanken.

Nr.	Suchkriterium	Bedeutung
1	P14 P15	Bildung der Aromaten-Bindungstasche
2	Thr75 Ser76	Bildung der Dioxyanion-Höhle
3	Tyr126	
4	Glyc189	
5	Leu40	
6	Val43	Bausteine der hydrophoben Bindungstasche
7	Tyr48	
8	Val156	
9	Met159	
10	Gly74	charakteristisch für Decarboxylasen anstelle des zweiten aktiven Cysteins der Racemasen
	Cys188	Protonierung des postulierten Endiolat-Zwischenproduktes
11	LMGTSLSF	konservierte Sequenzmotive im aktiven Zentrum
12	ILLSCGGL	

Nur Proteine, die alle in Tabelle 8 aufgeführten 12 Kriterien erfüllten und identische Aminosäuren bzw. Aminosäuren mit ähnlichen chemisch Eigenschaften besaßen, wurden als putative Arylmalonat-Decarboxylasen berücksichtigt. Eine intensive Datenbankrecherche (2.18.18.2), unter Anwendung der Suchkriterien, brachte zu diesem Zeitpunkt sechs weitere putative AMDasen zum Vorschein (Abbildung 10).

Bordetella	I GMI VPPAAGLV PADGARLY - PDLPF I ASGLGLGSVTP EGYDAVI ES VVDHARRL QKQGAADVSLMGTSL SFYRGAAFNAAI TVAMREATGLPCTTMTSTA
Vario_HH01	LGLI VPPAAGAVPVDGPLYGERI RFSAKGLGLGEI STRGYTEVI DS VVQKAL ALKDEGVS AVSLMGTSL SFYRGADFNREL EAMET RATGLPCTTMTSTA
Vario_para	LGLI VPPAAGAVPVDGPLYGERI RFSARGLGLGEI STRGYTEVI DS VVQKAL ELKAE GASAVSLMGTSL SFYRGAAFNAAI TVAMREATGLPCTTMTSTA
Chelativorans	I GMI VPPAAGLV PADGARLY - PDLPF I ASGLGLGSVTP EGYDAVI ES VVDHARRL QKQGAADVSLMGTSL SFYRGAAFNAAI TVAMREATGLPCTTMTSTA
Enterobacter	I GMI VPPAAGLV PADGARLY - PDLPF I ASGLGLGSVTP EGYDAVI ES VVDHARRL QKQGAADVSLMGTSL SFYRGAAFNAAI TVAMREATGLPCTTMTSTA
Alcaligenes	LGLI VPPAAGLV PEPGEMYPE - I DFI AQGLALSSVDK EGYDQVI DQVDAQK LAARGA QAVSLMGTSL SFYRGSDNEEL VARL RESTGLPCTTMTSHA
Achromobacter	I GMI VPPAAGLV PADGARLY - PDLPF I ASGLGLGSVTP QGYDAVI ES VVDHARRL QKQGAADVSLMGTSL SFYRGAAFNAAI TVAMREATGLPCTTMTSTA
Pseudomonas	VGLI VPPAAGEVPPPEPVAL YGAEVNF I AAGLGLRKLTPDGYDEVI DRMGEL SREL AGNGADAI VLMGTSL SFYRGPEFNARI I EVMSQASGLPATTMTSCA
Nitratireductor	I GMI VPPAAGDVPPPEP LELYGGRARF I AEGALAKALSP EGYDAVI ERVEALAVSLR ERGAELI SLMGTSL SFYRGAAFNAAI TVAMREATGLPCTTMTSTA
Amorphus	I GMI VPPAAGEVPPPEAPAVY - PELRF LAHGLGLADMAPDDYARVTDI VGDAAAGL AARGADVVGIMGTSL SFYRGADFNDAI AALVAERSGRPSTTMTSSA
Polymorphum	VGLI VPPATGLVPPPEPPAL YGDALRFAARGLALATMTDRGYDDVI DRVEAARALAAEGAAVALMGTSL SFYRGAAFNDAI VERMASATGLPVTMTSCA

Bordetella	V L N G L R A L G V R R V A L A T A Y I D D V N R L A A F L A E E S L V P T G C R S L G I T G V E A M A R V D T A T L V D L C V R A F E - - - A A P D - S D G L L S C G G L L T L D A I P E V E R
Vario_HH01	I V G A L R H L G V R R V A V A T A Y I D E V N V H L R K Y L E Q S G F E P L A L E G L S I S D V K A V G E V P T Q V L V D L C M K V F D - - - A Q A G - A D G L L S C G G L V T L D A V R E V E D
Vario_para	I I A G L H H L K V R R V A V A T A Y I D E V N T Q L R T Y L E Q S D F E P L A L E G L A I S D V Q A V G Q V P T E V L V D L C L K V F E - - - D Q P G - A D G L L S C G G L V T L D A V R E V E A
Chelativorans	V L N G L R A L G V R R V A L A T A Y I D D V N R L A A F L A E E S L V P T G C R S L G I T G V E A M A R V D T A T L V D L C V R A F E - - - A A P D - S D G L L S C G G L L T L D A I P E V E R
Enterobacter	V I K G L R A L G V R R V A L A T A Y I D D V N R L A A F L A E F G L V P A G C R S L G I T G V D A M A R V D T D I L V D L C V R A F E - - - A A P D - S D G L L S C G G L L T L D A I P E V E R
Alcaligenes	I L R G L R V S G I E R V A V A S S Y I D D V N R L V R F L A Q N Q I Q A V C A Y G L G V N D V T A M S Q I S T Q E L V D L C L K T W D I A Q K Q A P G A Q G L L S C G G L V S L E A V R Q V E D
Achromobacter	V L N G L R A L G V R R V A L A T A Y I D D V N R L A A F L A E E G L V P A G C R S L G I T G V E A M G R V D T D I L V D L C V R A F E - - - A A P D - S D G L L S C G G L L T L D A I P E V E R
Pseudomonas	V I E A L N A V G A R R I A L A T A Y V D S V N R L A D F L A A S G L C V E S L A T D I E S V G A I A H Y T Q D L L E G R A I T - - - A A G P - V D A L I M S C G G R T L P V T S L Q L E A
Nitratireductor	V I E A L E A L G A R R L A V A T A Y S D P V N D R L T D Y L E R A G F E V A A L D I E D V D T I A T V T T E A L I D E G V E A G K - - - A A P G - A D A L I S C G G L R T L P V T G P V E R
Amorphus	I I R A L R A V S A R R L A V L T A Y E D D V N R L L Q A Y L E G H G F S I A S L Q A L K I R A V S E V A G V G T E Q L V H E G R A I E - - - A A A G - A D A L I S C G G L Q T L D C V R Q L E A
Polymorphum	V V E A L R A V G A R R L A V A T A Y V D E V N D R L T A F L L H H G F E V L G L D S L Q I S A V G D V L A I G D D D L I G L G T R A F V - - - A A P E - A D A L L V S C G G L Q T L S V T L P L E D

Bordetella	R L G V P V V S S P A G F W D A V R L A G G G A K A R P G Y G R L
Vario_HH01	R L R V P V V S S P A G F W D L V G T A G L D P R S - P G H G R L
Vario_para	R L Q V P V V S S P A G F W D L V R T A G L D A R S - P G Q G R L
Chelativorans	R L G V P V V S S P A G F W D A V R L A G G G A K A R P G Y G R L
Enterobacter	R L G M P V V S S P A G F W D A V R L A G C E V Q A A P G Y G R L
Alcaligenes	K L G V T V V S S P A G F W D L V A T A G L D L F P - Q V M G R L
Achromobacter	R L G V P V V S S P A G F W D A V R L A G G G G A K A R P G Y G R L
Pseudomonas	E F G L P V I S S A M A G A W A A V R L V G H S G E S - P G S G R L
Nitratireductor	R S G M P V V S S A L A G A W G A M G L L G L D R H A - Q G A G R L
Amorphus	K G S P P V V T S A T A G V W D L A R L A G A H T P R - P G F G R L
Polymorphum	R L G V P V I S S A V A G A W A A A R L I G H G G E A - P G Y G R L

Abbildung 10: Aminosäuresequenz-Alignment der 11 putativen und bestätigten AMDasen. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus den Aminosäuresequenzen der AMDasen aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201, *Variovorax* sp. HH01, *Variovorax paradoxus* S110, *Chelativorans* sp.BNC1, *Enterobacter cloacae* KU1313, *Alcaligenes faecalis faecalis* NCIB 8687, *Achromobacter* sp. KU1311, *Pseudomonas azotifigens* DSM 17556, *Nitratireductor pacificus* pht-3B, *Amorphus coralli* DSM19760 und *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1. Das Alignment wurde mit ClustalW2 erstellt. Ähnliche und identische Aminosäuren wurden grau unterlegt. Die konservierten Bereiche und Aminosäuren, welche mit einem Stern markiert sind, dienten zur verfeinerten Suche nach AMDasen.

Die Proteine mit putativer AMDase-Aktivität stammten aus *Variovorax paradoxus* S110, *Alcaligenes faecalis faecalis* NCIB 8687, *Pseudomonas azotifigens* DSM 17556, *Nitratireductor pacificus* pht-3B, *Amorphus coralli* DSM19760 und *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1. Bei den Isolaten handelt es sich überwiegend um mesophile Organismen aus Bodenproben, bis auf *Nitratireductor pacificus* pht-3B und *Amorphus coralli* DSM19760, die beide marinen Ursprungs sind.

3.2 Untersuchung der Isolate aus Bodenproben auf AMDase-Aktivität

Der AG Streit stehen Isolate aus Anreicherungskulturen von Bodenproben aus den Botanischen Gärten in Hamburg und Duisburg zur Verfügung, die auf Phenylmalonsäure als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können. Diese Isolate wurden auf ihre AMDase-Aktivität überprüft.

3.2.1 pH-abhängiger Nachweis der AMDase-Aktivität

Da die Decarboxylierung von Substraten zu einem Anstieg des pH-Wertes im Medium führt, konnten erste Hinweise auf eine mögliche AMDase-Aktivität der Isolate mittels Plattentest

gewonnen werden. Die Indikatorplatten (2.11) enthielten das Substrat Phenylmalonsäure und den pH-Indikator Kresolrot, der einen pH-Anstieg durch einen Farbumschlag von Gelb nach Rosa sichtbar machte. Indikatorplatten wurden mit den zu untersuchenden Isolaten beimpft und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Von den 36 getesteten Isolaten zeigte sich bei 8 Proben ein Farbumschlag (Abbildung 11). Diese wurden im weiteren Verlauf näher untersucht.

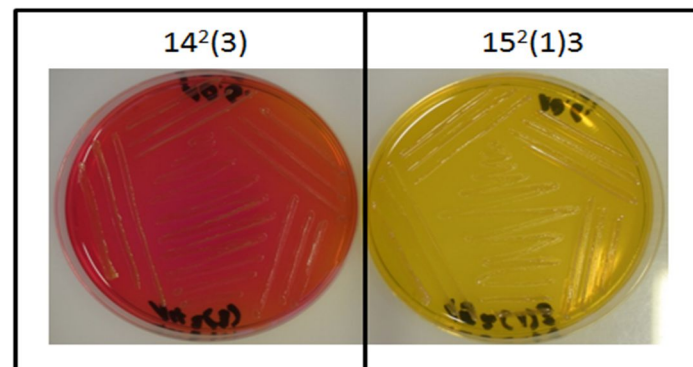


Abbildung 11: pH-abhängiger Nachweis der AMDase-Aktivität mittels Plattentest. Durch die Decarboxylierung des Substrats Phenylmalonsäure kommt es zum pH-Anstieg im Medium und zu einem Farbumschlag von Gelb nach Rosa. Die Abbildung zeigt die Isolate 14²3 und 15²(1)3 nach dreitägiger Inkubation bei 30°C. Das Isolat 14²3 war eine der acht AMDase-positiven Proben, während das Isolat 15²(1)3 keine nachweisbare Enzymaktivität zeigte.

3.2.2 Nachweis von AMDase-Genen mittels PCR

Ein Alignment aller zur Verfügung stehenden Nukleotidsequenzen putativer und überprüfter *amd*-Gene wurde erstellt und nach konservierten Bereichen in katalytisch relevanten Abschnitten gesucht (Abbildung 12). Für diese Bereiche wurden Primer abgeleitet (Tabelle 7, Primer 5-21) und für den Nachweis von AMDase-Genen genutzt.

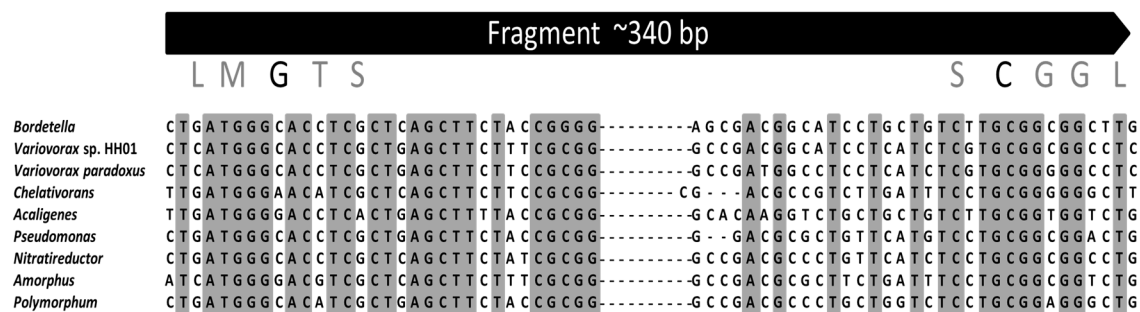


Abbildung 12: Ausschnitt aus Nukleotidsequenz-Alignment putativer und verifizierter *amd*-Gene. Ausschnitt zeigt konservierte Bereiche (grau unterlegt) der Nukleotidsequenzen der aufgeführten AMDasen aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201, *Variovorax* sp. HH01, *Variovorax paradoxus* S110, *Chelativorans* sp. BNC1, *Acaligenes faecalis faecalis* NCIB 8687, *Pseudomonas azotifigens* DSM 17556, *Nitratireductor pacificus* pht-3B, *Amorphus coralli* DSM19760 und *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1. Diese Bereiche wurden zur Ableitung von Primern für eine PCR basierte Suche nach AMDasen verwendet. Das PCR-Produkt ergab eine Größe von etwa 340 bp. Über dem Alignment ist ein Ausschnitt der entsprechenden Aminosäure-Sequenz aufgeführt. Katalytisch

relevante Aminosäuren sind schwarz hervorgehoben. Das Alignment (ClustalW2) wurde mit Hilfe des Programms Seaview (2.18.18.1) erstellt.

Die abgeleiteten Primer wurden zusammen mit dem Überstand aufgekochter Zellen von Übernachtskulturen der Isolate (2-4µl) für PCRs (2.18.14) verwendet. Die Annealingtemperatur betrug 59°C, bei einer Elongationszeit von 30 s. In sechs der Proben konnte ein Amplifikat der gesuchten Größe nachgewiesen werden. Ein exemplarisches Gelbild ist in Abbildung 13 zu sehen. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA des Stammes *Variovorax* sp. HH01 verwendet (Spur 1), mit einer deutlichen Bande im Bereich von ~340 bp. Spur 2 und Spur 3 sind Negativkontrollen mit genomischer DNA der Bakterienstämme *Enterococcus faecium* E1679 und *Sinorhizobium fredii* NGR234. Spur 4 zeigt eines der sechs positiven Isolate (14²(3)) mit einem Fragment der gesuchten Größe.

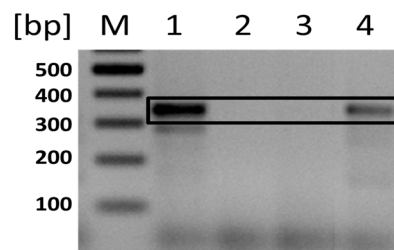


Abbildung 13: 2%-iges Agarose-Gel der PCR-Proben mit spezifischen Primern für *amd*. Verwendet wurde genomische DNA der Stämme *Variovorax* sp. HH01 (Positivkontrolle, Spur 1), *Enterococcus faecium* E1679 (Negativkontrolle, Spur 2), *Sinorhizobium fredii* NGR234 (Negativkontrolle, Spur 3) und Überstand aufgekochter Zellen des Isolates 14²(3). Die Auftrennung der Proben erfolgte für 40 min bei 100V. Als Größenstandard wurde Gene Ruler 100 bp DNA ladder von Thermo Scientific verwendet. Man erkennt sowohl in der Positivkontrolle als auch beim Isolat 14²(3) eine Bande der gesuchten Größe (~340 bp).

3.2.3 Sequenzanalyse der PCR-Fragmente

Amplifikate der gesuchten Größe wurden sequenziert (2.18.17) und mit BLAST-Datenbankeinträgen verglichen. Zusätzlich wurde eine Analyse der 16S rRNA-Gene der betreffenden Isolate vorgenommen. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Isolate mit putativer AMDase-Aktivität. Aufgelistet sind die Auswertungen der Sequenzierungen der Amplifikate der Screening-PCRs und der 16S-rRNA-Gene der Isolate.

Probe	Blast-Treffer (blast x)	Organismus	E-Value	AA- Ähnlichkeit	16S rRNA-Gen
2 ² (1)	---	---	---	---	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS
2 ² (4)	Arylmalonat-Decarboxylase	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	$8 \cdot 10^{-72}$	97%	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS
14 ² (3)	Arylmalonat-Decarboxylase	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	$3 \cdot 10^{-70}$	96%	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS
14 ² (4)	Arylmalonat-Decarboxylase	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	$9 \cdot 10^{-70}$	96%	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS
15 ² (1) 1	Arylmalonat-Decarboxylase	<i>Variovorax</i> sp. HH01	$2 \cdot 10^{-74}$	98%	<i>Variovorax paradoxus</i> S110
15 ² (1) 2	Arylmalonat-Decarboxylase	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	$4 \cdot 10^{-36}$	72%	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8

Bei fünf der sechs positiven Isolate handelte es sich bei dem nächsten Verwandten um *Variovorax paradoxus* und auch die translatierten Nukleotidsequenzen zeigten die größte Übereinstimmungen mit einer Arylmalonat-Decarboxylase dieser Art. Die Sequenzierung des Fragments des Isolates 2²(1) schlug fehl. Jedoch konnte auch hier, mittels Analyse des 16S-rRNA-Gens, die enge Verwandtschaft mit *Variovorax paradoxus* EPS nachgewiesen werden, weswegen eine ähnliche Aminosäuresequenz wie bei den Isolaten 2²(4), 14²(3) und 14²(4) zu erwarten ist. Das Isolat 14²(3) wurde näher untersucht und für die Konstruktion einer Genombank verwendet (3.3). Das zugehörige *amd*-Gen wurde heterolog überexprimiert, mit anschließender Reinigung (3.5) und biochemischen Charakterisierung der AMDase (3.6). Im weiteren Verlauf wurde 14²(3) als *Variovorax* sp. HH02 bezeichnet. Bei dem Isolat 15²(1) handelte es sich um eine Mischkultur. Mehrfache Reinigungsausstriehe ermöglichten die Isolierung zweier Bakterienstämme mit AMDase-Aktivität. *Variovorax* sp. HH01 (15²(1)1) wurde bereits aus dieser Probe isoliert und die Arylmalonat-Decarboxylase des Organismus im Rahmen einer Diplomarbeit biochemisch charakterisiert (Maimanakos 2009). Zusätzlich konnte ein Stamm isoliert werden, der die höchste phylogenetische Übereinstimmung, basierend auf der 16S-rRNA-Gensequenz, mit *Achromobacter xylosoxidans* A8 aufwies. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz des Fragments mit dem Enzym aus *Bordetella bronchiseptica* lag bei 72%. Die Sequenzierung (Abbildung 14) ergab ein Cystein anstelle des konservierten Glycins an Position 74 (Nummerierung der Aminosäuren basierend auf AMDase des Stammes *Bordetella bronchiseptica* KU1201). Dies führte zu der Annahme, dass es sich bei dem Enzym wahrscheinlich um eine Racemase der Protein-Superfamilie der Aspartat/Glutamat-Raemasen handelte, die auch eine geringe Decarboxylase-Aktivität aufwies. Ansonsten

waren die Sequenzübereinstimmungen und -ähnlichkeiten zwischen der AMDase und dem PCR-Fragment höher als im Vergleich mit der Racemase. Alle weiteren für AMDase-Aktivität entscheidenden Aminosäuren dieses Sequenzabschnittes waren auch im PCR-Fragment vorhanden. Eine Illumina-Sequenzierung der Gesamt-DNA des Isolates 15²(1) ermöglichte die Analyse der kompletten Aminosäuresequenz des putativen *amd*-Gens aus 15²(1)2. Hierbei stellte sich heraus, dass es sich bei der Aminosäure 74 doch um ein Glycin handelte. Da alle zwölf Sequenzmerkmale erfüllt wurden, wurde angenommen, dass es sich bei dem dazugehörigen ORF mit großer Wahrscheinlichkeit um ein weiteres AMDase-kodierendes Gen handelte. Das Isolat 15²(1)2 wurde im Folgenden als *Achromobacter* sp. HH01 bezeichnet.

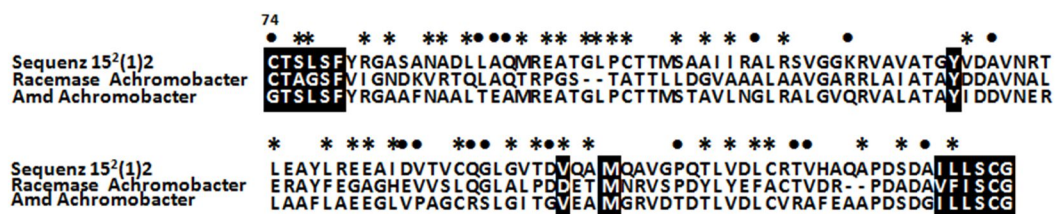


Abbildung 14: Aminosäure-Sequenz des PCR-Produkts des Isolates 15²(1)2 im Vergleich mit einer Asp/Glu/Hydantoin Racemase und einer AMDase aus *Achromobacter*. Abgebildet sind die Aminosäuresequenzen des PCR-Screening-Produkts des Isolates 15²(1)2 und die entsprechenden Sequenzbereiche einer Asp/Glu/Hydantoin Racemase aus *Achromobacter xylosoxidans* und der AMDase aus *Achromobacter* sp. KU1311. Ähnliche Aminosäuren, die nur Racemase und Isolat gemeinsam haben, wurden mit Punkten markiert, ähnliche Aminosäuren der AMDase und des Isolates mit Sternen. Für die AMDase-Aktivität entscheidende Aminosäuren sind schwarz unterlegt.

3.3 Konstruktion einer Genombank des Stammes *Variovorax* sp. HH02 (14²(3))

Zur Herstellung einer Genombank des Stammes *Variovorax* sp. HH02 wurde wie unter 2.18.16 beschrieben verfahren. Die Bank umfasste 2112 Klone mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 20 kb. Bei einer theoretischen Genomgröße von 6,8 Mb entspricht dies einer Genomabdeckung von 99,8%.

3.3.1 Suche nach Fosmidklonen mit *amd* in der Genombank des Stammes *Variovorax* sp. HH02

Für die Suche nach Fosmidklonen mit AMDase-Gen wurden PCRs mit spezifischen Primern (Primer 26 und 27) zur Amplifizierung eines konservierten Bereichs innerhalb des Gens *amd*

durchgeführt (2.18.14.1.) Von anfänglichen 96er-Pools wurde später auf Einzelklone herunter gebrochen (Abbildung 15).

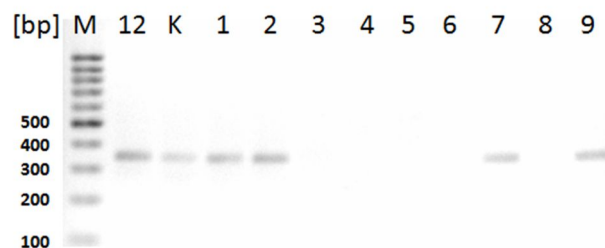


Abbildung 15: 2%-iges Agarose-Gel mit Proben des PCR-Screenings der Genombank *Variovorax* sp. HH02. Zu sehen sind PCR-Proben von 96er-Pools der Mikrotiterplatten 1-9, 12 und einer Kontrolle mit genomischer DNA des Isolates 15²(1)1. Die Auftrennung der Proben erfolgte für 40 min bei 100V. Als Größenstandard wurde „Gene Ruler 100 bp DNA ladder“ von Thermo Scientific verwendet. Man erkennt sowohl in der Positivkontrolle als auch bei den Proben 1, 2, 7, 9 und 12 eine Bande der gesuchten Größe (~340 bp).

Die PCRs brachten zehn putativ positive Klone hervor, von denen drei mittels Primer Walking sequenziert wurden, um sicher zu stellen, dass sie ein vollständiges *amd*-Gen trugen. Die Auswertung und Kombination aller drei Sequenzdaten im Vergleich mit *Variovorax* sp. HH01 ist in Abbildung 16 zu sehen.

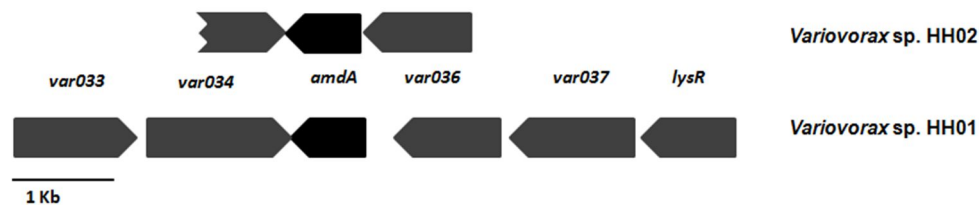


Abbildung 16: Sequenzumgebung der AMDase-Gene der Stämme *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02. Die Sequenzdaten des Stammes *Variovorax* sp. HH02 wurden mittels Primer Walking dreier Fosmidklone gewonnen. Für *Variovorax* sp. HH01 standen zu diesem Zeitpunkt Daten einer 454-Sequenzierung zur Verfügung. Die abgebildeten Gene kodieren für: Acyl-CoA-Dehydrogenase (*var033*), Protein der MmgE/PrpD-Familie (*var034*), Arylmalonat-Decarboxylase (*amdA*), hypothetisches Protein mit Ähnlichkeit zu Proteinen der TctC Familie (*var36*), Mandelat Racemase/Muconat lactonizierendes Protein (*var37*) und LysR-Regulator (*lysR*).

Der sequenzierte Bereich der Fosmidklone umfasste 1872 bp und zeigte eine hohe Übereinstimmung mit der entsprechenden Genregion in *Variovorax* sp. HH01. Es konnte nachgewiesen werden, dass alle untersuchten Fosmidklone ein vollständiges *amd*-Gen trugen.

Die Fosmid-Klone *E. coli* EPI300 pCC1FOS_1E3, *E. coli* EPI300 pCC1FOS_18C11, *E. coli* EPI300 pCC1FOS_19E11 wurden anschließend auf ihre AMDase-Aktivität mittels HPLC-Screening (2.12) und Platten-Screening (2.11) getestet. Es konnte jedoch bei keinem der drei Klone eine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

3.4 Funktionelle Screenings zum Nachweis von AMDasen

Um weitere Enzyme mit AMDase-Aktivität aufzuspüren, wurden funktionelle Screenings für die Durchmusterung von Metagenombänken genutzt. Zur Anwendung kamen ein pH-abhängiger Plattentest, ähnlich wie unter 3.2.1 beschrieben, und ein HPLC basiertes Screening.

3.4.1 Konstruktion einer Positivkontrolle

Da die Genombank des Stammes *Variovorax* sp. HH02 keine AMDase-aktiven Fosmidklone enthielt, aber für die Durchmusterung der Metagenombanken Decarboxylase-aktive Fosmidklone als Positivkontrolle benötigt wurden, wurde eine Fosmid-Klon ähnliche Kontrolle hergestellt. Dafür wurden einige hundert Basenpaare stromaufwärts und stromabwärts der AMDase-Genregion von *Variovorax* sp. HH01 via PCR amplifiziert (2.18.14, Primer 22 und 23, Annealingtemperatur: 65,5°C, Elongationszeit: 3 min 40 s), in den Niedrigkopienzahl-Vektor pMCL210 kloniert und in *E. coli* EPI300 transformiert. Das fertige Konstrukt wurde mittels Verdau und PCR überprüft.

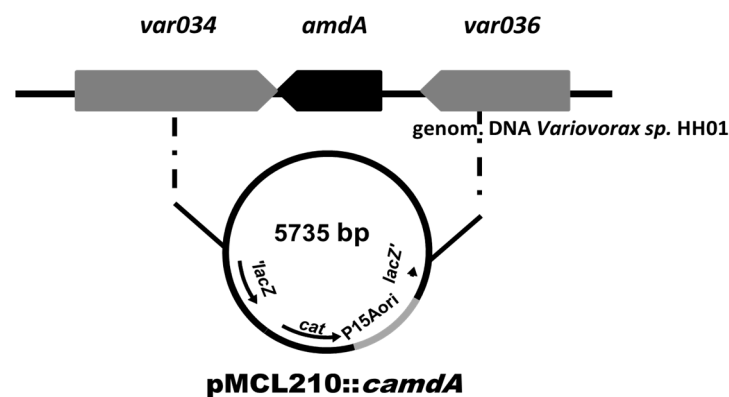


Abbildung 17: Fosmidklon-ähnliche Positivkontrolle zum Nachweis von AMDase-Aktivität in Metagenombanken. Ein 3206 bp großes Fragment mit dem Gen *amdA* aus *Variovorax* sp. HH01 wurde in den Niedrigkopienzahl-Vektor pMCL210 kloniert und anschließend in *E. coli* EPI300 transformiert. Der Stamm wurde als Positivkontrolle für das Screening von Metagenombanken verwendet. Die abgebildeten Gene kodieren für: Proteine der MmgE/PrpD-Familie (*var034*), Arylmalonat-Decarboxylase (*amdA*), hypothetisches Protein mit Ähnlichkeit zu Proteinen der TctC Familie (*var36*).

3.4.2 Platten-Screening

Für das Platten-Screening wurden verschiedene pH-Indikatoren, Medienzusammensetzungen und Induktionslösungen der Fosmidklone getestet. Das Screening wurde dann wie unter 2.11 beschrieben durchgeführt. Abbildung 18 zeigt den Nachweis der AMDase-Aktivität der Positivkontrolle (3.4.1).

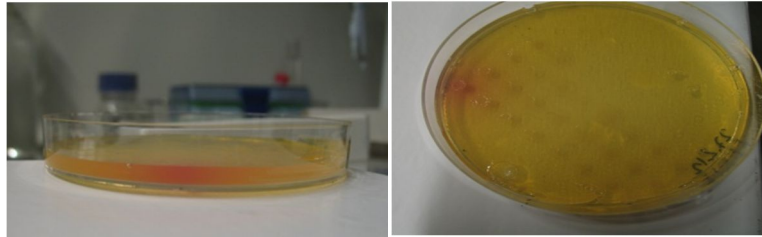


Abbildung 18: Nachweis der AMDase-Aktivität der Positivkontrolle mittels Platten-Screening. Als pH-Indikator wurde Kresolrot bei einem pH von 6 verwendet. Ein Anstieg des pH-Wertes im Medium wurde durch einen Farbumschlag von Gelb nach Rosa sichtbar. Deutlich ist der rosafarbende Hof um die Kolonie der Positivkontrolle zu erkennen.

3.4.3 HPLC-Screening

Zur Etablierung eines Screenings nach AMDasen in Metagenombanken wurde die unter 3.4.1 dargestellte Positivkontrolle verwendet. Der Nachweis von AMDase-Aktivitäten in Pools von Metagenomklonen mittels HPLC wurde wie unter 2.12 beschrieben durchgeführt. Die schematische Darstellung des Screenings ist in Abbildung 19 zu sehen.

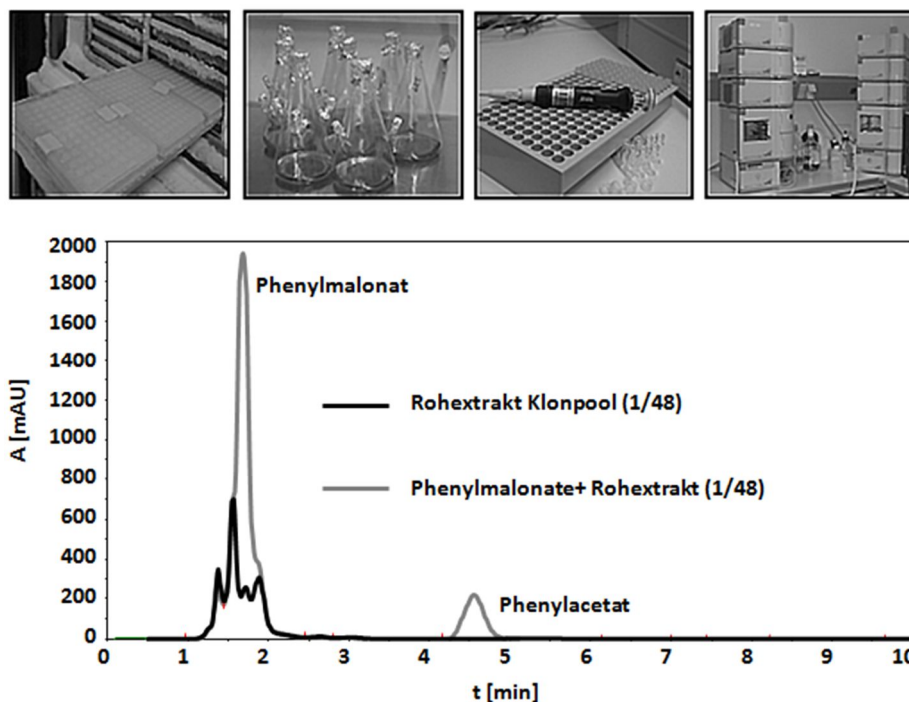


Abbildung 19: Ablauf des HPLC-Screenings der Metagenombanken am Beispiel der Positivkontrolle. Metagenombanken wurden überstempelt, in Flüssigmedium induziert, Zellpellets anschließend mittels French Press aufgeschlossen und der Rohextrakt für den Aktivitätstest (2.12) verwendet. Im Chromatogramm zu erkennen ist der Umsatz eines Teils des Substrats Phenylmalonat zu Phenylacetat (grau) nach Inkubation mit Rohextrakt eines Pools aus 48 Klonen mit einer Positivkontrolle. Zum Vergleich ist die Absorption des Rohextrakts ohne Substrat (schwarz) dargestellt. Beschriftung: Absorption (A), Milli-Absorptionseinheiten (mAU), Zeit (t), Minuten (min)

Metagenombanken wurden überstempelt, in Flüssigmedium induziert, Zellpellets anschließend mittels French Press aufgeschlossen und der Rohextrakt für den Aktivitätstest (2.12) verwendet. Die Umsätze des Substrats Phenylmalonat zu Phenylacetat wurden bei

einer Wellenlänge von 214 nm gemessen. Die Elution erfolgte isokratisch mit 80% Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) und 20% Methanol und einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Die Retentionszeiten des Substrats und des Produkts betrugen 1,5 min-2,5 min bzw. 4,5 min-6,5 min, abhängig vom Säulendurchmesser der RP18-Säulen. Für das Screening wurden anfangs halbe (48 Klone), später dann ganze (96 Klone) Mikrotiterplatten vereinigt.

3.4.4 Auswertung des Metagenomscreenings

Es wurden 4000 Klone der Metagenombank, hergestellt mit DNA, welche aus Elefantendung isoliert wurde und 2100 Klone der Genombank des Isolates *Variovorax* sp. HH02 mittels Plattentest und HPLC-Screening untersucht. Jedoch konnte, trotz zweier putativ positiver Pools der Metagenombank, in keiner Probe eine reproduzierbare AMDase-Aktivität nachgewiesen werden.

3.5 Klonierung und heterologe Expression der *amd*-Gene in *E. coli*

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die *amd*-Gene der Stämme *Variovorax* sp. HH02 und *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 kloniert und heterolog überexprimiert mit dem Ziel der biochemischen Charakterisierung der AMDasen. *Variovorax* sp. HH02 ist ein Isolat der Bodenproben aus dem Botanischen Garten in Duisburg, während das Gen des Stammes *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 bei der Datenbank-Recherche gefunden wurde und bis dato der Nachweis einer tatsächlichen AMDase-Aktivität des Isolates fehlt. *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 ist ein α -Proteobakterium, welches aus Erdöl belastetem, salzhaltigem Boden isoliert wurde und Temperaturen bis zu 50°C toleriert (Nie et al. 2012). Dies machte es zu einem interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen.

3.5.1 Klonierung in Expressionsvektor pET-21a

Das AMDase-Gen des Isolates *Variovorax* sp. HH02 wurde in den Expressionsvektor pET-21a kloniert und anschließend in *E. coli* BL21 transformiert. Das Gen *amdP* aus *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 wurde synthetisiert (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) und die Kodonnutzung an *E. coli* angepasst. Auch hier erfolgte die Klonierung in den Expressionsvektor pET-21a und anschließende Transformation in *E. coli* BL21. Die Konstrukte pET-21a::*amdV* und pET-21a::*amdP* sind in Abbildung 20 dargestellt. In beiden Fällen wurden

die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* für die Klonierung genutzt. pET-21a trägt ein β -Lactamasegen und ist mit IPTG induzierbar. Die gebildeten Proteine können über einen 6xHis-Tag selektiert werden. Zur Bildung von AmdA aus *Variovorax* sp. HH01 wurde der Klon *E. coli* BL21 pET-21a::*amdA* genutzt (Maimanakos 2009).

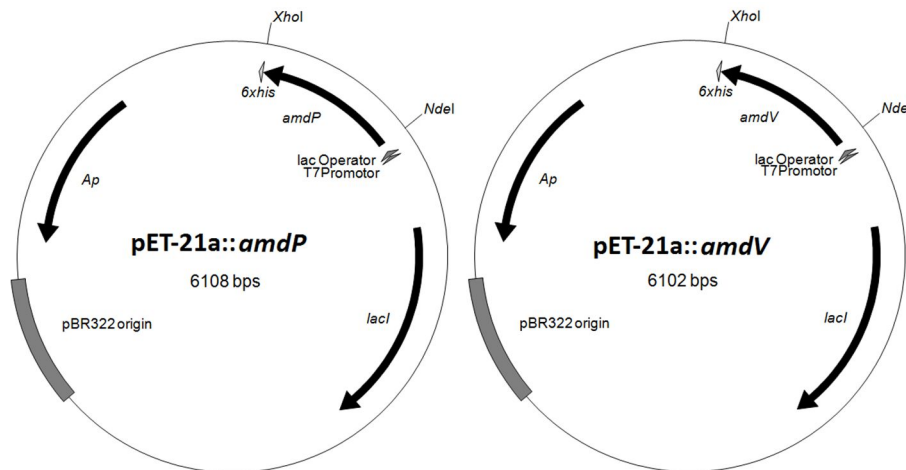


Abbildung 20: Plasmide pET-21a::*amdP* und pET-21a::*amdV*. Dargestellt sind die Expressionsvektoren pET-21a mit den AMDase-Genen aus *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 (*amdP*) und *Variovorax* sp. HH02 (*amdV*). Für die Überexpression und Proteinreinigung wesentliche Eigenschaften sind in den Vektorkarten vermerkt: T7 Promotor, *lac* Operator, AMDase-Gen, His-Tag kodierende Sequenz (6xhis), β -Lactamase kodierende Sequenz (Ap), *lac* Repressor kodierende Sequenz (*lacI*) und Replikationsursprung (pBR322 origin).

3.5.2 Heterologe Überexpression in *E. coli* BL21

Die heterologe Überexpression der *amd*-Gene wurden wie unter 2.6 beschrieben durchgeführt. Es wurden verschiedene Inkubationstemperaturen und IPTG-Konzentrationen getestet. Die größte Proteinproduktion fand bei einer IPTG –Konzentration von 100 μ M und einer Induktionstemperatur von 22°C über Nacht statt. Die Rohextrakte der Kulturen *E. coli* BL21 pET-21a::*amdV* und *E. coli* BL21 pET-21a::*amdP* wurde anschließend auf ihre AMDase-Aktivität untersucht (Abbildung 21).

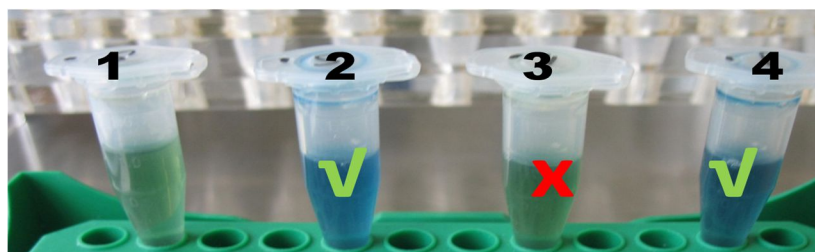


Abbildung 21: pH-abhängiger AMDase-Schnelltest mit Rohextrakt der induzierten Kulturen *E. coli* BL21 pET-21a::*amdV* und *E. coli* BL21 pET-21a::*amdP*. Der Test wurde wie unter 2.10 beschrieben durchgeführt. Ein Farbumschlag von Grün nach Blau zeigte einen pH-Anstieg in Folge der Decarboxylierung des Substrats Phenylmalonsäure an. Man erkennt einen deutlichen Farbumschlag und somit AMDase-Aktivität bei *E. coli* BL21 pET-21a::*amdV* (2) und *E. coli* BL21 pET-21a::*amdP* (4) im Vergleich zur Substratkontrolle (1) und einem weiteren *E. coli* BL21 pET-21a::*amdV2* mit fehlerhaftem Konstrukt (3).

Der Farbumschlag von Grün nach Blau der Proben, versetzt mit Rohextrakten der Kulturen *E. coli* BL21 pET-21a::*amdV* (2) und *E. coli* BL21 pET-21a::*amdP* (4), war durch einen pH-Anstieg infolge der Decarboxylierung des Substrates Phenylmalonsäure begründet. Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem bei der Datenbankrecherche entdeckten *amdP*, um einen AMDase kodierenden ORF handelt.

Die beiden AMDase-aktiven Rohextrakte in Abbildung 21 wurden für die Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (2.16), Dialyse (2.17) und anschließender biochemischen Charakterisierung der gereinigten Enzyme (3.6) genutzt. Die SDS-PAGE (2.14) der einzelnen Reinigungsschritte ist in Abbildung 22 dargestellt. Bei beiden Enzymen ließ sich eine deutliche Überproduktion der His-Tag markierten Enzyme (24,7 kDa) erkennen, mit einer nur minimalen Verunreinigung durch unspezifisch gebundene Proteine.

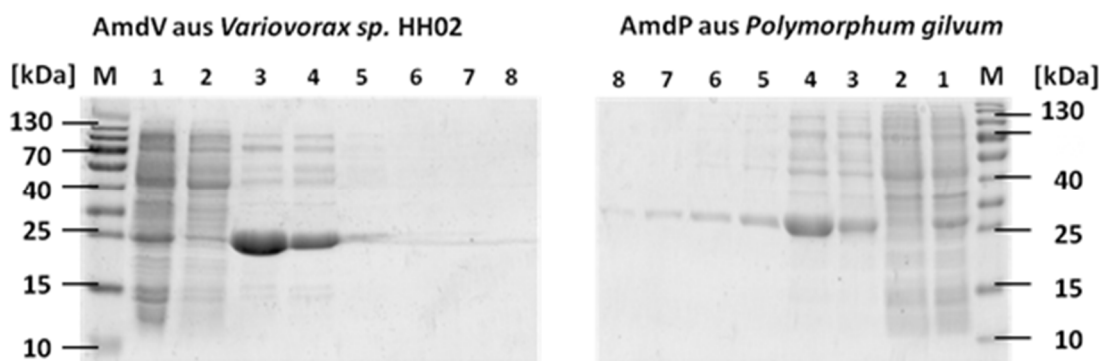


Abbildung 22: SDS-PAGE der Reinigungsschritte der Enzyme AmdV und AmdP. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl des Rohextraktes (1), des Waschschruttes (2) und der Elutionsschritte eins bis sechs (3-8). Proteinmassen sind in Kilodalton [kDa] angegeben. Als Proteinmarker wurde PageRuler Prestained Protein Ladder #26617 (10-170 kDa) der Firma Thermo Scientific verwendet. Die SDS-PAGE wurde wie unter 2.14 beschrieben durchgeführt.

3.6 Biochemische Charakterisierung

Für die biochemische Charakterisierung der Arylmalonat-Decarboxylasen aus *Variovorax* sp. HH01, *Variovorax* sp. HH02 und *Polymorphum gilvum* wurden gereinigte Proteine mit His-Tag verwendet. Die Überexpression der *amd*-Gene und die Reinigung der Proteine erfolgte wie unter 2.6, 2.8, 2.16 und 2.17 beschrieben. Untersucht wurden Temperaturoptimum, Temperaturstabilität, pH-Optimum, Einfluss von Salzen und Kofaktoren und die Lösungsmittelstabilität. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Werten des Enzyms AmdA aus *Variovorax* sp. HH01 (Maimanacos 2009) wurde ein Teil der Versuche mit diesem Enzym wiederholt.

3.6.1 Temperaturoptimum

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde die angegebene Menge Enzym zu einer Substratlösung mit 10 mM Phenylmalonsäure, gelöst in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7), gegeben und für 45 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2M HCl gestoppt und die Proben auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Messung der Substratumsätze mittels HPLC (2.12).

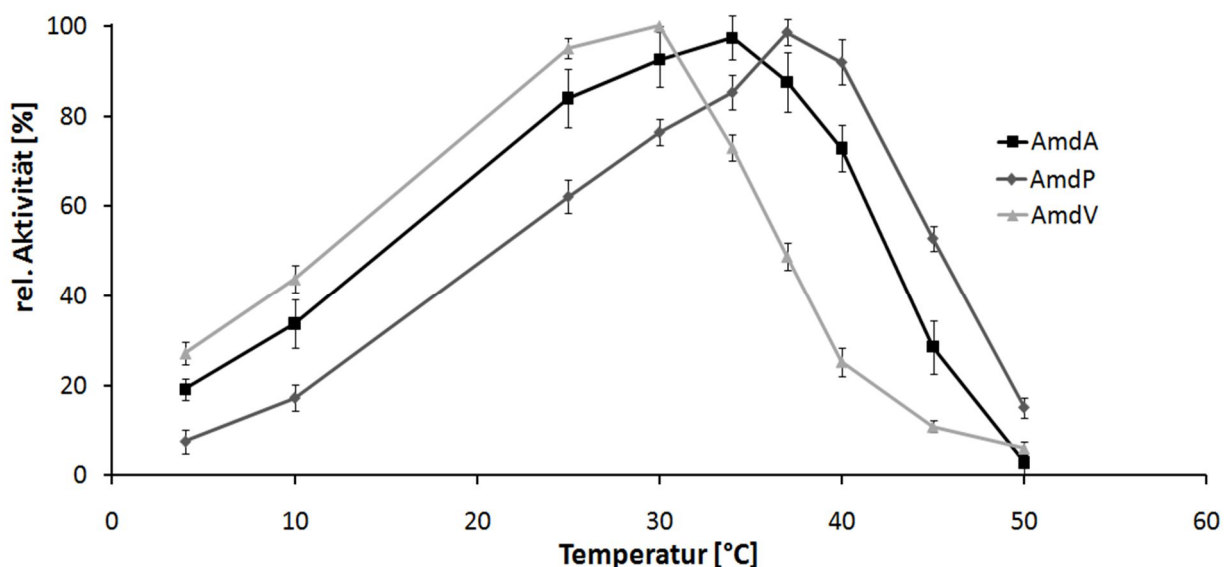


Abbildung 23: Einfluss der Temperatur auf die AMDase-Aktivität. Die Enzymaktivität des gereinigten AmdA (*Variovorax* sp. HH01), AmdV (*Variovorax* sp. HH02) und AmdP (*Polymorphum gilvum*) wurde bei Temperaturen zwischen 4°C und 50°C ermittelt. Als Substratlösung wurde Phenylmalonsäure (10 mM) in Natriumphosphat-Puffer (50 mM) bei einem pH von 7 verwendet und die Proben 45 min nach Zugabe der Enzyme durch Zugabe von 2M HCl gestoppt. Anschließend wurde der Umsatz des Substrates mittels HPLC bestimmt. Bei den Messungen handelt es sich um eine Dreifachbestimmung mit jeweils drei technischen Wiederholungen.

Die Auswertung des Temperatureinflusses auf die Enzymaktivitäten der untersuchten AMDasen ist in Abbildung 23 zu sehen. Man erkennt bei allen drei Enzymen einen ähnlichen Aktivitätsverlauf mit einem Temperaturoptimum im mesophilen Temperaturbereich. AmdV entfaltete seine maximale Aktivität bei 30°C. Bei 10°C besaß das Enzym immerhin noch $44\pm 3\%$ der maximalen Aktivität, während die Decarboxylierung der Phenylmalonäure bei Temperaturen oberhalb des Optimums schnell zum Erliegen kam. Bei 50°C konnten lediglich noch $6\pm 2\%$ Restaktivität gemessen werden.

Die höchsten Substratumsätze des Enzyms AmdA aus dem Ursprungsorganismus *Variovorax* sp. HH01 konnten bei 34°C detektiert werden. Bei 10°C Inkubationstemperatur fiel die AMDase-Aktivität auf ein Drittel des Optimumswertes. Temperaturen oberhalb von 40°C führten zu einer starken Beeinträchtigung der Enzymkatalyse und ab 50°C fast zum vollständigen Verlust der Decarboxylase-Aktivität.

AmdP zeigte im Wesentlichen einen ähnlichen Einfluss der Temperatur auf die Decarboxylase-Aktivität wie AmdV und AmdA. Der höchste Substratumsatz konnte bei 37°C detektiert werden. Unterhalb des Temperaturoptimums war die Enzymaktivität geringer als bei den Enzymen der *Variovorax*-Stämme. So war der Umsatz an Phenylmalonsäure bei 10°C um den Faktor 2,6 geringer als bei AmdV. Im Gegensatz dazu war die Decarboxylase-Aktivität bei Temperaturen oberhalb des Optimums, verglichen mit AmdV, um bis zu 4,8fach (45°C) erhöht.

3.6.2 Temperaturstabilität

Die Stabilität der Enzymaktivität über die Zeit bei unterschiedlichen Temperaturen wurde untersucht. Gelagert wurde Dialysat der gereinigten AMDasen bei 22°C, 4°C und -20°C und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten die verbleibende Decarboxylase-Aktivität ermittelt (Abbildung 24).

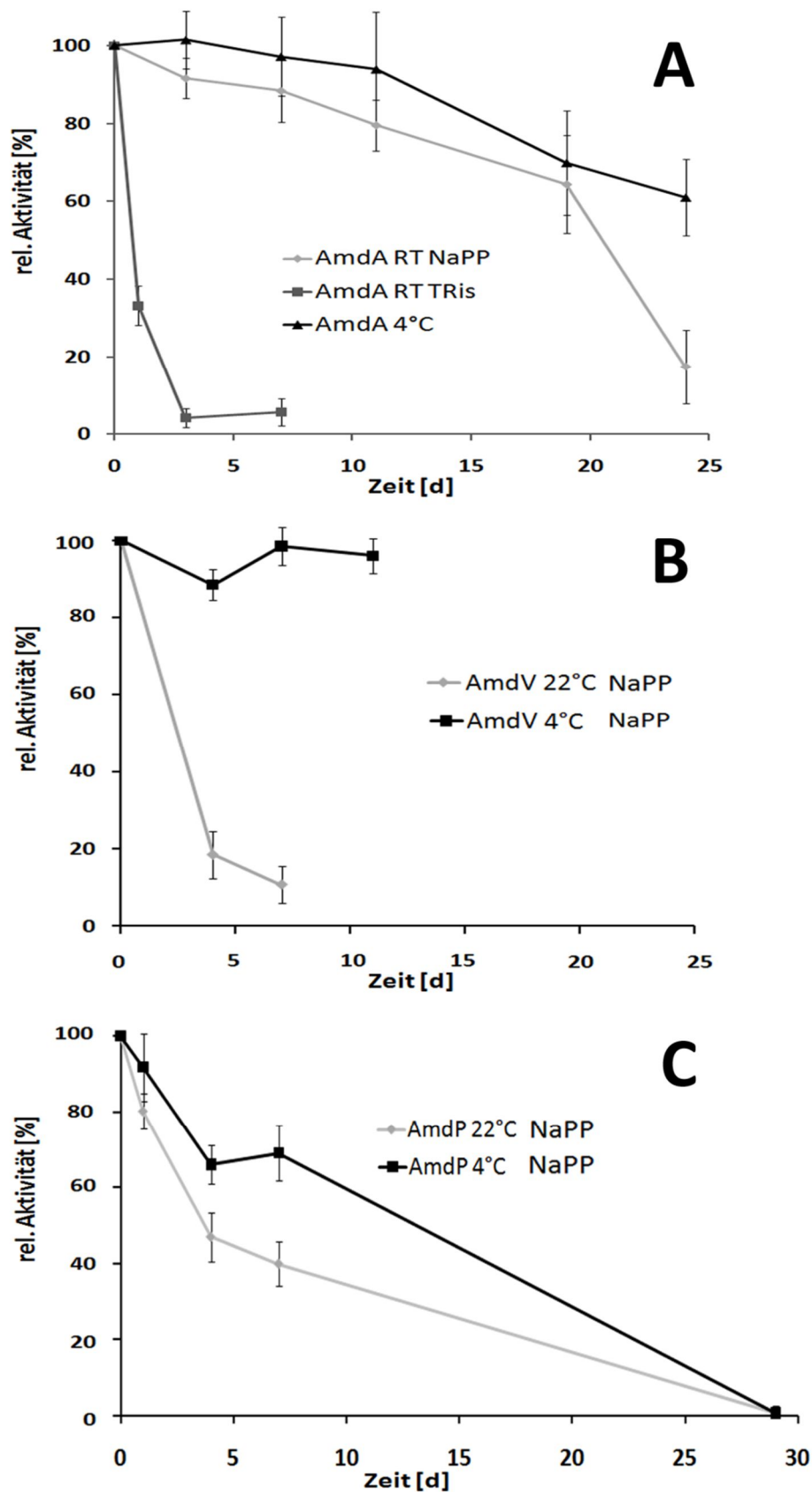


Abbildung 24: Temperaturstabilität der AMDase-Aktivität bei 22°C und 4°C. Untersucht wurde die Enzymaktivität der Arylmalonat-Decarboxylasen aus (A) *Variovorax* sp. HH01 (AmdA), (B) *Variovorax* sp. HH02 (AmdV) und (C) *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 (AmdP) bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (4°C und 22°C bzw. Raumtemperatur (RT)) über die Zeit (d=Tage). Die Proteine wurden in Tris-Puffer (Tris, 50 mM, pH 7) oder Natriumphosphatpuffer (NaPP, 50 mM, pH 7) gelagert. Substratumsätze wurden mittels HPLC bestimmt. Es handelt sich um Dreifachbestimmungen mit jeweils drei technischen Wiederholungen.

Die Enzymstabilität von AmdA (*Variovorax* sp. HH01) wurde in verschiedenen Puffern bei Raumtemperatur (22°C-24°C) getestet. Die AMDase-Aktivität in Tris-Puffer (50 mM, pH 7) kam schon nach wenigen Tagen zum Erliegen und lag am Tag sieben nur noch bei $6\pm 4\%$ des Ausgangswertes. In Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 7) war die Enzym-Aktivität bei Raumtemperatur deutlich stabiler. Nach 19 Tagen konnten noch Substratumsätze von $64\pm 10\%$ ermittelt werden. Danach fiel die AMDase-Aktivität jedoch rasch ab und erreichte nur noch $17\pm 10\%$ des ursprünglichen Wertes. Am stabilsten war das Enzym bei der Lagerung bei 4°C in Natriumphosphatpuffer. Hier lagen die Substratumsätze nach 24 Tagen immer noch bei $61\pm 12\%$.

Die Aktivitätsmessungen des Proteins AmdP aus *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 zeigten, dass die Lagerung dieses Enzym in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 7) weder bei 22°C noch bei 4°C zu empfehlen ist. Nach einer Woche sank die AMDase-Aktivität bereits auf $40\pm 6\%$ bzw. $69\pm 7\%$ ab. Nach 29 Tagen konnte bei beiden Proben nur noch eine Restaktivität von $1\pm 2\%$ ermittelt werden. Die Lagerung des Enzyms in Tris-Puffer (50 mM, pH 7) führte bereits nach zwölf Stunden zum vollständigen Aktivitätsverlust.

Das Enzym AmdV des Stammes *Variovorax* sp. HH02 besaß eine geringe Temperaturstabilität bei 22°C. Nach sieben Tagen konnte nur noch eine Decarboxylase-Aktivität von $11\pm 5\%$ des Ausgangswertes detektiert werden. Die Lagerung bei 4°C ist jedoch mit geringen Aktivitätsverlusten möglich. So lagen die Substratumsätze des Enzyms nach elf Tagen bei $96\pm 5\%$.

Die Lagerung bei 22°C bzw. Raumtemperatur mit nur geringen Aktivitätsverlusten war nur bei AmdA möglich. Die Aufbewahrung des Enzyms sollte in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 7) erfolgen und den Zeitraum von einer Woche nicht überschreiten. Bei 4°C waren beide AMDasen der *Variovorax*-Stämme für etwa elf Tage in Natriumphosphatpuffer stabil. Die gemessenen Enzymaktivitäten betrugen $96\pm 5\%$ (*Variovorax* sp. HH02) bzw. $94\pm 13\%$ des Ausgangswertes. Für AmdP schien die Lagerung selbst für einen kurzen Zeitraum sowohl bei 22°C als auch bei 4°C ungeeignet. Die Lagerung in Tris-Puffer ist bei allen drei Enzymen nicht zu empfehlen.

In Abbildung 25 ist die Enzymaktivität von AmdA (*Variovorax* sp. HH01), AmdV (*Variovorax* sp. HH02) und AmdP (*Polymorphum gilvum* SL003B-26A1), gelagert in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 7) bei -20°C, über einen Zeitraum von 70 Tagen dargestellt. Bei allen drei Enzymen blieb die AMDase-Aktivität über die Zeit nahezu stabil.

Die Substratumsätze erreichten nach 70 Tagen sehr ähnliche Werte, die bei $89\pm 13\%$ (AmdA), $85\pm 9\%$ (AmdV) und $89\pm 7\%$ (AmdP) lagen. Für die Langzeitlagerung empfiehlt sich daher für alle AMDasen eine Aufbewahrung bei -20°C in Natriumphosphatpuffer.

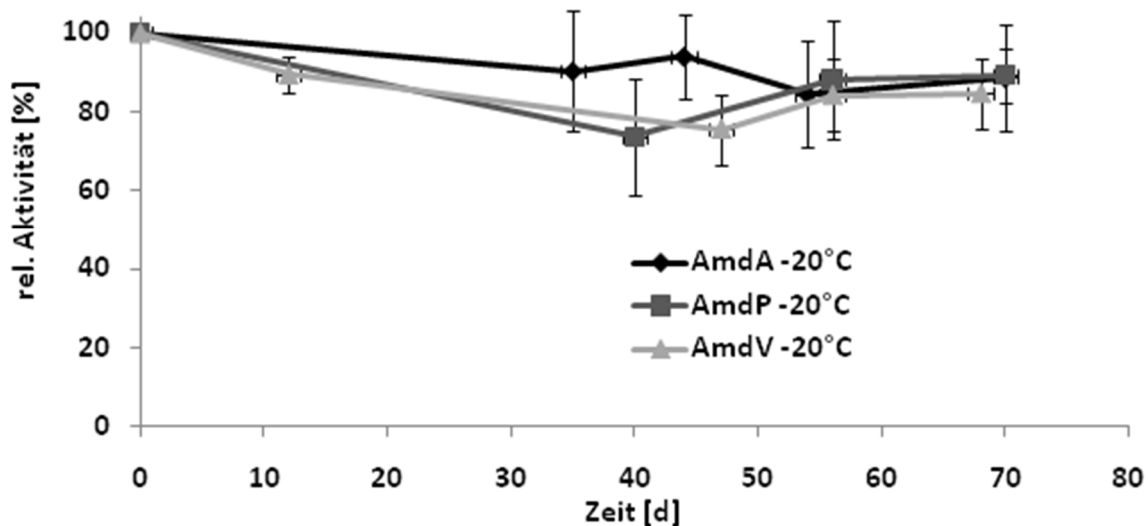


Abbildung 25: Temperaturstabilität der AMDase-Aktivität bei -20°C . Arylmalonat-Decarboxylasen der Stämme *Variovorax* sp. HH01 (AmdA), *Variovorax* sp. HH02 (AmdV) und *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 (AmdP) wurden bei -20°C in Natriumphosphatpuffer (NaPP, 50 mM, pH 7) gelagert und deren Enzymaktivität über die Zeit (d=Tage) gemessen. Substratumsätze wurden mittels HPLC bestimmt. Es handelt sich um Dreifachbestimmungen mit jeweils drei technischen Wiederholungen.

3.6.3 pH-Optimum

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Arylmalonat-Decarboxylasen-Aktivität der Enzyme AmdV (*Variovorax* sp. HH02) und AmdP (*Polymorphum gilvum* SL003B-26A1) wurde in verschiedenen Puffern bei pH-Werten von 4-9 bestimmt. Der Aktivitätstest wurde wie unter 2.12 beschrieben durchgeführt. Nach 45 min wurde die Reaktion durch Ansäuerung gestoppt und die Substratumsätze mittels HPLC bestimmt (2.12). Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 26 zu sehen. Zum Vergleich sind die Daten der Aktivitätsmessung von AmdA (*Variovorax* sp. HH01) der Diplomarbeit (Maimanacos 2009) erneut ausgewertet und aufgeführt wurden.

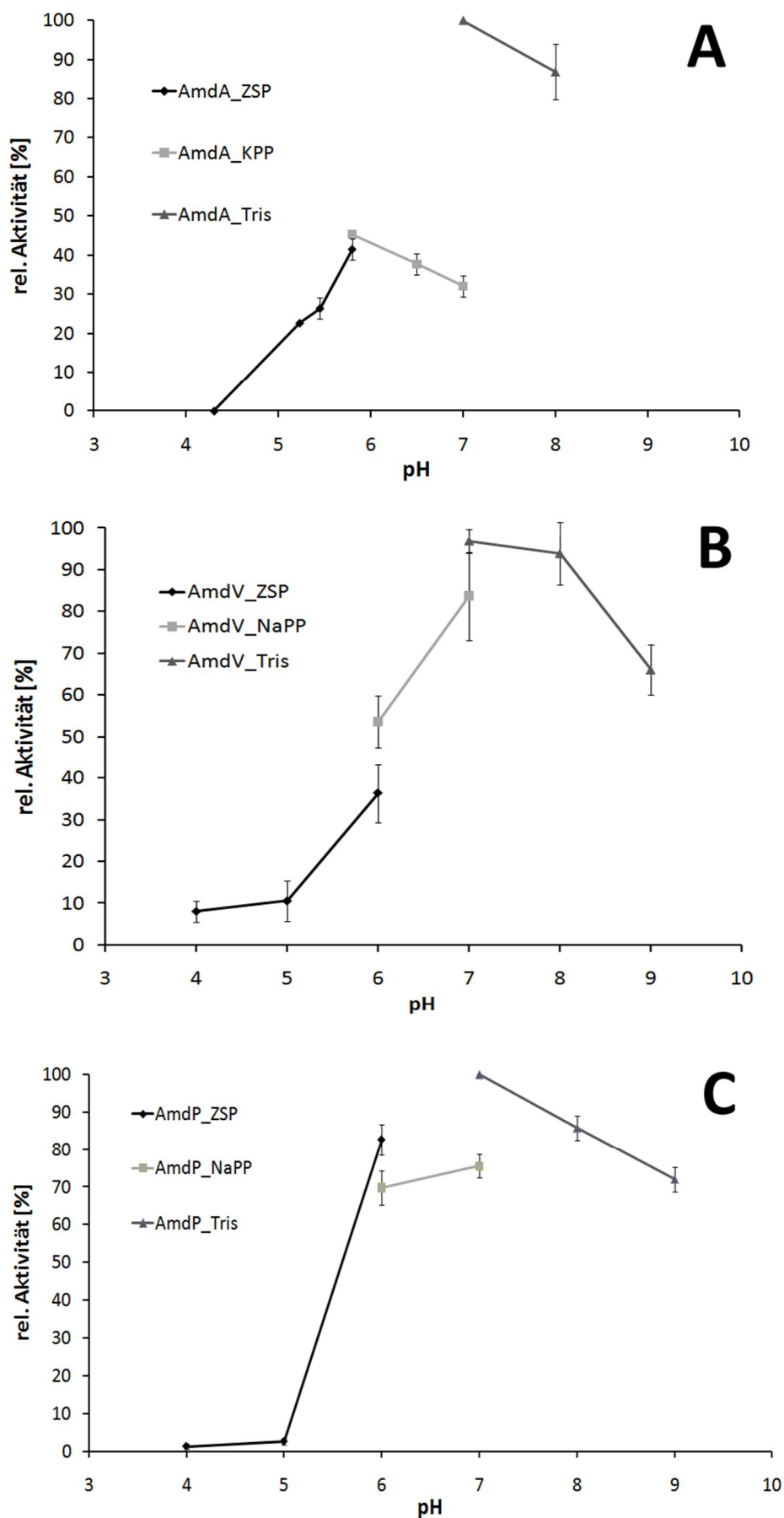


Abbildung 26: Einfluss des pH-Wertes auf die AMDase-Aktivität. Gereinigtes Protein der Enzyme AmdA (A), AmdV (B) und AmdP (C) wurde zu Phenylmalonat-Lösungen in Zitronensäurepuffer (ZSP),

Natriumphosphatpuffer (NaPP) , Kaliumphosphatpuffer (KPP) und Tris-Puffer (Tris) gegeben und anschließend die Enzymaktivitäten mittels HPLC bestimmt (2.12). (A) pH-abhängige Decarboxylase-Aktivität des Enzyms AmdA aus *Variovorax* sp. HH01. Daten sind Maimanakos 2009 entnommen. Für die Aktivitätsmessung wurden 10 mM Phenylmalonsäure in 50 mM Puffern verwendet. Die pH-Werte wurden bei 37°C eingestellt. Die Enzymmenge wurde abhängig von der Aktivität des Enzyms gewählt. Nach 45 min wurde die Reaktion durch 2 M HCL gestoppt und der Umsatz der Phenylmalonsäure mittels HPLC bestimmt. Bei den Messungen handelt es sich um eine Dreifachbestimmung mit jeweils drei technischen Wiederholungen.

Die Auswertung der Aktivitätstests in Abbildung 26 offenbarte bei allen drei Enzymen ein pH-Optimum im leicht sauren bis neutralen pH-Bereich. AmdA (*Variovorax* sp. HH01) konnte seine maximale Aktivität bei pH 6 entfalten und zeigte selbst bei pH 5,2 noch 55% der Aktivität des Optimumswertes. Bei pH 4 konnten keine Substratumsätze detektiert werden.

Die Aktivitätstests des Enzyms AmdV aus *Variovorax* sp. HH02 ergaben die höchsten Umsatzraten bei pH 7. In saurer Umgebung fiel die Decarboxylase-Aktivität von pH 6 auf pH 5 um 60%. Bei pH 4 erreichte die AMDase-Aktivität noch 22% des Wertes bei pH 6. Im basischen Milieu konnten bei pH 9 noch etwa 70% der maximalen Substratumsätze gemessen werden.

Das pH-Optimum des Enzyms AmdP aus *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 lag bei pH 7. Wie bereits bei AmdV, konnten auch in diesem Fall bei pH 9 noch etwa 70% der maximalen Enzymaktivität detektiert werden. Bei sauren pH-Werten fällt die Decarboxylase-Aktivität rasch ab und kam bei pH 4 fast vollständig zum Erliegen.

Bei allen Enzymen konnten die höchsten Substratumsätze in Tris-Puffer gemessen werden.

3.6.4 Einfluss von Salzen und möglichen Kofaktoren

Um die optimalen Reaktionsbedingungen zu eruieren, wurde auch der Einfluss von Salzen und putativen Kofaktoren auf die AMDase-Aktivitäten untersucht. Der Versuchsablauf verlief wie unter 2.12 beschrieben. Für die Experimente wurde gereinigtes Protein verwendet. Die Auswertung der Messungen sind in Abbildung 27 zusammengefasst.

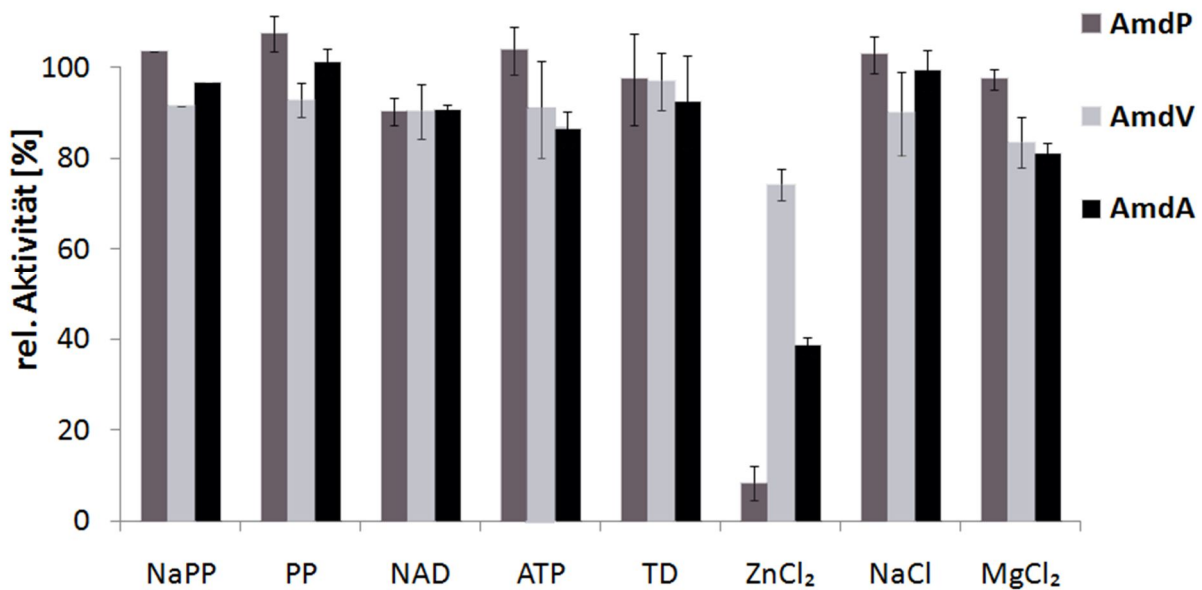


Abbildung 27: Einfluss von Kofaktoren und Salzen auf die AMDase-Aktivität. Enzymaktivitäten der gereinigten AMDasen AmdP (*Polymorphum gilvum*), AmdV (*Variovorax* sp. HH02) und AmdA (*Variovorax* sp. HH01) wurden nach Zugabe verschiedener Kofaktoren und Salze (Endkonzentration 1mM) ermittelt. Untersucht wurden EDTA, Natriumphosphat (NaPP), Pyridoxalphosphat (PP), NAD, ATP, Thiamin-Diphosphat (TD), Zink (ZnCl₂), NaCl und Magnesium (MgCl₂). Als Substratlösung (pH 7) wurden 10 mM PhM, gelöst in 50 mM Tris, verwendet. Die Reaktion wurde nach 45 min durch Zugabe von 2M HCL gestoppt. Substratumsätze wurden mittels HPLC bestimmt. Bei den Messungen handelt es sich um eine Dreifachbestimmung mit jeweils drei technischen Wiederholungen.

Untersucht wurde der Einfluss von Natriumphosphat, Pyridoxalphosphat, NAD, ATP, Thiamin-Diphosphat, Zinkchlorid, Natriumchlorid und Magnesiumchlorid auf die AMDase-Aktivität. Keiner der verwendeten Effektoren bewirkte eine signifikante Aktivitätssteigerung bei einem der getesteten Enzyme. Bei allen drei AMDasen konnten ähnliche relative Aktivitäten der einzelnen Effektoren ermittelt werden, mit Ausnahme von Zinkchlorid und Magnesiumchlorid. Magnesiumchlorid bewirkte eine signifikante Aktivitätsminderung der Decarboxylasen der *Variovorax*-Stämme auf etwa 80% (81±1% bei AmdA und 83±5% bei AmdV). Zinkchlorid führte bei allen Enzymen zu einer signifikante Reduzierung der Enzymaktivität. Die Substratumsätze fielen auf 74±9% bei AmdV, 38±5% bei AmdA und auf 8±4% bei AmdP im Vergleich zur Messung ohne Effektoren.

3.6.5 Lösungsmitteltoleranz

Zur Bestimmung der Lösungsmitteltoleranz der Arylmalonat-Decarboxylasen wurden verschiedene Lösungsmittel in einer Endkonzentration von 10% zur Substratlösung gegeben und die Auswirkung auf die Decarboxylase-Reaktion untersucht. Der Abbau von

Phenylmalonsäure wurde 45 min nach Enzymzugabe mittels HPLC bestimmt (2.12). Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 28 zu sehen.

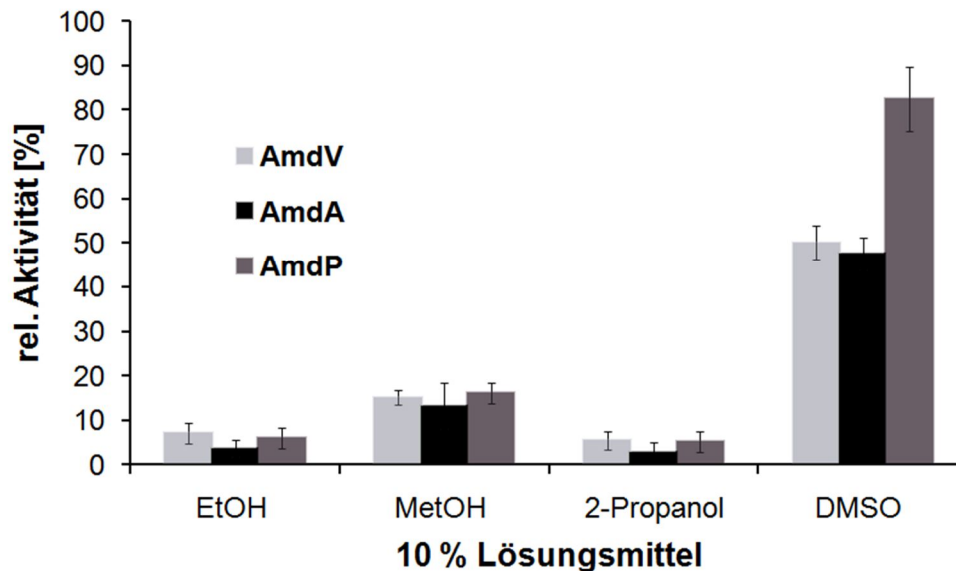


Abbildung 28: Einfluss von Lösungsmitteln auf die AMDase-Aktivität. Die Enzymaktivität des gereinigten AmdV (*Variovorax* sp. HH02), AmdA (*Variovorax* sp. HH01), und AmdP (*Polymorphum gilvum*) wurde nach Zugabe von Ethanol (EtOH), Methanol (MeOH), Isopropanol (Isoprop) und DMSO ermittelt. Die Endkonzentration der Lösungsmittel betrug 10%. Als Substratlösung (pH 7) wurde Phenylmalonsäure (10 mM) in Tris-Puffer (50 mM) verwendet und die Proben nach 45 min durch Zugabe von 2M HCL gestoppt. Anschließend wurde der Umsatz des Substrates mittels HPLC bestimmt. Ein Ansatz ohne Zugabe von Lösungsmitteln diente als Referenz (100% rel. Enzymaktivität). Bei den Messungen handelt es sich um eine Dreifachbestimmung mit jeweils drei technischen Wiederholungen.

Getestet wurde der Einfluss von Ethanol, Methanol, Isopropanol und DMSO auf die Enzymaktivität. Der Ablauf erfolgte wie in Abbildung 28 beschrieben.

Man erkennt bei der Auswertung der Messdaten einen sehr ähnlichen Effekt der Lösungsmittel bei allen drei untersuchten AMDasen. Ethanol und Isopropanol führten in der eingesetzten Konzentration fast zum vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Methanol reduzierte den Substratumsatz auf etwa 15% (AmdA 13±5%, AmdV 15±2%, AmdP 16±2%) im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusätze. Auffällig war die deutlich höhere Enzymaktivität in DMSO bei allen untersuchten AMDasen, auch wenn die Auswirkungen von DMSO auf die Enzymkatalyse im Einzelnen signifikant unterschiedlich waren. So führte DMSO bei den Enzymen der *Variovorax*-Stämme zu einer Halbierung der Decarboxylase-Aktivität (AmdA 48±4%, AmdV 50±4%), während das Enzym aus *Polymorphum* noch 82±7% der ursprünglichen Substratumsätze erreichte.

3.7 Klassifizierung der bekannten AMDasen

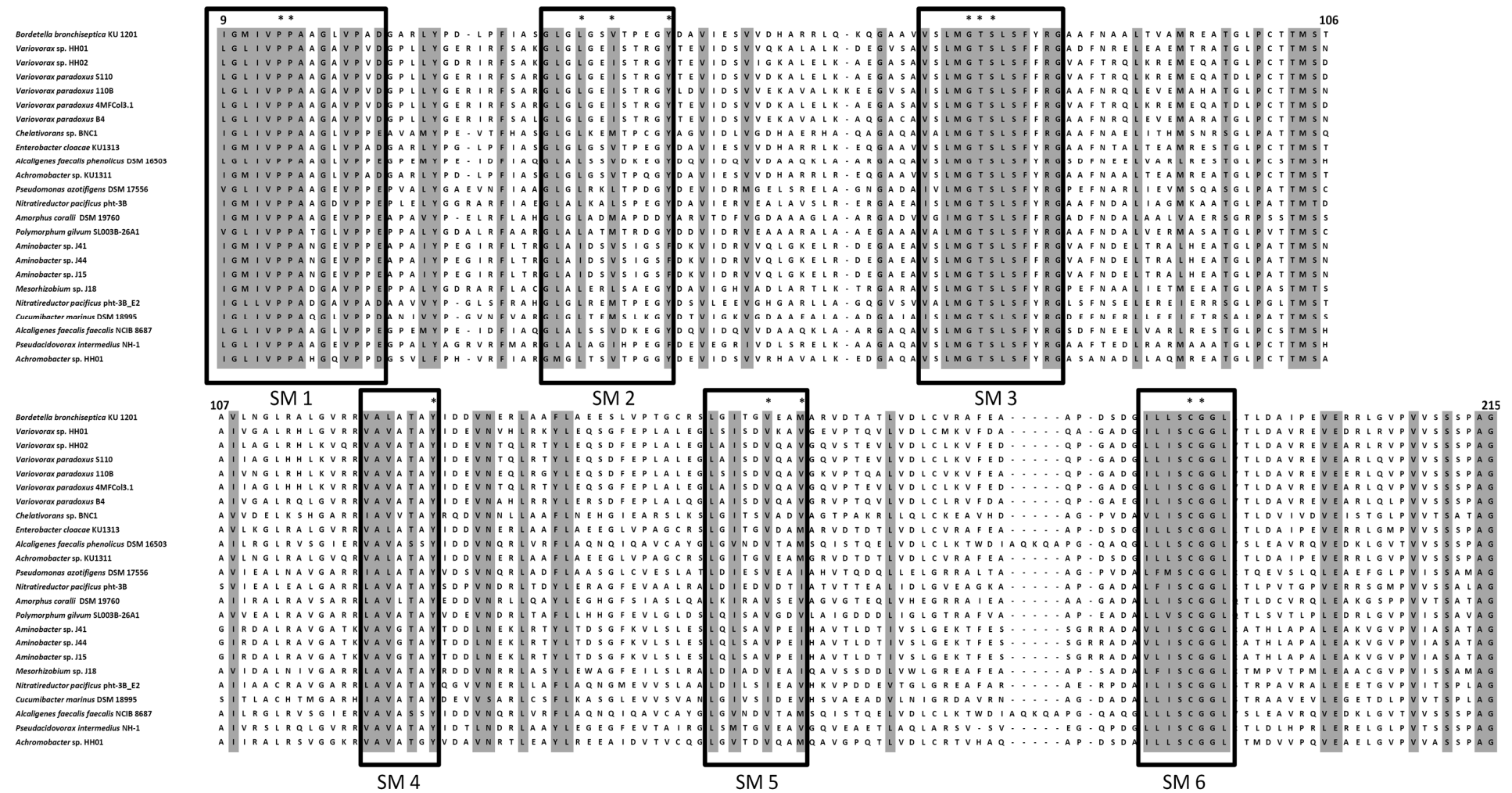
Zur Klassifizierung der bekannten AMDasen wurden (i) konservierte Sequenzmotive abgeleitet (3.7.1), (ii) das Vorkommen innerhalb der Prokaryoten betrachtet (3.7.2), sowie (iii) die Einordnung in die Enzymfamilie der Aspartat/Glutamat-Racemasen (3.7.3) vorgenommen.

3.7.1 Konservierte Sequenzmotive der AMDasen

In Abbildung 29 ist ein Aminosäuresequenz-Alignment der 24 Enzyme dargestellt, die alle 12 Suchkriterien erfüllten und daher mit großer Wahrscheinlichkeit AMDasen des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 sind. Grau unterlegte Bereiche markieren konservierte Sequenzbereiche mit identischen oder ähnlichen Aminosäuren. Katalytisch aktive Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet. Aus den konservierten Bereichen und katalytisch aktiven Aminosäuren (3.1.1) wurden sechs Sequenzmotive abgeleitet (Tabelle 10), die für AMDasen charakteristisch zu sein scheinen. Diese Sequenzmotive können bei der Suche nach weiteren Enzymen genutzt werden und eine sichere Prognose über eine AMDase-Aktivität des jeweiligen Enzyms ermöglichen. Eine ausführliche Beschreibung des Reaktionsmechanismus ist unter 1.2.2 zu finden.

Tabelle 10: Auflistung der konservierten Sequenzmotive mit katalytisch aktiven Aminosäuren der AMDasen und deren Funktionen. Kursiv geschriebene Buchstaben stehen für ähnliche oder identische Aminosäuren. Katalytisch aktive Aminosäuren (3.1.1) sind fett gedruckt. Der Buchstabe x steht für eine nicht konservierte Position innerhalb des Sequenzmotivs.

Nr.	Sequenzmotiv	Funktion der konservierten Aminosäuren
1	<i>/GLIVPPAxGxVPxD</i>	große Bindungstasche (Aromatenbindung)
2	<i>GLxLxxVxxxxY</i>	kleine Bindungstasche (Carboxylgruppe)
3	<i>VxLMGTSLSFxRG</i>	Katalytisch aktives Cys, WBB
4	<i>VAVxTxY</i>	WBB
5	<i>Lx/xxVxxM</i>	kleine Bindungstasche (Carboxylgruppe)
6	<i>LL/SCGGL</i>	Katalytisch aktives Cys, WBB



3.7.2 Vorkommen und Verbreitung der AMDasen

Aufgrund der Homologie der Aminosäuresequenzen konnten bis zum heutigen Zeitpunkt 24 putative und nachgewiesene AMDasen des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 identifiziert werden, die in 14 Bakteriengattungen zu finden sind (Abbildung 30).

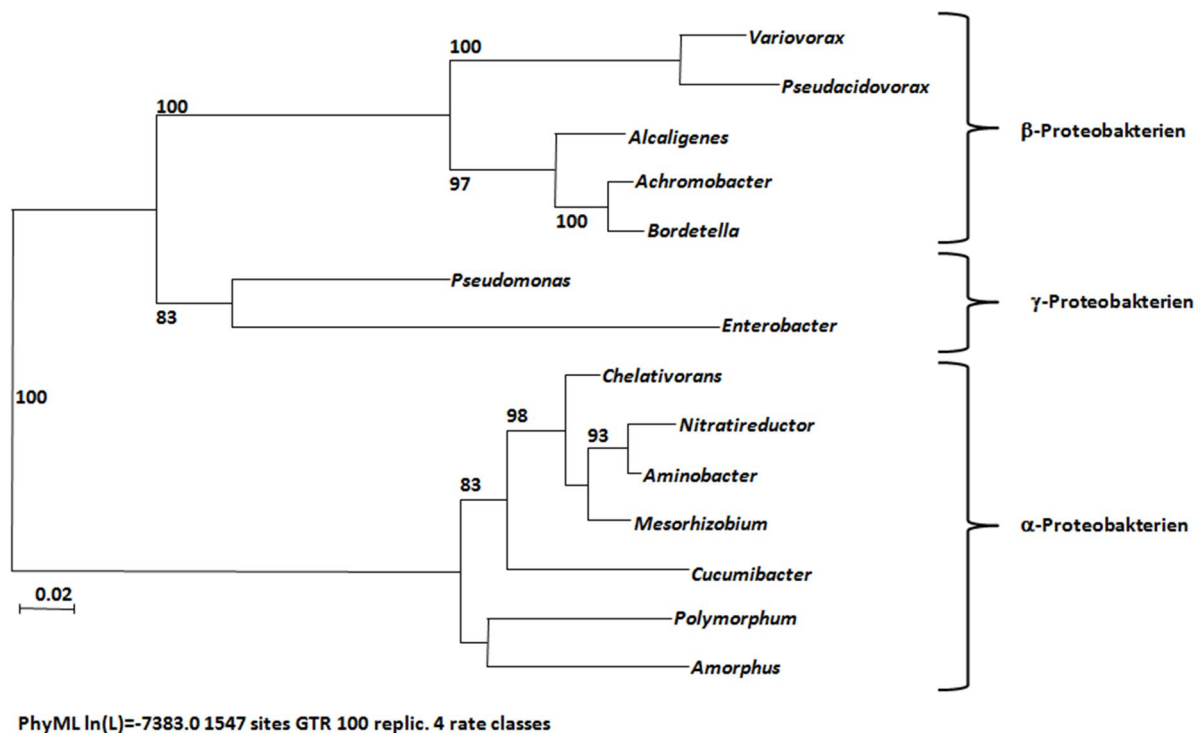


Abbildung 30: Stammbaum der Bakteriengattungen mit *amd*-Genen basierend auf den 16S-rRNA-Sequenzen. Das Alignment (ClustalW2) und der Stammbaum wurde mit Hilfe des Programms SeaView (PhyML, GTR-Mode, 2.18.18.1) erstellt. Bootstrap-Werte $\geq 80\%$ wurden angegeben. Der Maßstabsbalken entspricht 0,02 Substitutionen pro Nukleotid.

Alle Bakteriengattungen gehörten ausschließlich den Klassen der α -, β - oder γ -Proteobacteria an. Zu den α -Proteobacteria mit *amd*-Genen zählten die Gattungen *Chelativorans*, *Nitratreduktor*, *Aminobacter*, *Mesorhizobium*, *Cucumibacter*, *Polymorphum* und *Amorphus*. Sie stellten mit sieben Vertretern die größte Gruppe *amd*-kodierender Bakteriengattungen. Die β -Proteobacteria mit *amd*-Genen umfassten die Gattungen *Variovorax*, *Pseudoacidovorax*, *Alcaligenes*, *Achromobacter* und *Bordetella*. Die kleinste Gruppe bildeten die γ -Proteobacteria mit den Vertretern *Pseudomonas* und *Enterobacter*. Die Auswertung des Stammbaums (Abbildung 31) der Aminosäuresequenzen der zugrunde liegenden *amd*-Gene ergab ein ähnliches Bild.

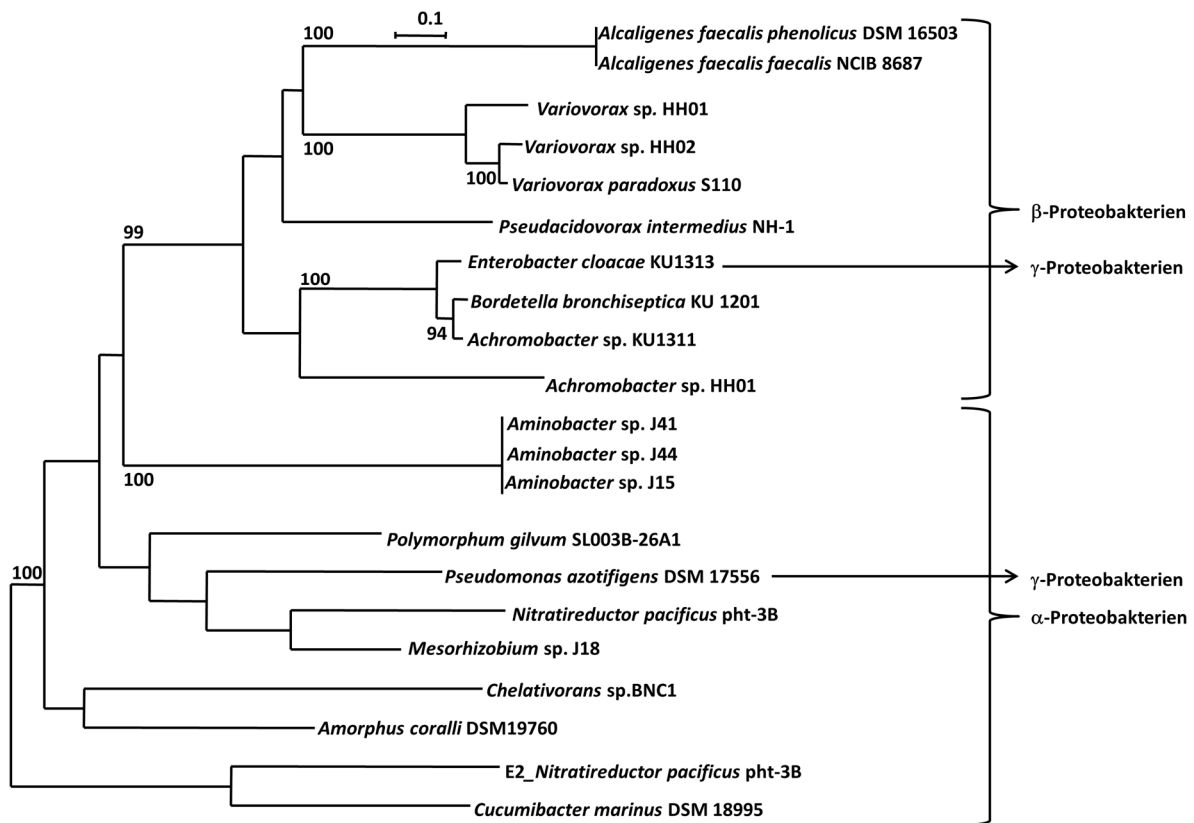


Abbildung 31: Stammbaum (PhyML, LG) putativer und bekannter AMDasen basierend auf Aminosäuresequenz-Alignment ClustalW2. Der Stammbaum wurde mit Hilfe des Programms SeaView (PhyML, 2.18.18.1) erstellt. Bootstrap-Werte $\geq 80\%$ wurden angegeben. Der Maßstabsbalken entspricht 0,1 Substitutionen pro Aminosäure. Die Aminosäuresequenzen befinden sich im Anhang.

Der Stammbaum in Abbildung 31 umfasst die bisher bekannten AMDasen der verschiedenen Bakteriengattungen. Deutlich zeigte sich die Gliederung der Äste in die Klassen der α - und β -*Proteobacteria*, während die γ -*Proteobacteria* in beiden Ästen zu finden sind. Bei den aufgeführten Stämmen handelte es um mesophile Organismen, die überwiegend aus Bodenproben stammen. *Chelativorans* sp. BNC1 und *Alcaligenes faecalis phenolicus* wurden aus Abwasserproben isoliert, *Alcaligenes faecalis faecalis* aus arsenhaltiger Desinfektionsflüssigkeit für Kühe. *Nitratireductor pacificus* pht-3B, *Cucumibacter marinus* und *Amorphus coralli* sind marinen Ursprungs. *Nitratireductor pacificus* pht-3B stammt aus Sedimenten des Pazifiks, *Cucumibacter marinus* wurde in küstennahem Meerwasser entdeckt und *Amorphus coralli* aus Schleim einer Koralle im Roten Meer isoliert.

Bei der überwiegenden Mehrheit der Bakteriengattungen wurde ein AMDase kodierendes Gen nur in der Nukleotidsequenz einer Bakterienart bzw. eines Bakterienstammes gefunden. Ausnahme bildeten die Isolate der *Aminobacter* sp. und der Gattung *Achromobacter* und *Variovorax*. Auf die Enzyme weiterer *Variovorax*-Stämme wurde in der graphischen Darstellung aus Gründen der Übersichtlichkeit allerdings verzichtet. Eine weitere

Besonderheit stellte der Stamm *Nitratireductor pacificus* pht-3B dar. Es ist das einzige Isolat, das zwei *amd*-Gene im Genom kodiert.

Um weitere Aussagen über die Verwandtschaft und Herkunft der AMDasen treffen zu können, wurde zunächst die Sequenzumgebung der einzelnen *amd*-Gene miteinander verglichen (Abbildung 32).

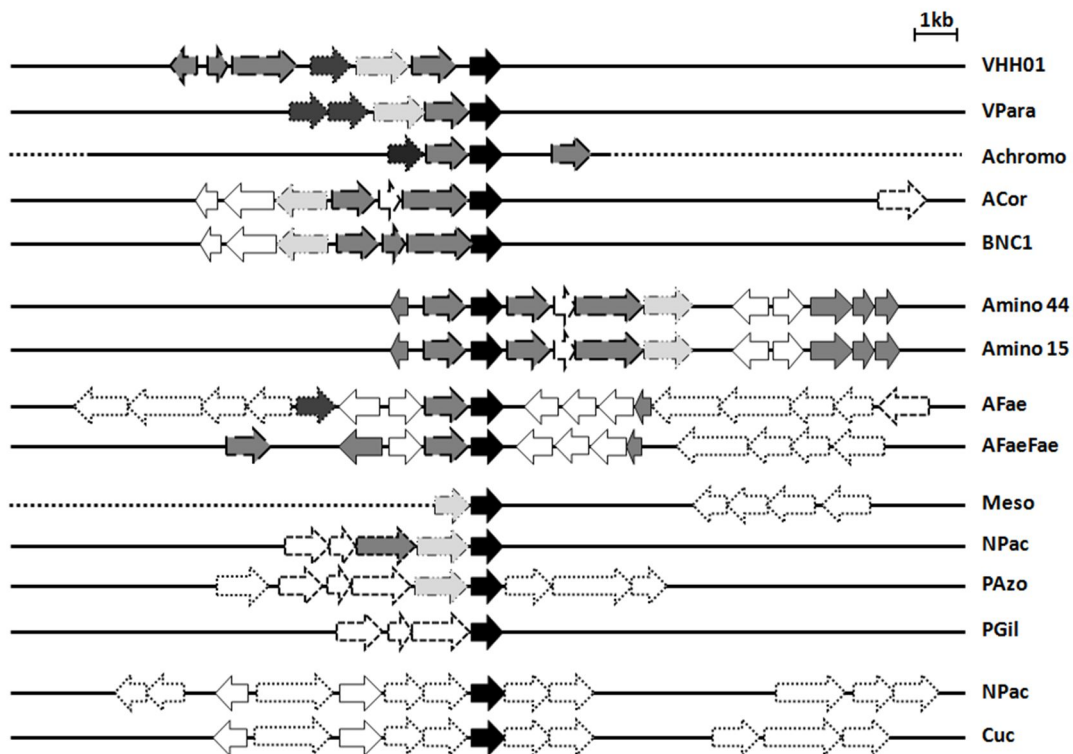


Abbildung 32: Vergleich der Sequenzumgebung der *amd*-Gene putativer und bekannter AMDasen. Abgebildet sind die Genumgebungen des Gens *amd* in den Stämmen *Variovorax* sp. HH01 (VHH01), *Variovorax paradoxus* S110 (VPara), *Achromobacter* sp. HH01 (Achromo), *Amorphus coralli* DSM19760 (ACor), *Chelativorans* sp. BNC1 (BNC1), *Aminobacter* sp. J44 (Amino 44), *Aminobacter* sp. J15 (Amino 15), *Alcaligenes faecalis phenolicus* DSM 16503 (AFae), *Alcaligenes faecalis faecalis* NCIB 8687 (AFaeFae), *Mesorhizobium* sp. J18 (Meso), *Nitratireductor pacificus* pht 3B (NPac), *Pseudomonas azotifigens* DSM 17556 (PAzo), *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 (PGil) und *Cucumibacter marinus* DSM 18995 (Cuc). Dargestellt als Pfeile sind Gene, welche für AMDasen (schwarz), putative Proteine (grau), Transkriptionsregulatoren (dunkelgrau, gepunktet) Mandelat-Racemasen/Muconat-laktisierende Enzyme (hellgrau, gepunktet/gestrichelt), ABC-Transporter (weiß, gepunktet), TRAP-Transporter (weiß, gestrichelt) und Transporter der TTT-Familie (breit gestrichelt) kodieren. Ähnliche Gene diverser Funktionen wurden als weiße Pfeile mit durchgehenden Linien abgebildet. Die gepunkteten Sequenzbereiche der Stämme *Mesorhizobium* sp. J18 und *Achromobacter* sp. HH01 sind unbekannt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur konservierte Gene dargestellt, die in mehreren Stämmen vertreten sind und eine weitere Einordnung der AMDasen ermöglichen.

In Abbildung 32 sind die Sequenzumgebungen der *amd*-Gene der einzelnen Bakterienstämmen zu sehen. Dargestellt wurden nur homologe ORFs, die in mehreren Vertretern vorkamen und eine weitere Einordnung der AMDasen ermöglichen. Ein weitverbreiteter ORF innerhalb der untersuchten Sequenzdaten der Bakterienstämmen stellte

ein Gen dar, welches für ein Mandelat-Racemase/Muconat-laktonisierendes Enzym (MR/MLE) kodierte und in 9 von 14 Genomen in der Nähe des Gens *amd* zu finden war. Mandelat-Racemasen (EC 5.1.2.2) und Muconat-Cycloisomerasen (EC 5.5.1.1) gehören zur Enolase-Superfamilie und sind am Stoffwechsel aromatischer Verbindungen beteiligt (Hasson et al. 1998). Besonders häufig waren auch ORFs, die für mögliche Gene der TTT-Familie kodierten. TTT steht für dreiteilige Tricarboxylat-Transporter (tripartite tricarboxylate transporter). Die Na⁺-abhängigen Transporter befördern u.a. Citrat und Citrat-Derivate und sind innerhalb der β -Proteobacteria weit verbreitet (Antoine et al. 2003). Desweiteren traten in der Umgebung der *amd*-Gene noch vermehrt ORFs auf, die für verschiedene ABC-Transporter (Schneider and Hunke 1998) und TRAP-Transporter kodierten. TRAP-Transporter sind dreiteilige, ATP-unabhängige, periplasmatische Transporter, die bei einer Vielzahl von Prokaryoten auftreten (Mulligan et al. 2011).

Es überrascht nicht, dass Organismen einer Art oder gar einer Gattung größere Übereinstimmung der Sequenzumgebung zeigten, wie z.B. Isolate der Gattung *Aminobacter* und *Alcaligenes*. Doch auch die Stämme *Amorphus coralli* DSM19760 und *Chelativorans* sp. BNC1, sowie *Nitratireductor pacificus* pht 3B und *Cucumibacter marinus* DSM 18995 besaßen längere Sequenzabschnitte, die für homologe Proteine kodierten. Die Sequenzen stromaufwärts der *amd*-Gene von *Amorphus coralli* DSM19760 und *Chelativorans* sp. BNC1 wiesen über eine Länge von etwa 6 kb sowohl auf Proteinebene als auch auf Nukleotidebene hohe Übereinstimmungen auf. Der Bereich kodiert putative Proteine der TTT-Familie (TctA, TctB und TctC), ein MR/MLE, eine Dehydrogenase für α -Hydroxysäuren und einen Transkriptionsregulator der MarR-Familie. Die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz lag in den in Abbildung 33 angegebenen Abschnitten bei etwa 70%.

Nitratireductor pacificus pht 3B und *Cucumibacter marinus* DSM 18995 kodierten, in unmittelbarer Umgebung zu *amd*, Untereinheiten eines ABC-Transporters für den Peptide/Nickel-Transport und ein Protein mit Ähnlichkeiten zu Alkohol-Dehydrogenasen. Auch hier gab es hohe Übereinstimmungen auf Nukleotidebene (Abbildung 33).

Die Stämme *Variovorax paradoxus* EPS, *Variovorax paradoxus* B4, *Variovorax paradoxus* S110, *Chelativorans* sp. BNC1 und *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1 sind vollständig sequenziert und tragen das AMDase kodierende Gen auf dem Bakterienchromosom. Für alle anderen Isolate konnte keine Aussage getroffen werden.

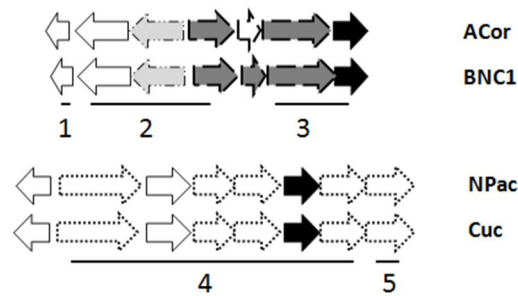


Abbildung 33: Homologe Sequenzabschnitte in unmittelbarer Umgebung von *amd*. Abgebildet sind die Genumgebungen des Gens *amd* in den Stämmen *Amorpha coralli* DSM19760 (ACor), *Chelativorans* sp. BNC1 (BNC1), *Nitratireductor pacificus* pht 3B (NPac) und *Cucumibacter marinus* DSM 18995 (Cuc). Dargestellt als Pfeile sind Gene, welche für AMDasen (schwarz), putative Proteine (grau), Mandelat-Racemasen/Muconatlaktonisierende Enzyme (hellgrau, gepunktet/gestrichelt), ABC-Transporter (weiß, gepunktet) und Transporter der TTT-Familie (breit gestrichelt) kodieren. Ähnliche Gene diverser Funktionen wurden als weiße Pfeile mit durchgehenden Linien abgebildet. Bereiche mit Übereinstimmungen der Nukleotidsequenzen wurden unterstrichen. (1) e-Value: 6×10^{-46} , Übereinstimmung: 70%, Lücken: 0%; (2) e-Value: 0, Übereinstimmung: 69%, Lücken: 3%; (3) e-Value: 0, Übereinstimmung: 74%, Lücken: 1%; (4) e-Value: 0, Übereinstimmung: 72%, Lücken: 2%; (5) e-Value: 5×10^{-66} , Übereinstimmung: 71%, Lücken: 3%. Beschriftung siehe Abbildung 32.

In Abbildung 34 wurden die Ergebnisse der vorherigen Abbildungen kombiniert. Dargestellt ist die phylogenetische Verwandtschaft der AMDasen als radialer Stammbaum unter Einbeziehung der Übereinstimmungen der Sequenzumgebungen.

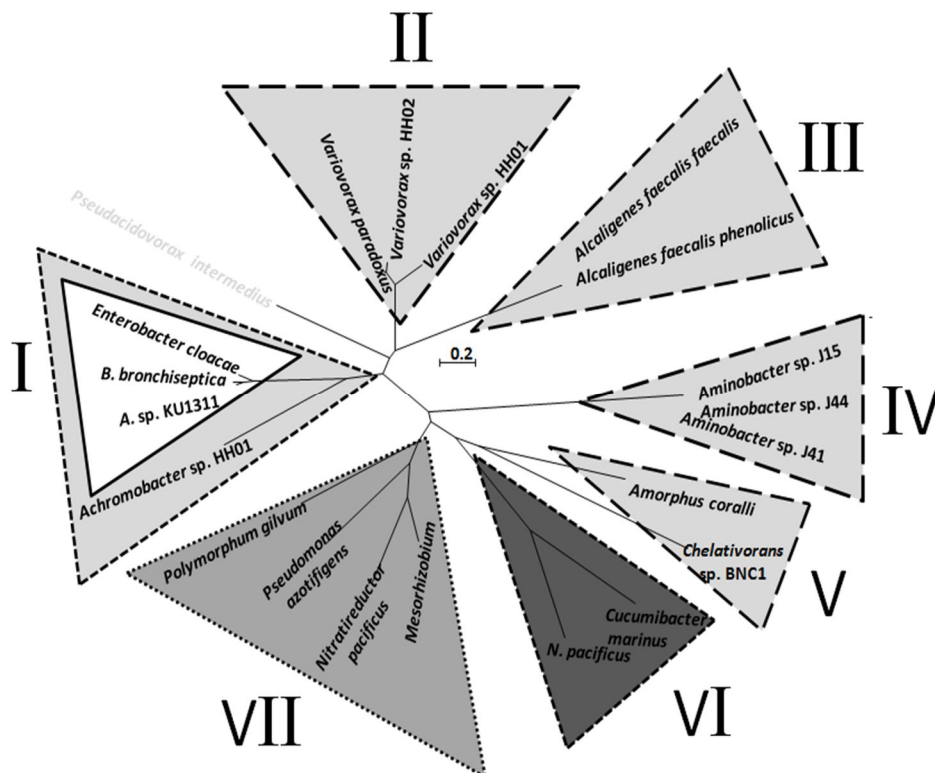


Abbildung 34: Radialer Stammbaum (PhyML, LG) der putativen und bekannten AMDasen mit möglichen Enzymclustern. Die Einteilung erfolgte aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen und der Übereinstimmung der Genumgebungen. Der Stammbaum wurde mit Hilfe des Programms SeaView (PhyML, 2.18.18.1) erstellt und basiert auf einem Aminosäure-Sequenz-Alignment mittels Clustal Omega. Beschreibung der Cluster (Dreiecke): TTT kodierende Gene nahe *amd* (hellgrau), Gene für das TRAP-System (dunkelgrau), ABC-Transporter in unmittelbarer Umgebung zu *amd* (grau und gepunktet), Cluster ohne Informationen über Sequenzumgebung (weiß). Für *Pseudoacidovorax intermedius* standen nicht genug Sequenzdaten für einen Vergleich zur Verfügung. Der Maßstabsbalken entspricht 0,2 Substitutionen pro Aminosäure.

Dies führte zur Herausbildung von sieben AMDase-Clustern. Cluster I umfasste die Stämme *Enterobacter cloacae* KU133, *Bordetella bronchiseptica* KU1201, *Achromobacter* sp. KU1311 und *Achromobacter* sp. HH01. Dies ist das einzige Cluster, für welches nur von einem Isolat Sequenzdaten aus der Umgebung der AMDase-Gene zur Verfügung standen und eine Gruppierung nur aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft getroffen werden konnte. Mit der AMDase aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 enthält das Cluster I die erste in der Literatur beschriebene und am besten charakterisierte Arylmalonat-Decarboxylase. Cluster II umfasst die verschiedenen *Variovorax*-Stämme, Cluster III die Gattung *Alcaligenes* und Cluster IV die drei ermittelten *Aminobacter*-Isolate. Cluster V setzte sich aus den Stämmen *Amorphus coralli* DSM 19760 und *Chelativorans* sp. BNC1 zusammen. Cluster I – V verschlüsseln ORFs, die Sequenzhomologien zu Proteinen der TTT-Familie aufwiesen. Cluster VI bestand aus den marinen Isolaten *Cucumibacter marinus* DSM 18995 und *Nitratireductor pacificus* pht-3B mit möglichen Genen für ABC-Transporter in der unmittelbaren Nachbarschaft zu *amd*. Cluster V und VI besaßen längere homologe Sequenzabschnitte in unmittelbarer Umgebung zu *amd*. Cluster VII umfasste die Bakterienstämme *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1, *Pseudomonas azotifigens* DSM 17556, *Nitratireductor pacificus* pht-3B und *Mesorhizobium* sp. J18, die, bis auf den letzten Vertreter, alle ORFs für putative TRAP-Transporter in der Nähe ihres AMDase-Gens kodierten. Jedoch ist die Nukleotidsequenz stromaufwärts des Gens *amd* des Stammes *Mesorhizobium* sp. J18 nicht bekannt.

3.7.3 AMDasen und ihre nächsten Verwandten

AMDasen gehören zur Protein-Superfamilie der Aspartat/Glutamat-Racemasen. Diese Gruppe umfasst Glutamat-Racemasen (EC 5.1.1.3), Aspartat-Racemasen (EC 5.1.1.13), Hydantoin-Racemasen (EC 5.1.99.5) und Maleat *cis-trans* Isomerasen (EC 5.2.1.1). Ein Stammbaum der AMDasen und ihrer nächsten Verwandten ist in Abbildung 35 zu sehen. Vertreter der AMDasen sind schwarz unterlegt. Ectoin verwertende Proteine (EutA) sind in grauer Schrift dargestellt und grau unterlegt. Glutamat-Racemasen (GR), Aspartat-Racemasen (AR) und Hydantoin-Racemasen (HR) sind in unterschiedlichen Grautönen hervorgehoben und werden zur Gruppe der Asp/Glu/Hyd-Racemasen zusammengefasst. Zu den Maleat *cis-trans* Isomerasen (MI) zählen u.a. AMDasen (EC 4.1.1.76) und Ectoine verwertende Proteine. Die Maleat *cis-trans* Isomerasen bilden zwei Cluster. Cluster 1 besteht aus Enzymen der Organismen *Alcaligenes faecalis*, *Geobacillus stearothermophilus*,

Pseudomonas putida, *Serratia marcescens*, *Nitratireductor indicus* und *Streptomyces bingchenggensis*, wobei die Enzyme der Stämme *Alcaligenes faecalis*, *Geobacillus stearothermophilus* und *Pseudomonas putida* biochemisch charakterisiert sind. Cluster 2 umfasst ausschließlich putative Maleat *cis-trans* Isomerasen der Gattungen *Thermococcus* und *Pyrococcus*. Diese Gruppe zeigte die größte Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen mit Arylmalonat-Decarboxylasen.

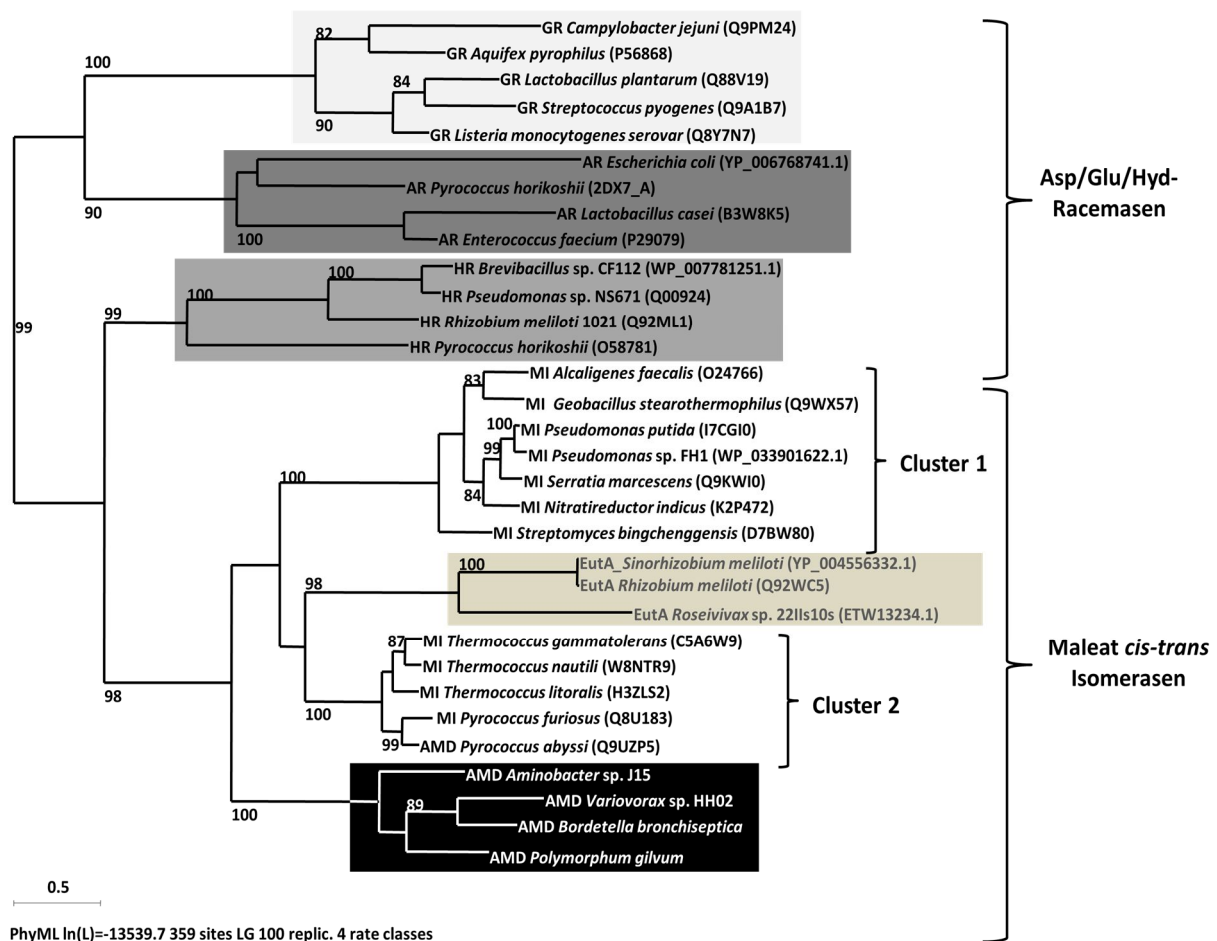


Abbildung 35: Stammbaum der AMDAsen und ihrer nächsten Verwandten. Vertreter der AMDAsen (AMD) sind schwarz unterlegt. Glutamat-Racemasen (GR), Aspartat-Racemasen (AR) und Hydantoin-Racemasen (HR) sind in unterschiedlichen Grautönen hervorgehoben. Ecto-in verwertende Proteine (EutA) sind in grauer Schrift dargestellt und grau unterlegt. Der Stammbaum wurde mit Hilfe des Programms SeaView (PhyML, LG, 2.18.18.1) erstellt. Bootstrap-Werte $\geq 80\%$ wurden angegeben. Der Maßstabsbalken entspricht 0,5 Substitutionen pro Aminosäure. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur einige Vertreter der Superfamilie ausgewählt. Die Aminosäuresequenzen der AMDAsen befinden sich im Anhang. Die Identifizierungsnummern der übrigen Proteine sind in Klammern angegeben.

Ein Vergleich der Sequenzumgebung der AMDAsen und putativen MI brachte keine homologen Sequenzabschnitte zu Tage. Die Abbildung 36 zeigt, welche der Aminosäuren innerhalb der konservierten Sequenzmotive für AMDAsen spezifisch sind. Für die Katalyse entscheidende Aminosäuren wurden fett gedruckt. Kursiv gedruckte Buchstaben stehen für

ähnliche Aminosäuren. Konservierte Aminosäuren, die mit einem Stern markiert wurden, sind für AMDasen spezifisch.

1 <i>I</i> GLIV PP AxGxVPxD	4 VAVxTx Y
2 GLxLxx V xxxx Y	5 Lx/xx V xx M
3 VxLM GT SLSF x RG	6 LL IS CGGL

Abbildung 36: AMDase-spezifische Aminosäuren innerhalb der konservierten Sequenzmotive. Für die Katalyse entscheidende Aminosäuren wurden fett gedruckt. Kursiv gedruckte Buchstaben stehen für ähnliche Aminosäuren. Konservierte Aminosäuren, die mit einem Stern markiert wurden, sind für AMDasen spezifisch. Es wurde die Annahme getroffen, dass die ausgewählten Vertreter repräsentativ für die jeweilige Enzymgruppe sind.

Das Alignment der in Abbildung 35 verwendeten Sequenzen brachte sechs AMDase-spezifische Aminosäuren zu Tage (Abbildung 36). Die mögliche Funktion einzelner konservierter Aminosäuren während des postulierten Reaktionsmechanismus ist in Okrasa et al. 2008 näher beschrieben. Pro14 und Pro15 in Sequenzmotiv 1 bilden die große Bindungstasche für den aromatischen Rest des Substrats. Die Seitenkette des Pro14 befindet sich im optimalen Abstand zur Amidbindung zwischen Glyc189 und Gly190 des Sequenzmotivs 6, um durch van der Waals-Wechselwirkungen den aromatischen Rest des Substrats zu stabilisieren. Diese Aminosäurenabfolge ist für AMDasen spezifisch. Weiterhin charakteristisch ist das Glyc74 (Sequenzmotiv 3), anstelle eines zweiten katalytisch aktiven Cysteins der Racemasen, welches die Enantioselektivität der AMDasen begründet. Den AMDase-spezifischen Aminosäuren Pro21 (Sequenzmotiv 1), Glyc37 (Sequenzmotiv 2) und Arg81 (Sequenzmotiv 3) wurden bisher keine katalytischen Funktionen zugeordnet. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die AMDase des Stammes *Bordetella bronchiseptica* KU1201.

Die Auswertung der bisherigen Ergebnisse verdeutlichte, dass AMDasen extrem seltene Enzyme sind, die hauptsächlich innerhalb der α - und β -*Proteobacteria* vorkommen. Es handelte sich um mesophile Organismen, die Größtenteils aus Bodenproben stammen. Meist gibt es nur einen Vertreter innerhalb einer Gattung, mit Ausnahme der Gattungen *Alcaligenes*, *Aminobacter* und *Variovorax*. Auf das Vorkommen der AMDasen innerhalb der Gattung *Variovorax* wird im folgenden Abschnitt (3.8) eingegangen. Der Vergleich der Genumgebung zeigte, dass gehäuft Gene kodierend für Mandelat-Racemasen/Muconat-laktonisierende Enzyme, ABC-Transporter, TRAP-Transporter und Transporter der TTT-

Familie in unmittelbarer Nähe zu AMDase-Genen auftreten. Die Homologie der Aminosäuresequenzen und die Übereinstimmungen der Sequenzumgebungen erlaubten die Einteilung in sieben putative Enzymcluster. Der Vergleich der AMDasen mit Vertretern der Asp/Glu-Racemase-Familie zeigte die nahe Verwandtschaft zu Maleat *cis-trans* Isomerasen und ermöglichte die Aufdeckung AMDase-spezifischer Sequenzmotive. Die konservierten Aminosäuresequenzmotive, mit besonderer Beachtung der AMDase-spezifischen Aminosäuren innerhalb dieser Motive, erlauben eine zuverlässige Annotation weiterer AMDase-Gene des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica*.

3.8 AMDasen innerhalb der *Variovorax*-Gattung

3.8.1 Die Gattung *Variovorax*

Die Gattung *Variovorax* gehört zu der Klasse der β -*Proteobacteria* und umfasst zum heutigen Zeitpunkt sechs Arten: *Variovorax paradoxus* (Willems et al. 1991), *Variovorax boronicumulans* (Miwa et al. 2008), *Variovorax ginsengisoli* (Im et al. 2010), *Variovorax dokdonensis*, *Variovorax defluvii* (Jin et al. 2012) und *Variovorax soli* (Kim et al. 2006). Ein Stammbaum, basierend auf 16S rRNA-Sequenzen, ist in Abbildung 37 zu sehen. Bei dem Isolat *Variovorax* sp. HH01 handelt es sich wahrscheinlich um einen *Variovorax paradoxus*, während der Stamm *Variovorax* sp. HH02 vermutlich zu der Art *Variovorax boronicumulans* zählt. Genomsequenzen standen bisher nur von *Variovorax paradoxus*-Stämmen zur Verfügung. Die Gattung *Variovorax* wurde bereits in diversen Lebensräumen nachgewiesen. So wurden *Variovorax*-Stämme u.a. aus Abwasser (Jin et al. 2012), Pflanzen (Han et al. 2011), der menschlichen Mundhöhle (Anesti et al. 2005), der Tiefsee (Dul'tseva et al. 2012) und Bodenproben (Kim et al. 2006; Yoon et al. 2006; Miwa et al. 2008) isoliert. Es handelt sich um stäbchenförmig, aerobe, nicht sporulierende Bakterien, die im mesophilen Temperaturbereich wachsen. Kennzeichnend ist das große Substratspektrum dieser Organismen, welches auch chemische Verbindungen wie Acrylamid (Liu et al. 2013), Neonicotinoid-Insektizide wie Thiacloprid (Zhang et al. 2012) und AHLs (Leadbetter and Greenberg 2000) umfasst.

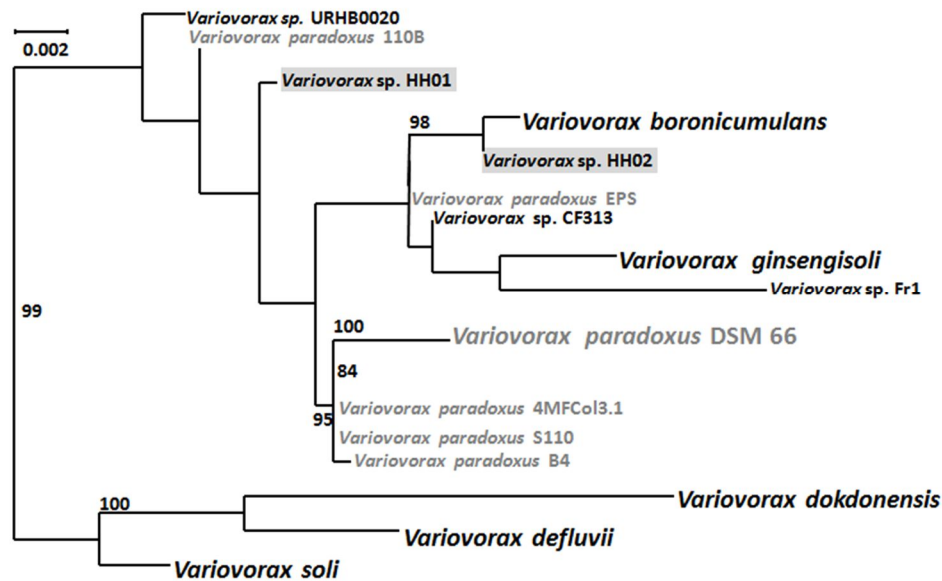


Abbildung 37: Stammbaum der Gattung *Variovorax*. Die verschiedenen *Variovorax*-Arten (Typstämme) sind groß hervorgehoben. Stämme der Gattung *Variovorax paradoxus* sind in grauer Schrift dargestellt. Die Isolate *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02 sind grau unterlegt. Der Stammbaum wurde mit Hilfe des Programms SeaView (PhyML, GTR, 2.18.18.1) erstellt. Bootstrap-Werte $\geq 80\%$ wurden angegeben. Der Maßstabsbalken entspricht 0,002 Substitutionen pro Nukleotid. GenBank Accession numbers der verwendeten 16S rRNA-Gene sind: AJ420329.1 (*Variovorax paradoxus*), AB300597.1 (*Variovorax boronicumulans*), AB245358.1 (*Variovorax ginsengisoli*), DQ178978.1 (*Variovorax dokdonensis*), HQ385753.1 (*Variovorax defluvii*) und DQ432053.1 (*Variovorax soli*). Die restlichen Sequenzdaten wurden der IMG-Datenbank entnommen.

3.8.2 Genomsequenzierung der Isolate *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02

Für die Genomsequenzierung der Isolate *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02 wurde genomische DNA isoliert (2.18.2) und eine Illumina-GAII-Sequenzierung der Proben durch Dr. Anja Pöhlein und Mitarbeiter (G2L, Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland) vorgenommen (2.18.17.2). Sequenzdaten wurden anschließend auf der IMG Plattform (Markowitz, 2014) zur Verfügung gestellt. Die IMG Datenbank (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>) umfasst zum jetzigen Zeitpunkt 23.971 Genome, darunter Bakterien, Archaeen, Eukaryoten und Viren. Für die Gattung *Variovorax* sind die Sequenzdaten 20 verschiedenen *Variovorax*-Stämmen zugänglich. Die Genome der Isolate *Variovorax paradoxus* S110, *Variovorax paradoxus* EPS und *Variovorax paradoxus* B4 sind vollständig sequenziert. Die Sequenzdaten sechs weiterer Stämme liegen als „permanent drafts“ bzw. „drafts“ vor und umfassen mindestens 6 mio bp, was schätzungsweise 80%-90% der Sequenzinformation der kompletten Genome ausmacht. Zu diesen Stämmen gehören *Variovorax paradoxus* 110B, *Variovorax paradoxus* 4MFC03.1, *Variovorax* sp. CF313, *Variovorax* sp. URHB0020, *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02. Ein Überblick über die letzten beiden Isolate ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Sequenzierungsdetails der Genome von *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02.

Stamm	<i>Variovorax</i> sp. HH01		<i>Variovorax</i> sp. HH02	
Ursprung des Isolates	Bodenprobe Botanischer Garten Duisburg		Bodenprobe Botanischer Garten Duisburg	
Sequenzierungsmethode	Illumina GAii		Illumina GAii	
Sequenzierungszentrum	Goettingen Genomics Laboratory		Goettingen Genomics Laboratory	
Sequenzierungsstatus	draft		draft	
Assembly	De-novo-Assemblierung mit paired- end reads		De-novo-Assemblierung mit paired- end reads	
DNA Scaffolds	281		174	
	bp	Prozent [%]	bp	Prozent [%]
Gesamt-DNA [bp]	6525159	100	7152209	100
Anzahl kodierender DNA-Basen	5947824	91,2	6581402	92
GC-Gehalt [mol%]	4423653	67,8	4866451	68
Gesamtzahl der Gene	6255	100	6665	100
Gesamtzahl Protein kod. Gene	6185	98,9	6597	99
davon mit Funktionsvorhersage	5087	81,3	5546	83,2
davon hypothetische Proteine	1098	17,6	1051	15,8
RNA-Gene kodierend für				
5S rRNA	1	0,02	1	0,02
16S rRNA	1	0,02	1	0,02
23S rRNA	1	0,02	2	0,03
tRNAs	51	0,82	50	0,75
weitere RNAs	16	0,26	14	0,2

Nach der De-novo Assemblierung mit paired end reads standen für *Variovorax* sp. HH01 6,5 mio bp an Sequenzdaten zur Verfügung, verteilt auf 281 Scaffolds. Der Anteil an kodierenden Basen betrug 91,2%. Der GC-Gehalt des Stammes lag bei 67,8%. Die Einteilung der putativen Proteine in COGs ist in Abbildung 38 dargestellt. COGs sind Cluster orthologer Gruppen von Proteinen (Tatusov et al. 2003). Von 6185 Protein kodierenden ORFs konnten 4322 putative Proteine in 22 COGs eingeordnet werden. 77% der Proteine wurden mögliche Funktionen zugeordnet, während bei 23% nur eine allgemeine Funktionsvorhersage (12%) getroffen werden konnte bzw. die Funktion unbekannt (11%) war. Neben den beiden zuletzt genannten Clustern, stellten die Proteine für Aminosäuretransport und –metabolismus (11%), sowie Proteine, zuständig für die Transkription (9%) die Gruppen mit den meisten Vertretern. Die AMDase gehörte zum Cluster Biosynthese, Transport und Katabolismus von Sekundärmetaboliten, welche 189 Proteine umfasste.

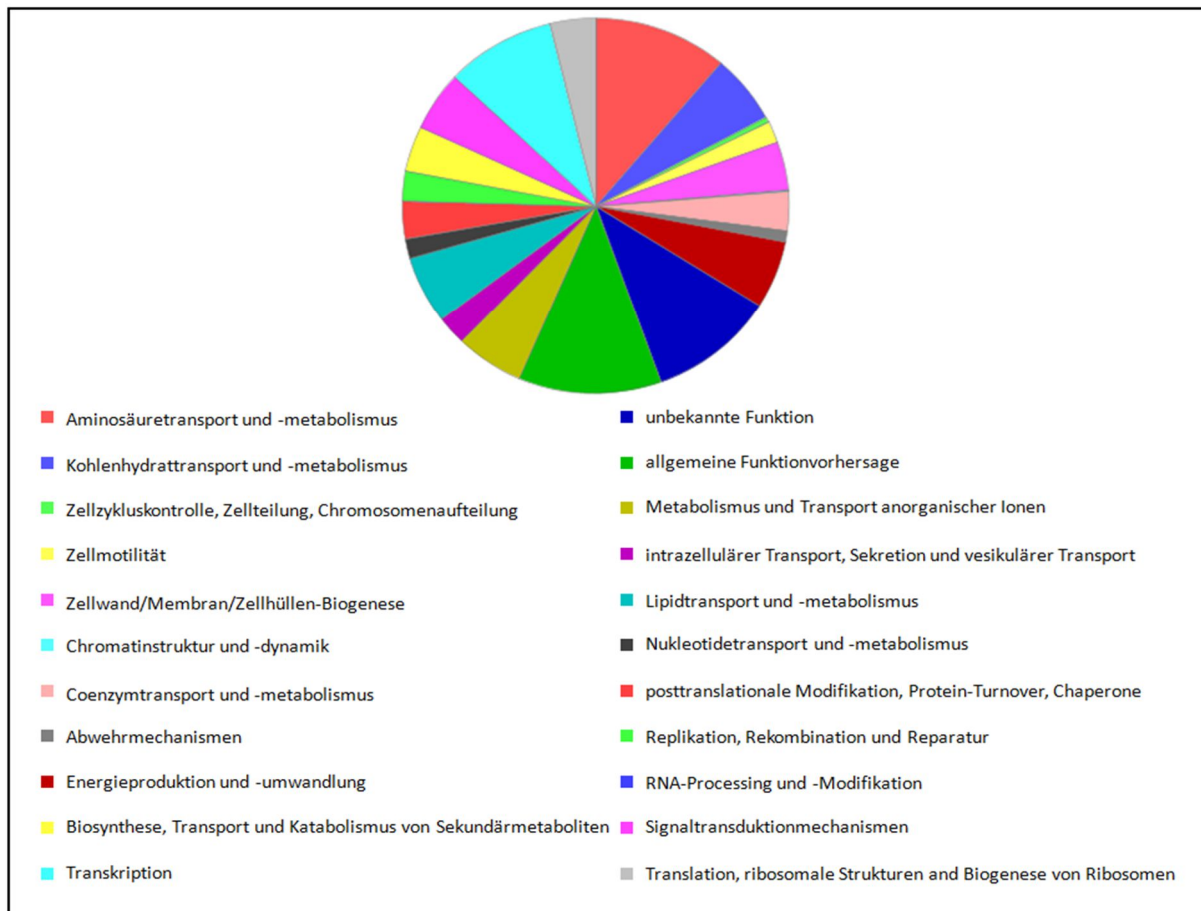


Abbildung 38: Funktionsvorhersage für putative Proteine des *Variovorax* sp. HH01 basierend auf der COG-Datenbank.

Die Sequenzierung des Stammes *Variovorax* sp. HH02 ergab 174 Scaffolds mit insgesamt 7,2 mio bp. Der Anteil an kodierenden Basen betrug 92%. Der GC-Gehalt des Stammes lag bei 68%. Die Einteilung in COGs ergab bei beiden Stämmen ein ähnliches Bild (Abbildung 38 und Abbildung 39). Von 6597 Proteinen wurden 4322 in 23 COGs eingeordnet. Die größten Gruppen stellten, genau wie bei *Variovorax* sp. HH01, Proteine mit allgemeiner Funktionsvorhersage (12%), Proteine, deren Funktion unbekannt (11%) war, Proteine für Aminosäuretransport und -metabolismus (11%), sowie Proteine, zuständig für die Transkription (10%). Diese Verteilung konnte auch in den restlichen *Variovorax*-Stämmen beobachtet werden.

Zusätzlich zu den 22 COGs, die bei *Variovorax* sp. HH01 vorkamen, kodierte *Variovorax* sp. HH02 ein Protein mit RCC1 Domänen, eingeordnet im Zytoskelett-Cluster. RCC1 ist ein eukaryotisches Kernprotein, welches an der Regulation der Chromosomenkondensation beteiligt ist. Eng verwandt mit der RCC1-Proteinfamilie sind die β -Lactamase-Inhibitorproteine II (BLIP-II) (Park and Lee 1998). Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz mit einem BLIP-II aus *Streptomyces exfoliatus* (GenBank: AAC35427.1) lag jedoch nur bei 44% bei

einem e-Value von 10^{-21} . Der ORF war in keinem der Genome der anderen *Variovorax*-Stämme zu finden.

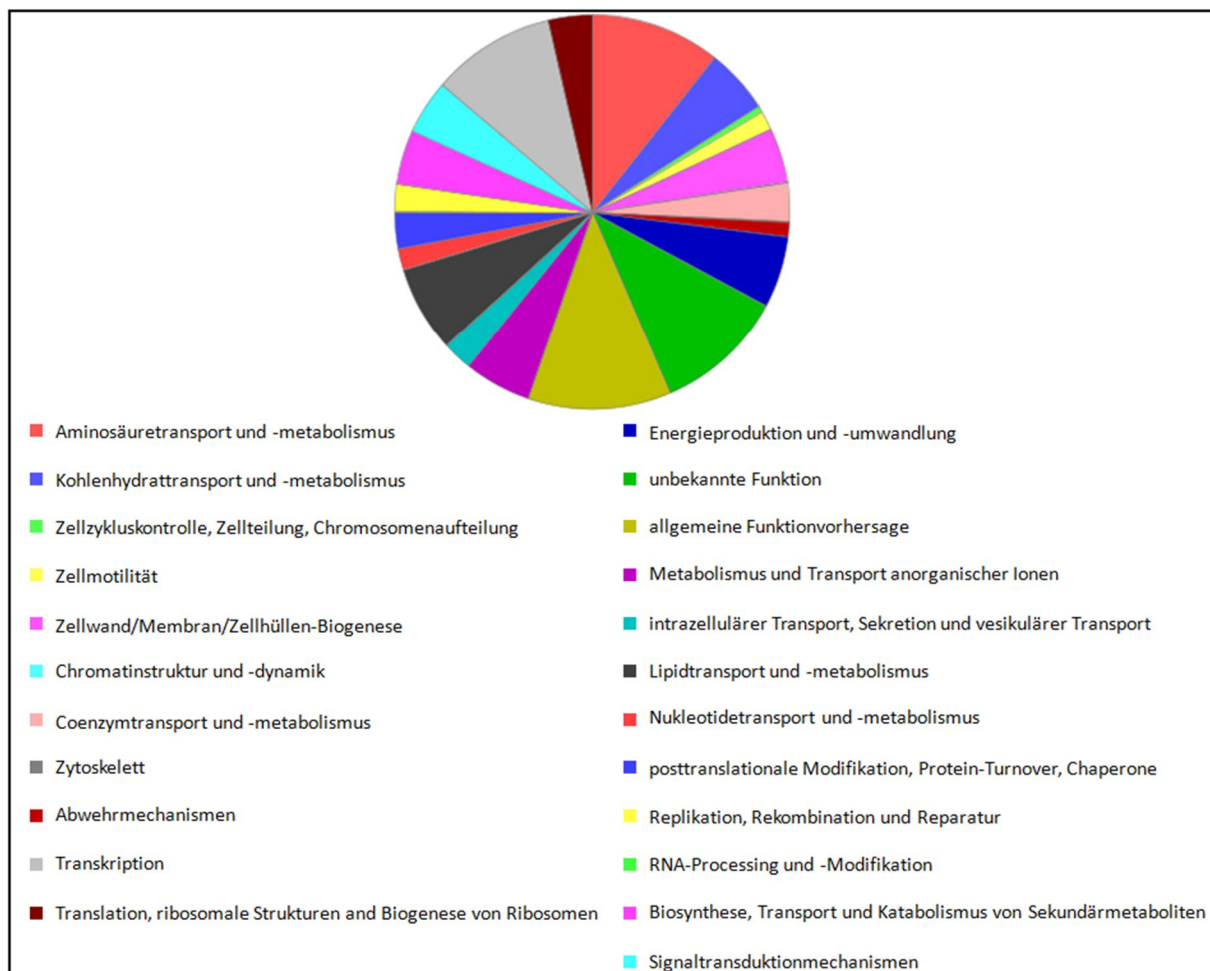


Abbildung 39: Funktionsvorhersage für putative Proteine des *Variovorax* sp. HH02 basierend auf der COG-Datenbank.

Abbildung 40 zeigt „Synteny Dot Plots“ verschiedener *Variovorax*-Stämme. Als Syntenie versteht man in der Genomik homologe Gene und Genomabschnitte in verschiedenen Organismen, die auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung hindeuten. *Variovorax paradoxus* S110 und *Variovorax paradoxus* EPS wiesen lange homologe Abschnitte ihrer Bakterienchromosomen auf, wobei nur einige wenige Abschnitte invers orientiert waren. Homologe Bereiche zwischen dem Plasmid des Stammes *Variovorax paradoxus* S110 und Sequenzabschnitten im Genom von *Variovorax paradoxus* EPS waren nicht zu finden. Auch bei *Variovorax paradoxus* S110 und *Variovorax paradoxus* B4 gab es lange homologe Abschnitte ihrer Bakterienchromosomen mit einem kleineren inversen Sequenzabschnitt in der Mitte der DNA-Moleküle. Beide Stämme besitzen

zusätzlich zu ihrem Bakterienchromosom extrachromosomale DNA. Die Plasmide zeigten längere homologe, jedoch inverse Sequenzabschnitte.

Lange homologe Bereiche ergaben sich beim Vergleich der Nukleotidsequenzen von *Variovorax* sp. HH02 und *Variovorax paradoxus* EPS, unterbrochen durch einen kurzen inversen Bereich. Dies deckte sich mit dem Ergebnis des 16S rRNA-Gensequenzvergleichs in Abbildung 37. Auch *Variovorax paradoxus* S110 und *Variovorax* sp. HH01 teilten lange homologe Abschnitte, jedoch fanden sich keine größeren Sequenzübereinstimmungen mit dem Plasmid des Stammes *Variovorax paradoxus* S110. Einzelne Plasmid-kodierte Gene scheinen über das Genom des Isolates *Variovorax* sp. HH02 verstreut zu sein. Ein sehr ähnliches Bild ergab sich beim Vergleich der beiden *Variovorax paradoxus*-Stämme mit *Variovorax* sp. HH01.

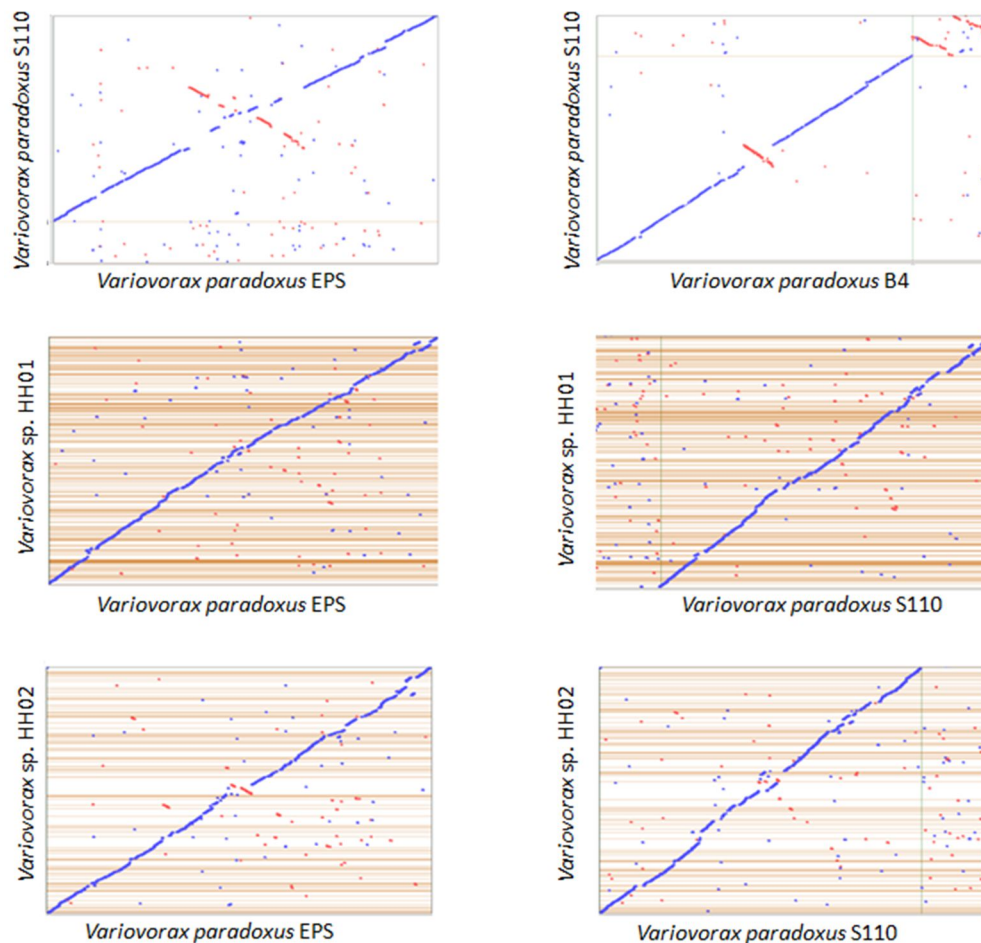


Abbildung 40: Synteny-Dot-Plots der Nukleotidsequenzen verschiedener *Variovorax*-Stämme. Zur Erstellung der Dot Plots wurde die IMG-Plattform (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>) genutzt, die mit Hilfe der Software MUMmer den Vergleich zweier Genome ermöglicht. Die zu vergleichenden Stämme sind auf die Achsen aufgetragen. Durchgezogene, orange oder grüne Linien trennen unterschiedliche DNA-Scaffolds der einzelnen Stämme voneinander. Blaue Punkte stehen für putativ homologe Bereiche innerhalb des Genoms, rote Punkte deuten auf identische, aber inverse Abschnitte innerhalb der Genome hin.

3.8.3 Vorkommen der AMDase-Gene innerhalb der Gattung *Variovorax*

Ein Vergleich der Genumgebung der *amd*-Gene verschiedener *Variovorax paradoxus*-Stämme und der Isolate *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02 ist in Abbildung 41 zu sehen. Die Sequenzdaten wurden der IMG-Datenbank entnommen. Auf den ersten Blick wird deutlich, dass die Sequenzumgebung des *amd* bei allen Stämmen stark konserviert ist. In unmittelbarer Nähe zu den AMDase-Genen befanden sich stromaufwärts Gene, kodierend für einen Transkriptionsregulator der LysR-Familie (12), ein Mandelat Racemase/Muconat lactonisierendes Enzyme (13) und ein hypothetisches Protein, mit Übereinstimmungen zu Proteinen der TTT-Familie (TctC) (14). Stromabwärts kodierten Gene für ein MmgE/PrpD Family Protein (16), ein Acyl-CoA Dehydrogenase-Domäne enthaltendes Protein (17) und eine Citrat Synthase (18).

Variovorax sp. HH01 fehlte stromabwärts des AMDase-Gens der Sequenzabschnitt vom Citrat-Synthase kodierenden Gen (17) bis zum Gen, kodierend für DUF1486, ein konserviertes Protein unbekannter Funktion (22). Stromabwärts des ORFs 6 waren keine Gene kodierend für eine „Short-Chain Dehydrogenase/Reductase“ (7) und den zweiten Transkriptionsregulator (LysR-Familie) zu finden. An dieser Stelle kodieren Gene für einen Zwei-Komponenten-Transkriptionsregulator (25) und eine Histidin Kinase (26), sowie für zwei kleine (TctB) und ein großes Transmembranprotein (TctA).

Die Genanordnung des Stammes *Variovorax* sp. HH02 gleicht stromaufwärts des Gens *amd* den restlichen *Variovorax paradoxus*-Stämmen. Stromabwärts des AMDase-Gens sind keine Sequenzdaten vorhanden.

Der Bereich von ORF 12 bis ORF 15, der das Gen kodierend für einen LysR-Regulator bis zum AMDase-Gen umfasste, fehlte in den Stämmen *Variovorax paradoxus* EPS und *Variovorax paradoxus* sp. CF313 vollständig. Bei *Variovorax* sp. URHB0020 konnte nur der Sequenzabschnitt von ORF 1 bis ORF 6 gefunden werden. Der Sequenzbereich stromabwärts dieser ORFs ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht im Genom enthalten. Es ist davon auszugehen, dass die Stämme *Variovorax* sp. URHB0020, *Variovorax paradoxus* EPS und *Variovorax paradoxus* sp. CF313 keine AMDase-Aktivität aufweisen.

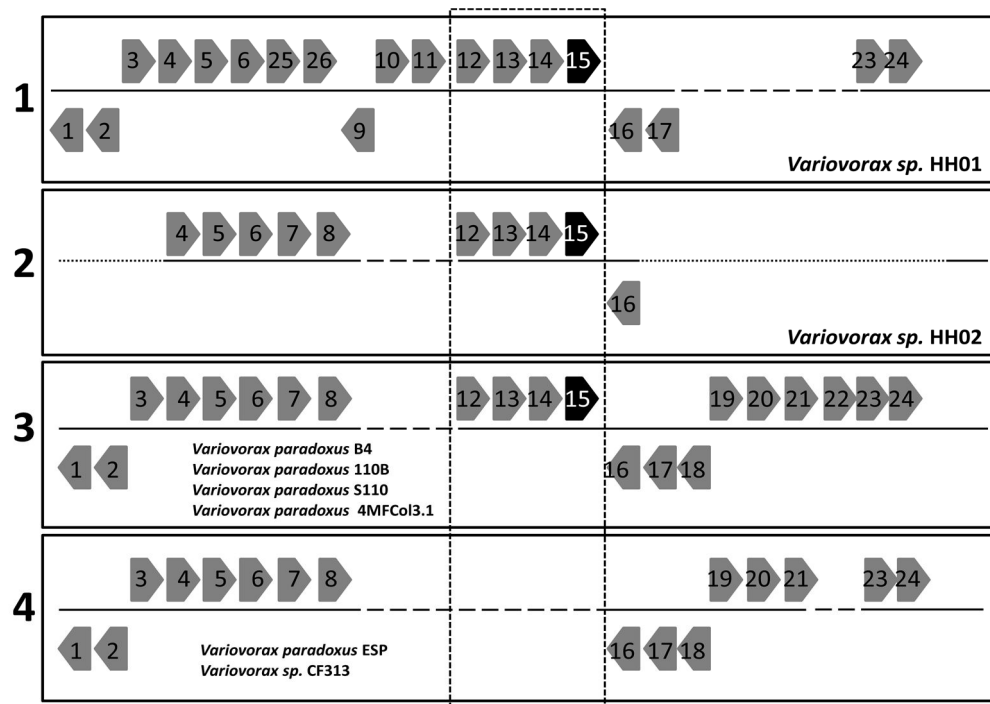


Abbildung 41: Vergleich der Genumgebung verschiedener *Variovorax*-Stämme. Die schematische Darstellung zeigt Gene (Pfeile) kodierend für: UTP-Glukose-1-Phosphat Uridyltransferase (1), Valyl-tRNA Synthetase (2), hypothetisches Protein (3), Procollagen-Prolin Dioxygenase (4), Protein mit α/β -Hydrolase-Faltung (5), 7-Cyano-7-Deazaguanin Reductase (6), „Short-Chain Dehydrogenase/Reductase“ (7), Transkriptionsregulator, LysR-Familie (8), hypothetisches Protein (TctB) (9), hypothetisches Protein (TctB) (10), hypothetisches Protein (TctA) (11), Transkriptionsregulator, LysR-Familie (12), Mandelat Racemase/Muconat lactonisierendes Enzyme (13), hypothetisches Protein (TctC) (14), Arylmalonat-Decarboxylase (15), MmgE/PrpD Family Protein (16), Acyl-CoA Dehydrogenase-Domäne enthaltendes Protein (17), Citrat Synthase (18), Acyl-CoA Dehydrogenases-Domäne enthaltendes Protein (19), hypothetisches Protein (TctC) (20), Acyl-CoA Synthetase (21), DUF1486, Protein unbekannter Funktion (22), DUF 3606, Protein unbekannter Funktion (23), hypothetisches Protein (24), Zwei-Komponenten-Transkriptionsregulator (25), Histidin Kinase (26).

Um Hinweise auf das Vorhandensein des Gens *amd* in den anderen *Variovorax*-Arten zu erhalten, wurden die Typstämme aller *Variovorax*-Arten mittels pH-abhängigem Indikatortest (2.11) auf ihre AMDase-Aktivität untersucht. In Abbildung 42 sind AMDase-aktive *Variovorax*-Stämme bzw. Stämme mit einem *amd*-Gen und Stämme, bei denen dieses Gen fehlte, markiert. Der Stammbaum basiert auf 16S rRNA-Gensequenzen. Es wird deutlich, dass das AMDase-Gen innerhalb der *Variovorax paradoxus*-Art sehr verbreitet ist. *Variovorax boronicumulans* zeigte im Plattentest eine deutliche AMDase-Aktivität. Die Typstämme der Arten *Variovorax dokdonensis*, *Variovorax defluvii* und *Variovorax soli* bilden einen separaten Ast innerhalb des phylogenetischen Baums, wobei nur *Variovorax dokdonensis* beim Plattentest (2.11) eine Enzymaktivität aufwies. Die Arten *Variovorax defluvii* und *Variovorax soli* zeigten keine nachweisbare AMDase-Aktivität. Auch im Genom des Stammes *Variovorax* sp. URHB0020, vermutlich zur Art *Variovorax paradoxus* zählend, konnte kein *amd*-Gen aufgespürt werden.

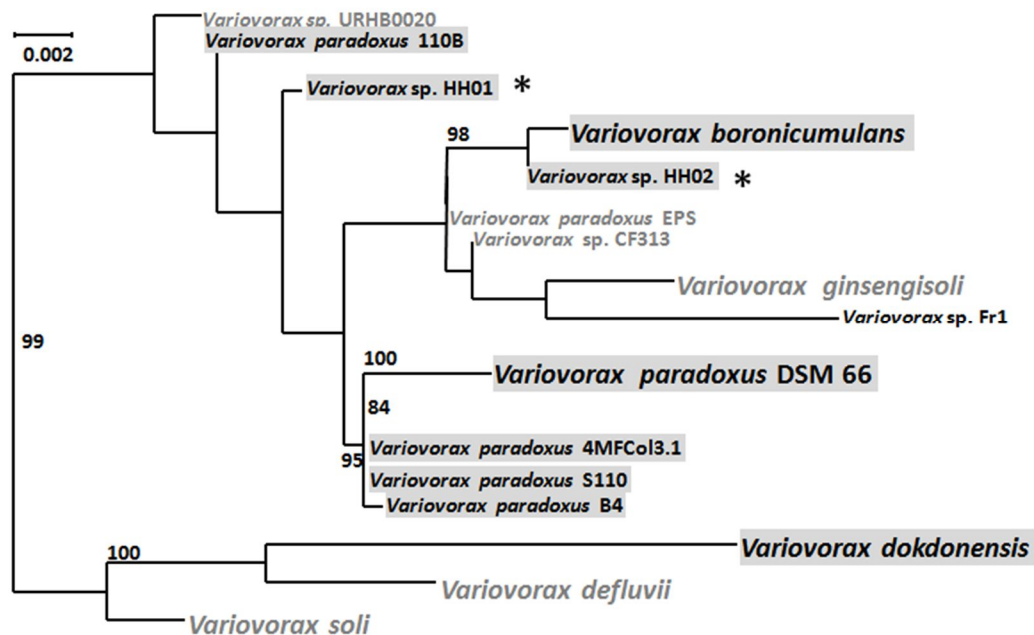


Abbildung 42: Stammbaum der Gattung *Variovorax* basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen. Die verschiedenen *Variovorax*-Arten (Typstämme) sind groß hervorgehoben. AMDase aktive Stämme bzw. Stämme mit einem AMDase-Gen sind grau unterlegt. Stämme in grauer Schrift waren AMDase-negativ im Plattentest (Typstämme) oder enthielten kein *amd*. Die Isolate *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02 sind mit einem Stern markiert. Der Stammbaum wurde mit Hilfe des Programms SeaView (PhyML, GTR, 2.18.18.1) erstellt. Bootstrap-Werte $\geq 80\%$ wurden angegeben. Der Maßstabsbalken entspricht 0,002 Substitutionen pro Nukleotid.

Gene, kodierend für eine Arylmalonat-Decarboxylase bzw. Stämme mit AMDase- Aktivität, konnten somit in acht *Variovorax*-Stämmen, verteilt auf drei Arten dieser Gattung, nachgewiesen werden. Damit ist *Variovorax* zu diesem Zeitpunkt die Gattung mit den meisten Arylmalonat-Decarboxylasen, gefolgt von *Aminobacter* mit drei *amd*-tragenden Isolaten.

3.8.4 Möglicher Abbauweg des Substrats Phenylmalonat

Phenylmalonsäure wird durch Arylmalonat-Decarboxylasen zu Phenylacetat decarboxyliert. Da *Variovorax* sp. HH01 und *Variovorax* sp. HH02 auf Phenylmalonat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können, müssen sie in der Lage sein, Phenylacetat zu verstoffwechseln. Phenylacetat ist ein zentrales Stoffwechselzwischenprodukt beim Abbau einer Vielzahl aromatischer Verbindungen. Orthologe Gene, die für Phenylacetat abbauende Enzyme kodieren, sind bei Bakterien weit verbreitet. Die Funktionalität dieser Gene wurde jedoch nur in wenigen Organismen, darunter *Pseudomonas putida* und *Escherichia coli*, nachgewiesen (Olivera et al. 1998; Ismail et al. 2003; Di Gennaro et al. 2007; Teufel et al. 2010). Ein putativer Abbauweg des Phenylacetats wurde 2010 von Teufel et. al. beschrieben. Der erste Schritt ist die Aktivierung des Phenylacetats durch das Enzym Phenylacetat-CoA-

Ligase. Die anschließende Epoxidierung und Isomerisierung ermögliche die Ringspaltung zu einer ungesättigten, aliphatischen Dicarbonsäure, die über eine Art β -Oxidation in die Produkte Succinyl-CoA und Acetyl-CoA umgewandelt wird (Abbildung 43).

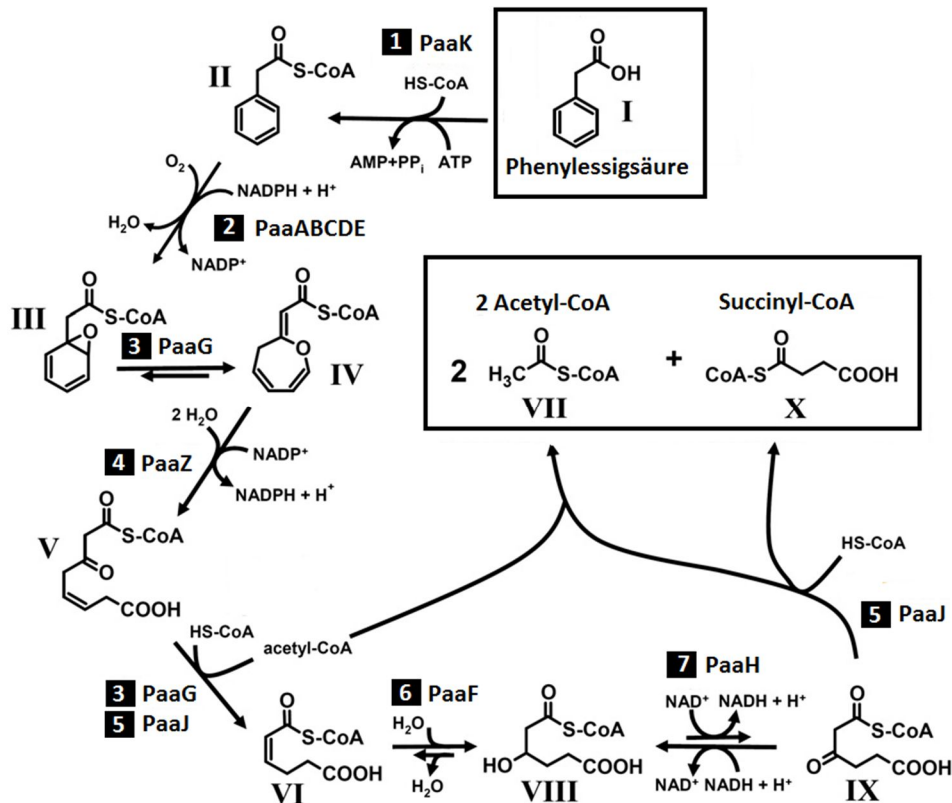


Abbildung 43: putativer aerober Abbauweg der Phenyllessigsäure in *E. coli* K12 und *Pseudomonas* sp. Y2. Die Abbildung wurde Teufel et al. 2010 entnommen und für diese Arbeit angepasst. Enzyme: Phenylacetyl-CoA-Ligase (AMP bildend) (1), Phenylacetyl 1,2-CoA Epoxidase (NADPH₂) (2), Epoxyphenylacetyl-CoA 1,2-Isomerase (Oxepin-CoA bildend), postulierte 3,4-Dehydroadipyl-CoA Isomerase (3), Oxepin-CoA Hydrolase/ 3-Oxo-5,6-Dehydrosuberyl-CoA Semialdehyd Dehydrogenase (NADP⁺) (4), 3-Oxo-5,6-Dehydrosuberyl-CoA Thiolase (5), 2,3-Dehydroadipyl-CoA Hydratase (6), 3-Hydroxyadipyl-CoA Dehydrogenase (NAD⁺) (7). Chem. Verbindungen: Phenyllessigsäure (I), Phenylacetyl-CoA (II), 1,2-Epoxyphenylacetyl-CoA (III), 2-Oxepin-2(3H)-ylideneacetyl-CoA (IV), 3-Oxo-5,6-Dehydrosuberyl-CoA (V), 2,3-Dehydroadipyl-CoA (VI), Acetyl-CoA (VII), 3-Hydroxyadipyl-CoA (VIII), 3-Oxo-5,6-Dehydrosuberyl-CoA (IX), Succinyl-CoA (X).

Zu den *paa*-Genen homologe Gene konnten in den Genomen der *Variovorax*-Stämme nachgewiesen werden und deuten auf einen identischen oder zumindest ähnlichen aeroben Abbau der Phenyllessigsäure in diesen Organismen. Ein Überblick über Genanordnung und mögliche Funktionen der Genprodukte in *Variovorax* sp. HH02, sowie die homologen Proteine in *E. coli* K12 ist in Abbildung 44 dargestellt. Der Sequenzabschnitt ist in allen *Variovorax*-Stämmen konserviert, die auf der IMG-Plattform (Markowitz, 2014) zugänglich sind (ausgewertet wurden Stämme mit ≥ 6 mio bp an Sequenzdaten).

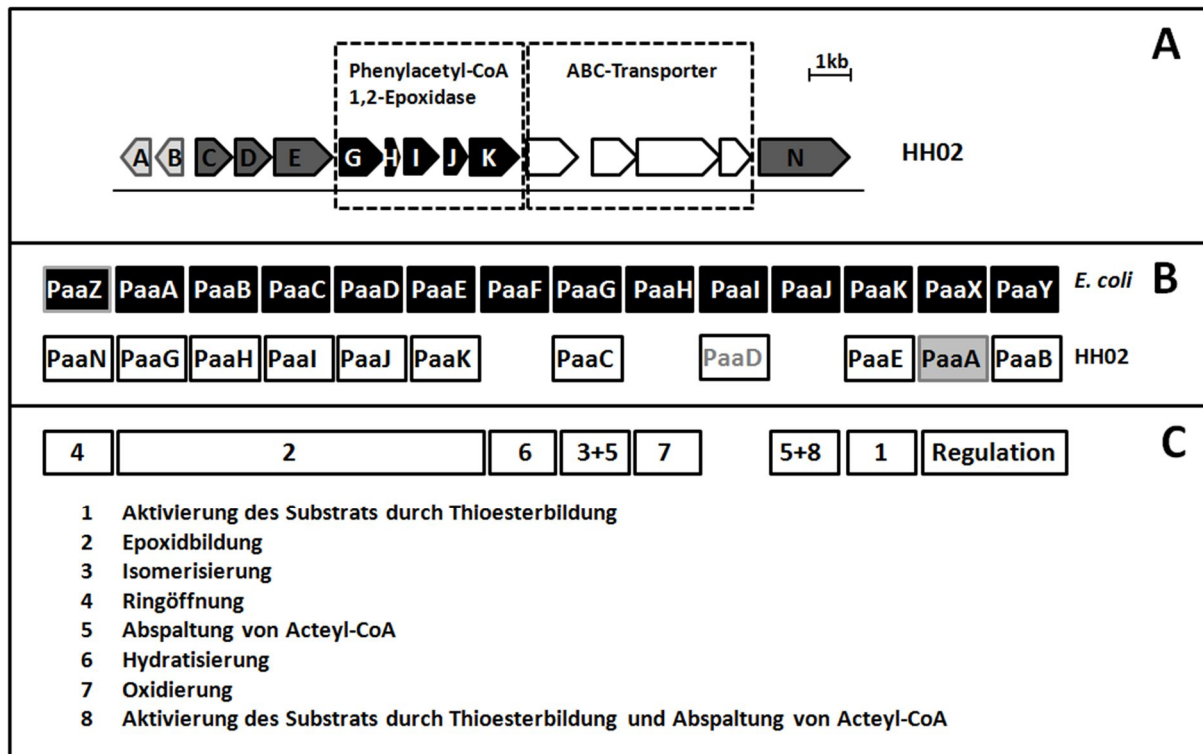


Abbildung 44: Übersicht über am Phenylacetatabbau beteiligte Gene, Genprodukte und putative Teilschritte des Stoffwechselwegs. (A) Genanordnung in *Variovorax* sp. HH02, (B) Genprodukte in *E. coli* K12 (schwarze Kästchen), sowie homologe Proteine in *Variovorax* sp. HH02 (weiße Kästchen) und (C) putative Teilschritte des Abbaus von Phenylacetat. (B) Das Genprodukt PaaD aus *Variovorax* sp. HH02 wies nur eine geringe Homologie zu PaaI aus *E. coli* K12 auf. Bei PaaA handelt es sich um einen Transkriptionsregulator der TetR-Familie, der keine Homologien zum Transkriptionsregulator PaaX aufwies. Homologe Genprodukte der Proteine PaaF, PaaH und PaaJ konnten nur außerhalb des Genclusters gefunden werden.

Die Anordnung der Gene erfolgt, wie bei *Pseudomonas* sp. Y2 und *Escherichia coli* K12, in einem Gencluster, welches vermutlich in mehrere Transkriptionseinheiten unterteilt ist, um den aerobe Abbau der Phenylelessigsäure zu steuern. Für die Genprodukte der ersten vier Teilschritte ließen sich homologe Proteine in allen *Variovorax*-Stämmen finden. Diese umfassen (1) die Aktivierung des Substrats durch Thioesterbildung, (2) die Epoxidbildung, (3) die Isomerisierung mit Ringerweiterung zur Bildung eines heterozyklischen Enolethers und (4) die hydrolytische Ringöffnung. Die Abspaltung des ersten Acetyl-CoAs vom Zwischenprodukt 3-Oxo-5,6-Dehydrosuberil-CoA könnte durch das Enzym PaaD erfolgen, welches geringe Homologien zu PaaI aus *Escherichia coli* K12 aufwies (e-Value 4×10^{-32} , Aminosäureähnlichkeit 61%) und möglicherweise als Acyl-CoA Thioesterase fungiert. Anschließend wäre eine Art β -Oxidation wie in *E. coli* K12 denkbar. Homologe Genprodukte zu PaaF, PaaH und PaaJ wurden außerhalb des Genclusters kodiert. Die Expression der zugehörigen Gene könnte über die entsprechenden Zwischenprodukte der β -Oxidation positiv reguliert sein und so einen vollständigen Abbau des Phenylacetats ermöglichen.

Zusätzlich zu den Genprodukten, die mutmaßlich am Abbau der Phenyllessigsäure beteiligt sind, enthielt das mögliche Operon in *Variovorax* Gene, kodierend für LivK, LivH, LivM und LivF. Dies sind Untereinheiten von ABC-Transporter, die die Aufnahme hydrophober Aminosäuren ermöglichen (Zheng et al. 2013). Der Abbau der hydrophoben Aminosäure Phenylalanin kann über Phenylacetat erfolgen (Law et al. 2008; Carmona et al. 2009).

Das in *Variovorax* sp. HH01 kodierte *livF* wies einen Stoppkodon nach 312 bp auf, was in etwa der Hälfte der Gensequenz entspricht. Auch der ORF, kodierend für *paaN* enthielt nach 1302 bp ein Stoppkodon, was die Proteinlänge auf 433 Aminosäuren verkürzt würde im Vergleich zu 686 Aminosäuren in *Variovorax* sp. HH02. Unklar ist, ob es sich dabei um Sequenzierungsfehler handelt oder welche Auswirkungen diese Mutationen auf den Phenylacetatabbau haben. Fest steht, dass auch *Variovorax* sp. HH01 auf Phenylmalonat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Der Farbumschlag auf Indikatorplatten tritt jedoch später ein als bei anderen *Variovorax*-Isolaten. Vor allem die Mutation in der Nukleotidsequenz des Gens *paaN* könnte eine Erklärung dafür sein.

4 Diskussion

1993 lief in den USA das Patent der Firma Syntex für den Wirkstoff Naproxen aus und schaffte einen Anreiz, neue ökonomische Produktionswege zu finden, die eine kostengünstigere Herstellung des Medikamentes ermöglichten. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Großteil der Kosten durch die Auftrennung des racemischen Gemisches und der Recyclingschritte verursacht. Neben einer Vielzahl von chemischen Verfahren, wie der Rekristallisierung diastereomerer Gemische (Harrington and Lodewijk 1997) wurde auch nach Enzymen gesucht, die Zwischenprodukte des Naproxens zu enantiomerenreinen Produkten umsetzen konnten (Kourist et al. 2011). Das große Interesse an α -Arylalkansäuren zu dieser Zeit führte zur Entdeckung der Arylmalonat-Decarboxylasen (AMDasen). Arylmalonat-Decarboxylasen gehören zur Enzymfamilie der Aspartat-Glutamat-Racemasen und zur kleinen Gruppe der Kofaktor-unabhängigen Decarboxylasen. Die erste AMDase wurde 1992 von Miyamoto und Ohta (Miyamoto and Ohta 1992a) beschrieben und stammte aus *Bordetella bronchiseptica*. AMDasen sind industriell interessante Enzyme, da sie aus prochiralen α -disubstituierten Malonsäurederivaten homochirale Produkte bilden können und dies ganz ohne die Verwendung von Kofakten. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind nur drei weitere Enzyme mit nachgewiesener AMDase-Aktivität aus *Achromobacter sp.* KU1311 (Miyamoto et al. 2007), *Enterobacter cloacae* KU1313 (Miyamoto et al. 2008) und *Chelativorans sp.* BNC1 (Okrasa et al. 2008) beschrieben. Es gibt jedoch eine Vielzahl putativer Gene, deren korrekte Annotation experimentell nicht belegt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen und die Verbreitung der bisher wenig bekannten Arylmalonat-Decarboxylasen zu untersuchen. Dafür wurde sowohl eine Datenbankrecherche durchgeführt, als auch funktionelle und sequenzbasierte Screeningmethoden genutzt. Zwei putative AMDase-Gene wurden im Anschluß überexprimiert, gereinigt und biochemisch charakterisiert.

4.1 Bewertung der Screening-Verfahren

Für die funktions- und sequenzbasierte Suche nach neuen Arylmalonat-Decarboxylasen kamen verschiedene Screening-Methoden zum Einsatz. Die Suchergebnisse, sowie Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

4.1.1 HPLC-Screening

Die Verwendung der HPLC für den Nachweis der Enzymaktivitäten bietet einen spezifischen und hoch sensitiven Nachweis sowohl des Substrates als auch des Produktes. Die Nachweisgrenze von UV-Detektoren liegt bei etwa 0,3 ng/ml (Unger and Weber 1995). Die isokratischen Laufbedingungen und kurzen Retentionszeiten ermöglichen eine Laufzeit von zehn Minuten pro Messung (2.12.4). Dies sind gute Voraussetzungen für ein Hochdurchsatz-Screening. Zeitaufwendiger sind der Aktivitätstest (2.12.2) und die folgende Probenvorbereitung (2.12.3) für die HPLC. Doch auch hier gab es die Möglichkeit Arbeitsabläufe zu optimieren und den Zeitaufwand zu begrenzen z.B durch Nutzung von Mikrotiterracks für den Autosampler und breitenverstellbaren Multipipetten. Um (Meta)genombanken zu screenen ist die Verwendung von Proben-Pools unumgänglich. Dies führt im Einzelfall zu falsch negativen Resultaten durch Verdünnung der AMDase-aktiven Enzyme und Hemmung des Zellwachstums positiver Klone, der Genexpression oder Enzymaktivität durch toxische Stoffwechselprodukte, Repressoren oder Proteasen. Putative AMDase-Gene, die mittels HPLC-Screening (und auch anderen funktionellen Screenings) erfasst werden, müssen gut in *E. coli* exprimierbar sein und ihre Genprodukte eine deutliche Decarboxylase-Aktivität aufweisen, um im Pool detektiert zu werden. Doch dies sind gute Randbedingungen für die Selektion vielversprechender Kandidaten hinsichtlich biochemischer Charakterisierung und potentieller Nutzung als Biokatalysatoren. Die AMDase-Aktivität zweier putativ positiver Pools der Metagenombank, hergestellt mit isolierter DNA aus Elefantendung (Ilmberger et al. 2014), konnte trotz intensiver Bemühungen (kleinere Pools, niedrigere Inkubationstemperatur nach Induktion, Verwendung von Protease-Inhibitoren) nicht reproduziert werden. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass es sich um falsch positive Proben handelt und der Abbau des Phenylmalonats durch nicht mehr nachvollziehbare Fehler bei der Probenverarbeitung ausgelöst wurde. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Anzahl an untersuchten Fosmidklonen. In einer von Uchiyama et al. veröffentlichten Tabelle mit aktivitätsbasierten Screeningversuchen von Metagenombänken in der Zeit von 2007 bis 2009 schwankte die Trefferquote erheblich, abhängig von der gesuchten Enzymaktivität und Screening-Methode. Die Werte variierten von einem positiven Fosmidklon pro 200-100.000 untersuchten Klonen (Uchiyama and Miyazaki 2009). Nach heutigem Erkenntnisstand sind AMDasen sehr seltene

Enzyme. Es ist zu vermuten, dass die Zahl von 4000 untersuchten Metagenomklonen nicht ausreichend war, um einen AMDase-positiven Klon zu detektieren.

4.1.2 Suche nach AMDasen in (Meta)genombanken und Isolaten mittels Plattenscreening

Platten-Screenings eignen sich gut als Hochdurchsatz-Screenings für Metagenombanken aufgrund ihres geringen Arbeitsaufwands und der Untersuchung von Einzelklonen. So wurden in der Arbeitsgruppe Streit bereits mehrfach interessante Enzyme in Metagenombanken mittels Platten-Screening entdeckt, wie z.B. Lactonasen, Lipasen und Cellulasen (Schipper et al. 2009; Ilmberger and Streit 2010; Chow et al. 2012; Ilmberger et al. 2012). Der Nachweis von Decarboxylase-Aktivitäten durch pH-Veränderung im Medium wurde bereits 1955 von Møller beschrieben (Møller, 1955). Auch das in dieser Arbeit verwendete Plattenscreening (2.11) beruhte auf dem Nachweis eines pH-Anstiegs infolge der Decarboxylierung des Substrats Phenylmalonsäure. Die Detektion unspezifischer pH-Veränderungen im Medium, welche durch eine Vielzahl metabolischer Aktivitäten der Einzelklone ausgelöst werden können, birgt jedoch die Gefahr falsch positiver Klone. Für das Screening-Verfahren wurden unterschiedliche Medienzusammensetzungen und pH-Indikatoren getestet. Am geeignetsten erschien die Verwendung des pH-Indikators Kresolrot bei pH 6 in einem Minimalmedium mit CopyControl™ Induction Solution zur Induktion der Fosmidklone. Die Pufferkapazität des Mediums wurde gering gehalten, um auch niedrige Substratumsätze durch einen Farbumschlag sichtbar zu machen. Zudem erfolgte nach Anwachsen der überstempelten Einzelkolonien eine Inkubation der Platten bei 8°C, was zu einem deutlicheren Farbumschlag der Positivkontrolle führte (3.4.2). Jedoch war der Farbumschlag der Positivkontrolle nicht zuverlässig reproduzierbar. Dies könnte auf Schwankungen bei der Medienzusammensetzung, der Position der Kontrolle auf der Platte und/oder Verdunstungseffekten zurückzuführen sein.

Die Untersuchung der Isolate aus Bodenproben mittels Indikatorplatten (3.2.1) konnte die anfänglichen 36 Proben auf 8 Isolate eingrenzen, von denen sich im anschließenden PCR-Screening bei 6 Isolaten ein *amd*-Gen nachweisen ließ. Bereits 1992 beschrieben Miyamoto und Ohta (Miyamoto and Ohta 1992a) die erfolgreiche Anreicherung von Bodenorganismen, die Phenylmalonat als einzige Kohlenstoffquelle nutzen können, mit Hilfe einer ähnlichen Medienzusammensetzung. Der Farbumschlag auf den Indikatorplatten war meist nach 2-3 Tagen sichtbar. Vermutlich verbrauchten die Bakterien zuerst den Hefeextrakt und stellen ihren Stoffwechsel anschließend auf die Verwertung der Phenylmalonsäure um. Diese

Vermutung wird unterstützt durch die Feststellung, dass *Variovorax* sp. HH01 das Gen *amdA* nicht bei Wachstum mit Hefeextrakt exprimiert, sondern nur wenn Phenylmalonat als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht (Ergebnisse nicht gezeigt). Die geringen Mengen Hefeextrakt im Medium bewirken ein schnelleres Wachstum der Zellen und die größere Zellmasse einen deutlichen Umschlag des pH-Indikators.

4.1.3 Sequenzbasiertes Screening

Für das PCR-Screening wurden Primer für konservierte Bereiche der AMDase-Gene abgeleitet. Diese umfassen Sequenzbereiche, kodierend für das katalytisch aktive Cystein und das dem zweiten aktiven Cystein der Racemasen entsprechende Glycin an Position 74 (3.2.2). Die zu amplifizierende Sequenz ist mit ~350 bp und einer sehr kurzen Elongationszeit von 30 sec optimal für ein Hochdurchsatzscreening geeignet und wurde erfolgreich für die Untersuchung der putativen *amd*-tragenden Isolate eingesetzt. Die Verwendung der Primer für 96er-Proben-Pools aus Metagenombanken erwies sich als ungeeignet. Die Amplifikation einer Vielzahl unspezifischer Fragmente machte die Auswertung schwierig und führte zu zahlreichen falsch positiven Ergebnissen (Ergebnisse nicht gezeigt). Kleinere Pools, veränderte Probenaufbereitung (DNA-Isolierung statt des Aufkochens) und stringenter Reaktionsbedingungen (z.B. höhere Annealing-Temperatur und Magnesiumsulfatkonzentrationen) könnten die Zahl der „false priming“-Ereignisse reduzieren und die Effizienz der Amplifikation möglicher *amd*-Fragmente erhöhen. Ob die Feineinstellungen ausreichen, um ein überzeugendes Resultat zu erhalten, bleibt abzuwarten.

Die Datenbanksuche nach AMDasen mit konservierten Sequenzmotiven des Prototyps brachte etliche weitere *amd*-Gene zu Tage (Abbildung 29), von denen *amdP* aus *Polymorphum gilvum* nachweislich eine Arylmalonat-Decarboxylase kodiert (3.6) und somit belegt, dass die Suchkriterien geeignet sind, um AMDase-kodierende Gene aufzuspüren und das Vorkommen von AMDasen zu untersuchen. Wie alle Sequenzbasierten Screenings begrenzt sich die Suche auf bekannte Muster und homologe Bereiche. Vom Prototyp abweichende Sequenzmerkmale anderer AMDae-aktiver Proteine würden nicht erfasst werden.

4.1.4 Metagenomischer Ansatz

Der metagenomische Ansatz bietet sowohl durch funktions- als auch sequenzbasierte Screenings die Möglichkeit das metabolische Spektrum der Vielzahl unkultivierbarer

Mikroorganismen zu erfassen und zu nutzen. Die funktionsbasierte Suche nach AMDasen mittels Plattentest und HPLC blieb jedoch erfolglos. Sogar die Untersuchung der Genombank des Stammes *Variovorax* sp. HH02, welche Klone enthielt, die ein verifiziertes *amd*-Gen (*amdV*) trugen, blieb in beiden funktionellen Screenings ohne Ergebnis. Die Effektivität funktioneller Screenings für Metagenombanken wird limitiert durch die Fähigkeit des Wirtsorganismus die heterologe DNA zu exprimieren. Auf dem Weg vom AMDase-Gen zur funktionsfähigen AMDase gibt es eine Reihe von Stolpersteinen, angefangen von der Promotorerkennung, über Kodon-Nutzung bis hin zur korrekten Faltung der Proteine. Aufgrund der gut untersuchten Genetik und der Verfügbarkeit einer Vielzahl von etablierten Methoden und genetischen Werkzeugen ist *E. coli* ein beliebter Wirt für die Konstruktion von Metagenombanken. Schätzungen zu Folge sind jedoch nur 40% der heterologen Gene mit Expressionssignalen ausgestattet, die von *E. coli* erkannt werden (Gabor et al. 2004). An welchen Stellen auf dem Weg zum funktionsfähigen Protein die *amd*-tragenden Fosmidklone gescheitern sein könnten, ist nicht bekannt. Es gibt jedoch eine Vielzahl von Ansätzen die Trefferquote funktioneller Screenings zu verbessern. Die stabile Isotopen-Markierung nutzt den Einbau eines mit stabilen Isotopen angereicherten Substrates in zelluläre Bausteine (Dumont and Murrell 2005). Die Isolierung der isotopenmarkierten DNA der substratverwertenden Mikroorganismen und Verwendung für die Konstruktion von Metagenombanken kann zu einer Anreicherung von Genen führen, die am jeweiligen Stoffwechselweg beteiligt sind, wie am Beispiel von Methan und Methanol angereichertem Boden gezeigt (Dumont and Murrell 2005). Da AMDasen nach heutigem Erkenntnisstand, zumindest in ihrer konservierten Sequenz, sehr seltene Enzyme sind, könnte eine solche Anreicherung von Phenylmalonat(derivaten) verwertenden Organismen und ihrer DNA die Trefferquote funktionsbasierter Screenings deutlich erhöhen. Die heterologe Expression von Sigma-Faktoren anderer Bakterien in *E. coli* kann die Erkennung eines breiteren Spektrums an Promotoren bewirken. So führte der Sigma-Faktor RpoD aus *Lactobacillus plantarum* zu einer neunfach erhöhten Expression von Genen einer Metagenombank, deren DNA-Inserts aus einer Bodenprobe gewonnen wurden (Gaida et al. 2015). Doch auch die Verwendung von Vektoren mit breitem Wirtsspektrum und alternative Wirte, wie *Thermus thermophilus*, *Ralstonia metallidurans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas antarctica* oder *Streptomyces lividans* brachten aktive Klone zum Vorschein, die in *E. coli* keine oder deutlich geringere Aktivität zeigten (Aakvik et al. 2009; Craig et al. 2010; McMahon et al. 2012; Iqbal et al. 2014;

Liebl et al. 2014; Leis et al. 2015). Ein weiterer Ansatz ist die Veränderung von Translationsprofilen durch genetisch optimierte ribosomale Proteine. Bernstein et al. gelang es, das ribosomale Protein S1 in *E. coli* so zu verändern, dass die Expressionsrate GC-reiche Gene des Bakteriums *Rhodopseudomonas palustris* um das zwölffache erhöht war (Bernstein et al. 2007). Dies ist auch ein interessanter Ansatz bei der Suche nach Genen, kodierend für Arylmalonat-Decarboxylasen, da alle bekannten AMDase-Gene einen hohen GC-Gehalt aufweisen.

Die bisherigen Screeningversuche zeigten, dass eine Optimierung des funktionellen Screenings nötig ist, um das Potential von Metagenombanken wirklich zu nutzen und AMDase-aktive Fosmidklone zu detektieren. Die Auswahl an Ideen und Werkzeugen zur Verbesserung der Enzymaktivität in Metagenombanken ist groß. Es bleibt abzuwarten, welche der Methoden zielführend ist.

4.2 Biochemische Charakterisierung

Die biochemische Charakterisierung wurde mit His-Tag gereinigten Proteinen durchgeführt (3.5.2) und der Substratumsatz mittels HPLC bestimmt (3.6). Die Ergebnisse der Untersuchungen im Vergleich zu anderen charakterisierten AMDasen sind in Tabelle 12 zu sehen. Alle Enzyme stammen aus Bodenorganismen und haben ein Molekulargewicht von 24,7 kDa. Das Temperatur-Optimum der AMDasen aus *Achromobacter* sp. KU1311 (Miyamoto et al. 2007) und *Bordetella bronchiseptica* KU1201 (Miyamoto and Ohta 1992a) lag bei 40°C bzw. 45°C, während die Enzyme der *Variovorax*-Stämme und der Vertreter *Polymorhum gilvum* und *Enterobacter cloacae* (Miyamoto et al. 2008) ihre maximale Enzymaktivität zwischen 30°C-37°C entfalteten. Somit liegen die Temperatur-Optima aller AMDasen im mesophilen Temperaturbereich. Während bei den Enzymen aus *Variovorax*, *Polymorhum gilvum* und *Enterobacter cloacae* (Miyamoto et al. 2008) die Enzymaktivität bei 50°C stark abfiel bzw. fast zum Erliegen kam, erreichte die AMDase aus *Achromobacter* sp. KU1311 noch 70% ihrer Enzymaktivität (Miyamoto et al. 2007). Auch der Prototyp aus *Bordetella bronchiseptica* zeigte erst ab 55°C einen drastischen Aktivitätsabfall (Miyamoto and Ohta 1992a).

Das pH-Optimum der Enzyme umfasst den leicht sauren (pH 5,5) bis leicht basischen (pH 8,5) pH-Bereich, wobei die AMDasen aus *Achromobacter* sp. KU1311 und *Bordetella bronchiseptica* KU1201 mit den höchsten Temperatur-Optima auch bei den höchsten pH-

Werten ihre maximale Aktivität aufwiesen (Miyamoto and Ohta 1992a; Miyamoto et al. 2007). Die AMDase aus *Achromobacter* sp. KU1311 war in der Lage von pH 6 bis pH 10 mindestens 80% ihrer Decarboxylase-Aktivität zu erhalten und besitzt somit das breiteste pH-Spektrum der AMDasen.

Tabelle 12: biochemische Eigenschaften charakterisierter AMDasen. Als Substrat wurde Phenylmalonat verwendet. MG: Molekulargewicht, Temp.-Op.: Temperatur-Optimum, pH-Op.: pH-Optimum, k.A.: keine Angaben, n.d.: nicht detektiert

Eigen-schaften	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Achromobacter</i> sp. KU1311	<i>Chelativorans</i> sp. BNC1	<i>Variovorax</i> sp. HH01	<i>Variovorax</i> sp. HH02	<i>Polymorphum gilvum</i>
Habitat	Boden	Boden	Boden	Boden	Boden	Boden	Boden
MG [kDa]	24,7	24,7	24,7	24,7	24,7	24,7	24,7
Temp.-Op.	45°C	35°C	40°C	k.A.	34°C	30°C	37°C
pH-Op.	8,5	5,5	8,1	k.A.	6	7	7
K_m [mM]	10,7	k.A.	k.A.	9,6	7,9	n.d.	n.d.
k_{cat} [s ⁻¹]	316	k.A.	k.A.	118	99	n.d.	n.d.
k_{cat}/K_m [s ⁻¹ M ⁻¹]	$2,96 \cdot 10^4$	k.A.	k.A.	$1,7 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	n.d.	n.d.
Referenz	(Miyamoto and Ohta 1992a)	(Miyamoto et al. 2008)	(Miyamoto et al. 2007)	(Okrasa et al. 2008)	(Maimanakos 2009) diese Arbeit	diese Arbeit	diese Arbeit

Die Temperaturstabilität (3.6.2) der in dieser Arbeit untersuchten AMDasen war deutlich geringer als die der anderen charakterisierten Enzyme. Für AmdP konnte bei einer Lagerungstemperatur von 4°C nach 29 Tagen nur noch eine Restaktivität von 1±2% ermittelt werden. AmdA zeigte bei der gleichen Lagerungstemperatur nach 24 Tagen immerhin noch 61±12% der anfänglichen Substratumsätze. Die AMDase-Aktivitäten des Enzyms AmdV konnten leider nur bis zu Versuchstag 11 bestimmt werden. Die restlichen Proben waren aufgrund einer längerfristigen Funktionsstörung der HPLC nicht mehr auswertbar. Die Lagerung des Enzyms aus *Achromobacter* sp. KU1311 war für über zwei Monate bei 4°C und 50%-igem Aktivitätsverlust möglich, die Variante aus *Enterobacter cloacae* hielt sich sogar drei Monate bei der gleichen Temperatur. Der Prototyp aus *Bordetella bronchiseptica*

KU1201 konnte bis zu sechs Monate ohne Aktivitätsverlust bei 4°C gelagert werden und ist somit die stabilste AMDase. Für die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme schien die Lagerung bei -20°C in 50 mM Natriumphosphat-Puffer am geeignetsten. Bei allen drei Enzymen blieb die AMDase-Aktivität über einen Zeitraum von 70 Tagen nahezu stabil. Die Lagerung in Tris-Puffer hatte bei den untersuchten AMDasen einen drastischen Aktivitätsabfall zur Folge. Interessanterweise erreichten aber alle untersuchten Enzyme ihre höchsten Umsatzraten im gleichen Puffer. Die erhöhte Aktivität im Tris-Puffer führte anscheinend zu einer schnelleren Destabilisierung der AMDasen.

Viele industrielle Prozesse nutzen organische Lösungsmittel z.B. um die Löslichkeit hydrophober Substrate zu erhöhen, Wasser-bedingte Nebenreaktionen zu umgehen oder das thermodynamische Gleichgewicht einer Reaktion zu beeinflussen (Carrea and Riva 2000). Untersucht wurde die AMDase-Aktivität in den Lösungsmitteln Ethanol, Methanol, Isopropanol und DMSO bei einer Endkonzentration von 10%. Die ersten drei Lösungsmittel führten bei allen Enzymen zu einem drastischen Aktivitätsverlust. Nur in DMSO wurden noch etwa 50% (AmdA und AmdV) bzw. 80% (AmdP) der Substratumsätze der Lösungsmittel-freien Kontrolle erreicht. Die Struktur von Enzymen wird durch zahlreiche nichtkovalente Bindungen unterstützt, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen, welche zur Stabilisierung und katalytischen Aktivität beitragen (Haltia and Freire 1995; Pace et al. 1996). Die Störung dieser Wechselwirkungen durch organische Lösungsmittel kann zu verringerten Aktivitäten führen (Chen and Arnold 1991; Gormann and Dordick 1992; Ryu and Dordick 1992).

Keines der untersuchten Enzyme zeigte eine erhöhte AMDase-Aktivität bei der Verwendung möglicher Kofaktoren. Lediglich die Zugabe von Zinkchlorid führte zu einem deutlichen Aktivitätsabfall. Die Substratumsätze fielen auf 74±9% bei AmdV, 38±5% bei AmdA und auf 8±4% bei AmdP im Vergleich zur Messung ohne Effektoren. Zink zählt zu den Schwermetallen, deren inhibierende Wirkung vielfältige Ursachen haben kann, u.a. Substrat-Komplexierung, Maskierung katalytisch aktiver Aminosäuren oder denaturierende Effekte (Vig et al. 2003; D'Ascoli et al. 2006; Tejada et al. 2008; Karaca et al.).

Die katalytische Effizienz der AMDasen aus *Variovorax* sp. HH01, *Chelativorans* sp. BNC1 und des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 liegt in der Größenordnung von $10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Tabelle 12). Damit befinden sich die AMDasen leicht unter dem Durchschnittswert von $10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Bar-Even et al. 2011). Diffusions limitierte Enzyme, wie die Superoxid-

Dismutase, Carboanhydrase oder Triosephosphat-Isomerase liegen im Bereich von 10^8 - $10^9 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Getzoff et al. 1992; Wierenga et al. 2010; Boone et al. 2013). Die schnellste unter den AMDasen ist der Prototyp aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201. Bei ähnlichen K_m -Werten aller drei Enzyme wird der Vorsprung durch einen um den Faktor 3 erhöhten Substratumsatz ermöglicht. AmdA aus *Variovorax* sp. HH01 besitzt die niedrigste katalytische Effizienz. Die Versuchsbedingungen mit hohen Pufferkonzentrationen (250 mM) waren jedoch suboptimal gewählt und könnten eine hemmende Wirkung auf die AMDase-Aktivität gehabt haben (Maimanacos 2009). Der Vergleich der AMDasen zeigt, dass das Enzym des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 mit dem höchsten Temperatur-Optimum, der längsten Haltbarkeit und der größten katalytischen Effizienz zurzeit der geeignetste Kandidat für die Verwendung als Biokatalysator zu sein scheint und Optimierungsversuche sich auf diese AMDase konzentrieren sollten.

4.3 Klassifizierung der AMDasen

4.3.1 Konservierte Sequenzmotive

Neben dem funktionellen und sequenzbasierten Durchmustern der Umweltproben und (Meta)genombanken wurden Sequenzmerkmale festgelegt, die für die Suche nach potentiellen AMDasen in Datenbanken genutzt werden sollten. Für das zugrunde liegende Aminosäuresequenz-Alignment (Abbildung 9) wurden Enzyme ausgewählt, die (i) eine nachgewiesene AMDase-Aktivität in der Größenordnung des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 (Miyamoto and Ohta 1992a) besaßen und (ii) sowohl Phenylmalonat, als auch komplexere, prochirale Substrate umsetzen konnten. Aminosäuren, welche, laut vermutetem Reaktionsmechanismus (Okrasa et al. 2008), an der Positionierung und Umsetzung des Substrates beteiligt sind, konnten bei allen fünf Enzymen nachgewiesen werden und wurden als Suchkriterien verwendet. Dabei wurde besonders auf das Vorkommen nur eines katalytisch aktiven Cysteins geachtet (1.2.2). Weiterhin waren konservierte Sequenzmotive im Umfeld des katalytisch aktiven Cysteins und des entsprechenden Glycins entscheidend. So ergaben sich 12 Sequenzmerkmale (Tabelle 8) als Voraussetzung zur Einstufung von Proteinen als AMDasen. Insgesamt wurden mittels Datenbank-Suche und Screeningverfahren 24 ORFs entdeckt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Enzyme mit AMDase-Aktivität kodieren. Ein Aminosäuresequenz-Alignment dieser 24 Enzyme wurde zur Erstellung weiterer konservierter Sequenzmotive der

AMDasen des Prototyps genutzt. Die Ableitung dieser Motive macht eine zuverlässigere Funktionsvorhersage und eine klare Unterscheidung zu anderen Mitgliedern der Protein-Superfamilie der Aspartat-Glutamat-Racemasen möglich. Die sechs abgeleiteten Sequenzmotive (Tabelle 10) umfassen alle bisher bekannten katalytisch aktiven Aminosäuren, die an der Positionierung des Substrates und dessen Umsetzung beteiligt sind (Okraśa et al. 2008) und der Vergleich mit Proteinsequenzen weiterer Vertreter der Protein-Superfamilie ermöglichte die Festlegung AMDase-spezifischer Aminosäuren innerhalb der Sequenzmotive (Abbildung 36). Dies war eine wichtige Voraussetzung für die sequenzbasierte Suche nach Arylmalonat-Decarboxylasen und die Untersuchung ihres Vorkommens, ihrer Verbreitung und Klassifizierung.

4.3.2 Protein-Superfamilie der Aspartat/Glutamat-Racemasen

Die Protein-Superfamilie der Aspartat/Glutamat-Racemasen umfasst Glutamat-Racemasen (EC 5.1.1.3), Aspartat-Racemasen (EC 5.1.1.13), Hydantoin-Racemasen (EC 5.1.99.5), Maleat *cis-trans* Isomerasen (EC 5.2.1.1) und AMDasen (EC 4.1.1.76). Gemeinsame Strukturelemente sind zwei pseudosymmetrische Rossmann-Faltungsdomänen (Hwang et al. 1999; Okraśa et al. 2008; Fisch et al. 2010; Chen et al. 2013) mit jeweils einem katalytisch aktiven Cystein (bei Decarboxylasen wurde das zweite Cystein durch ein Glycin ersetzt). Strukturanalysen verschiedener Glutamat-Racemasen und Arylmalonat-Decarboxylasen zeigten desweiteren eine Dioxyanion-Höhle als gemeinsames Strukturmotiv zur Bindung von Carboxylatgruppen und zur Stabilisierung des Endiolat-Zwischenproduktes (Okraśa et al. 2008). Der Stammbaum in Abbildung 35 zeigt die AMDasen und einige Vertreter weiterer Mitglieder der Aspartat/Glutamat-Superfamilie. Die größte Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der AMDasen bestand zu Vertretern der Maleat *cis-trans* Isomerasen. Der Stammbaum macht aber auch die klare Abtrennung der Maleat *cis-trans* Isomerasen von den „echten“ Arylmalonat-Decarboxylasen mit Sequenzmerkmalen ähnlich des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 deutlich. Die Maleat *cis-trans* Isomerasen, die für die Erstellung des Stammbaums verwendet wurden, teilen sich auf in Cluster 1 der bakteriellen Enzyme, Cluster 2 mit homologen Proteinen in den archaealen Gattungen *Thermococcus* und *Pyrococcus* und in die Gruppe der Ectoin verwertenden Proteine. Ectoin zählt zu den kompatiblen Soluten, welche auch bei hohen cytoplasmatischen Konzentrationen nicht toxisch wirken (Kurz 2008) und wird von verschiedenen halophilen Organismen zum Schutz ihrer Biopolymere gebildet (Ono et al. 1999; Graf et al. 2008).

Bakterien mit Ectoin verwertenden Proteinen können Ectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nutzen (Jebbar et al. 2005). Der Aminosäuresequenzvergleich der konservierten Sequenzmotive (Tabelle 10) der AMDasen des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 mit Mitgliedern der Superfamilie (Abbildung 36) brachte einige AMDase-spezifische Aminosäuren zu Tage, die eine bessere Unterscheidung der Enzyme und eine zuverlässige Funktionsvorhersage ermöglichen. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um Pro15 und Pro 21 (Sequenzmotiv 1), Glyc37 (Sequenzmotiv 2), Glyc74 und Arg81 (Sequenzmotiv 3) und Glyc189 (Sequenzmotiv 6). Die Nummerierung entspricht der Aminosäureabfolge des Prototyps aus *Bordetella bronchiseptica* (Miyamoto and Ohta 1992a). Pro14 und Pro15 des Sequenzmotivs 1 bilden die große Bindungstasche für den aromatischen Rest des Substrats. Die Seitenkette des Pro14 befindet sich im optimalen Abstand zur Amidbindung zwischen Glyc189 und Gly190 des Sequenzmotivs 6, um durch van der Waals-Wechselwirkungen den aromatischen Rest des Substrats zu stabilisieren (Okrasa et al. 2008). Diese Aminosäureabfolge ist für AMDasen spezifisch. Weiterhin charakteristisch ist das Glyc74 (Sequenzmotiv 3), anstelle eines zweiten katalytisch aktiven Cysteins der Racemasen, welches die Enantioselektivität der AMDasen begründet. Den AMDase-spezifischen Aminosäuren Pro21 (Sequenzmotiv 1), Glyc37 (Sequenzmotiv 2) und Arg81 (Sequenzmotiv 3) wurden bisher keine katalytischen Funktionen zugeordnet.

Zusätzlich zu den AMDasen des Prototyps gibt es einige Vertreter der Superfamilie der Aspartat/Glutamat-Racemasen mit nachgewiesener AMDase-Aktivität. Dies sind eine hypothetische AMDase aus *Pyrococcus horikoshii* OT3 (BAA30082.1), ein Protein aus *Alkaliphilus metalliredigenes* QYMF (ZP_00801202.1) und Murl (AAF25672), eine Glutamat-Racemase aus *Aquifex pyrophilus* (Kim et al. 1999; Okrasa et al. 2008). Die hypothetische AMDase aus *Pyrococcus horikoshii* OT3 zeigte innerhalb des Stammbaums (Abbildung 35) die größte Homologie zu MI des Clusters 1, während das Protein aus *Alkaliphilus metalliredigenes* QYMF die größte Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zu Ectoin verwertenden Enzymen aufwies. Die katalytische Effizienz der Enzyme ist allerdings um den Faktor 10^3 - 10^4 niedriger und somit nur ein Bruchteil der AMDase-Aktivität des Prototyps (Okrasa et al. 2008). Zudem sind sie nur in der Lage das Substrat Phenylmalonat zu decarboxylieren, nicht aber die prochirale Verbindung 2-Methyl-2-Phenylmalonat (Okrasa et al. 2008). Ein interessanter Kandidat innerhalb der Superfamilie ist ein als Decarboxylase annotiertes Protein aus *Bordetella bronchiseptica* RB50 (NP_888076.1) mit einer

katalytischen Effizienz in der Größenordnung der Enzyme aus *Bordetella bronchiseptica* KU1201 und *Mesorhizobium* sp. BNC1 (Okrasa et al. 2008). Innerhalb des Stammbaums ordnet sich die putative Decarboxylase nahe der Ectoin verwertende Enzyme (EutA) ein. EutA ist als mögliche Arylmalonat-Decarboxylase annotiert, welche in einem Operon kodiert ist, das durch Ectoin induziert wird (Jebbar et al. 2005). Proteine, die in diesem Abzweig der Superfamilie angesiedelt sind, könnten daher vielversprechende Kandidaten für AMDase-aktive Enzyme sein und die Bandbreite der Arylmalonat-Decarboxylasen erweitern. Hier wären besonders Proteine aus Bodenorganismen mit hohem GC-Gehalt interessant, vergleichbar mit dem Gehalt bekannter Exemplare, wie z.B. Vertreter der Gattung *Streptomyces* oder archaeale Varianten des Enzyms, die schon früh im Verlaufe der Evolution entstanden sind.

Da auch Glutamat-Racemasen und MI geringfügige AMDase-Aktivitäten aufweisen (Okrasa et al. 2008), ist zu vermuten, dass die Mitglieder der Superfamilie aus einem promiskuitiven Vorläufer-Molekül entstanden sind, welches mehrere, nichtspezifische Reaktionen katalysieren konnte. Die Evolution von Enzymen durch Genduplikation eines promiskuitiven Vorgängers mit breitem Substratspektrum und anschließender Optimierung einer der Aktivitäten in einem oder beiden Tochtergenen ist eine verbreitete Hypothese und wird für eine Vielzahl von Enzymen vermutet (Jensen 1976; Bergthorsson et al. 2007; Carbonell et al. 2011). Der Versuch einer Rekonstruktion solcher Vorläufermoleküle wurde für fungale Glucosidasen beschrieben (Voordeckers et al. 2012). Gezeigt wird, wie aus einer Maltose-Substrate abbauenden Ursprungsglucosidase mit geringer Nebenaktivität für Isomaltose-Derivate durch Genduplikationen und Mutationen die Evolution selektiver Enzyme mit Spezialisierung auf eine der beiden Aktivitäten erfolgte. Solche Vorläuferenzyme sind aufgrund ihrer vermuteten robusten Natur vielversprechende Kandidaten für „protein engineering“ zur Optimierung von Enzymaktivitäten und anschließender Verwendung als Biokatalysatoren in organischen Synthesen (Bornscheuer and Kazlauskas 2004; Kazlauskas 2005; Gaucher et al. 2008).

4.3.3 Vorkommen und Verbreitung von AMDasen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Arylmalonat-Decarboxylasen hauptsächlich bei mesophilen Bodenbakterien vorkommen und auf die Klassen der α -Proteobacteria, β -Proteobacteria und γ -Proteobacteria beschränkt sind. Es wurden insgesamt nur 24 Enzyme

(Tabelle 13) mit dem konservierten Sequenzmuster der AMDasen gefunden, die sich auf 14 Gattungen und sechs Familien verteilen. Meist gibt es nur einen Stamm pro Gattung, der das Enzym kodiert. Ausnahmen sind die Gattungen *Alcaligenes* (zwei Isolate), *Aminobacter* (drei Isolate) und *Variovorax* (sechs Isolate).

Tabelle 13: Übersicht über Organismen mit konserviertem *amd* und deren Ursprungshabitat, sowie Isolierungsort. α -Proteobacteria sind weiß, β -Proteobacteria sind hellgrau und γ -Proteobacteria grau unterlegt. Abkürzungen: A: Anreicherungskultur, k.A.: keine Angaben

Stämme	Ursprungshabitat	Isolierungsort
<i>Cucumibacter marinus</i> DSM 18995	küstennahes Meerwasser	Südkorea
<i>Nitratireductor pacificus</i> pht-3B	Sediment des Pazifischen Ozeans Teil eines Pyren-abbauendes Konsortiums	k.A.
<i>Mesorhizobium</i> sp. J18		
<i>Aminobacter</i> sp. J15	Isolate, entdeckt bei der Suche nach Lignin-abbauenden Bakterien	k.A.
<i>Aminobacter</i> sp. J44		
<i>Aminobacter</i> sp. J41		
<i>Chelativorans</i> sp. BNC1	Abwasser Mischkultur, angereichert mit EDTA	Deutschland
<i>Amorphus coralli</i> DSM 19760	Schleim einer Koralle, Rotes Meer	Israel
<i>Polymorphum gilvum</i> SL003B-26A1	Erdöl-belasteter, saliner Boden	China
<i>Variovorax paradoxus</i> S110	aus dem Inneren einer Kartoffelpflanze	New York, USA
<i>Variovorax paradoxus</i> 110B	Rhizosphäre der <i>Arabidopsis thaliana</i>	k.A.
<i>Variovorax</i> sp. HH01	Bodenproben Botanischer Gärten, Phenylmalonat als C-Quelle (A)	Deutschland
<i>Variovorax</i> sp. HH02	belasteter Boden (chemische Industrie)	Deutschland
<i>Variovorax paradoxus</i> B4	belasteter Boden (chemische Industrie)	Deutschland
<i>Variovorax paradoxus</i> 4MFCo3.1	Rhizosphäre der <i>Arabidopsis thaliana</i>	k.A.
<i>Pseudacidovorax intermedius</i> NH-1	Südchinesisches Meer	China
<i>Achromobacter</i> sp. KU1311	Bodenprobe, Phenylmalonat als C-Quelle (A)	k.A.
<i>Achromobacter</i> sp. HH01	Bodenproben Botanische Gärten, Phenylmalonat als C-Quelle (A)	Deutschland
<i>Bordetella bronchiseptica</i> KU 1201	Bodenprobe, Phenylmalonat als C-Quelle (A)	k.A.
<i>Alcaligenes faecalis phenolicus</i> DSM 16503	Abwasser-Bioreaktor	Texas, USA
<i>Alcaligenes faecalis subsp. faecalis</i> NCIB 8687	arsenhaltige Desinfektionslösung für Kühe	Australien
<i>Enterobacter cloacae</i> KU1313	Bodenprobe, Phenylmalonat als C-Quelle (A)	k.A.
<i>Pseudomonas azotifigens</i> DSM 17556	Kompost (hyperthermer Bereich)	Japan

Der Großteil der *amd*-tragenden Organismen stammt aus Bodenproben. Böden gehören zu den artenreichsten Habitaten unseres Planeten. Schätzungen zufolge enthält die oberste Bodenschicht mehr als 10^{10} bakterielle Zellen pro Gramm Boden (Torsvik et al. 1990) mit 10^3 - 10^6 verschiedenen bakteriellen „Spezies“ (Gans et al. 2005; Fierer et al. 2007; Roesch et al. 2007). Da der Großteil der Bodenbakterien unter Laborbedingungen nicht kultivierbar ist (Hugenholtz et al. 1998; Hill et al. 2000; Janssen et al. 2002), erfolgt die Bestimmung der Artenvielfalt meist mittels DNA-Isolierung und Einteilung in operative taxonomische Einheiten (OTU), aufgrund von Übereinstimmungen der DNA-Sequenz ganzer Genome oder

der rRNA-Gensequenz der kleinen ribosomalen Untereinheit. Die bakterielle Zusammensetzung des Bodens ist abhängig von der jeweiligen Probe, jedoch sind neben den *Actinobacteria* und *Firmicutes* die *Proteobacteria* die häufigsten kultivierbaren Bodenbakterien (Ottow 2011). Die Auswertung der dominanten Phyla von Bakterien in Böden aufgrund von 16S-rRNA und 16S-rRNA-Genen ergab, dass *Proteobacteria* den größten Anteil der Sequenzen stellten, wobei die Verteilung auf die einzelnen Klassen variierte (Janssen 2006; Fierer et al. 2007; Roesch et al. 2007; Spain et al. 2009; Montecchia et al. 2015). Meist sind α -*Proteobacteria* am häufigsten detektiert worden, gefolgt von β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* und δ -*Proteobacteria*, wohingegen die Klassen ε und ζ oft nicht nachweisbar waren. Die meisten *amd*-tragenden Bakterien gehören zu den β -*Proteobacteria* mit 12 Vertretern. Bis jetzt sind nur zwei Vertreter der γ -*Proteobacteria* und keine δ -*Proteobacteria* mit AMDase-Genen bekannt, trotz ihres zahlreichen Vorkommens in Böden. Desweiteren würde man bei der Vielzahl an Bodenorganismen eine deutlich höhere Zahl an AMDase-kodierenden Bakterien erwarten und das Auftreten in anderen typischen Bakterienphyla in Böden, wie *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* und *Bacteriodetes* (Janssen 2006; Fierer et al. 2007; Roesch et al. 2007; Spain et al. 2009; Montecchia et al. 2015). Die Vertreter der *amd*-tragenden Organismen beschränkten sich aber lediglich auf einzelne Stämme der α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria* und γ -*Proteobacteria*. Bei den in den Datenbanken entdeckten *amd*-Genen, wurde kein Fokus auf die Anreicherung AMDase-aktiver Organismen gelegt (Tabelle 13). Die selektive Anreicherung auf bestimmte Substrate oder Toleranz gegenüber chemischen Verbindungen könnte die Anzahl AMDase-aktive Organismen verringert haben. Aber auch bei den Umweltproben die auf Phenylmalonsäure angereichert wurden, konnten nur Vertreter der *Proteobacteria* identifiziert werden (Miyamoto and Ohta 1992a; Miyamoto et al. 2007; Miyamoto et al. 2008). Die Suche in Sequenzdaten von Metagenomen brachte keine Organismen anderer Phyla oder Klassen zu Tage. Da wenig bis gar nichts über die chemische Zusammensetzung der Proben bekannt ist, ist es nicht möglich Faktoren zu ermitteln, die das Auftreten bzw. die Konservierung der AMDase-Gene begünstigt haben könnten. Doch beim Vorkommen solcher begünstigenden Umweltfaktoren in einem Habitat, hätte eine größere Anzahl an AMDase-aktiven Bakterien in den Bodenproben isoliert werden müssen. Das seltene Vorkommen der Enzyme bei Bodenbakterien könnte ein Indiz für einen geringen kompetitiven Vorteil der AMDasen in diesem Habitat sein.

Der GC-Gehalt ist ein wichtiger Parameter bei der Variabilität von Genomsequenzen und schwankt bei Bakterien zwischen Werten von 13,5 % bei *Candidatus Zinderia insecticola* (McCutcheon and Moran 2010) bis zu 74,9 % bei *Anaeromyxobacter dehalogenans* (Thomas et al. 2008). Untersuchungen zeigten, dass der GC-Gehalt mit verschiedenen Faktoren wie Genomgröße (Moran 2002), Kodon-Nutzung (Lightfield et al. 2011) oder Lebensweise (Rocha and Danchin 2002) korreliert. So gibt es beispielsweise die Tendenz von Organismen mit großen Genomen zu höheren GC-Gehalten und zu einem Leben in einer anspruchsvollen und unbeständigen Umgebung, die einen komplexen Stoffwechsel voraussetzt (Foerstner et al. 2005). Der GC-Gehalt der AMDase-Gene ist sehr hoch und liegt zwischen 58 % - 72 %. Auch der durchschnittliche GC-Gehalt der Bakteriengenome der einzelnen Vertreter liegt in diesem Bereich und ist charakteristisch für Bodenbaktererien (Foerstner et al. 2005). Auffällig ist, dass, mit Ausnahme der *Aminobacter*- und *Variovorax*-Stämme, der GC-Gehalt des Gens höher ist als der Durchschnittswert der Genome (Abbildung 45). Die Abweichungen der GC-Gehalte der AMDase-Gene betragen < 10 % und liegen damit wahrscheinlich im normalen Schwankungsbereich, der von Bakterien toleriert wird (Nishida 2012a; Nishida 2012b).

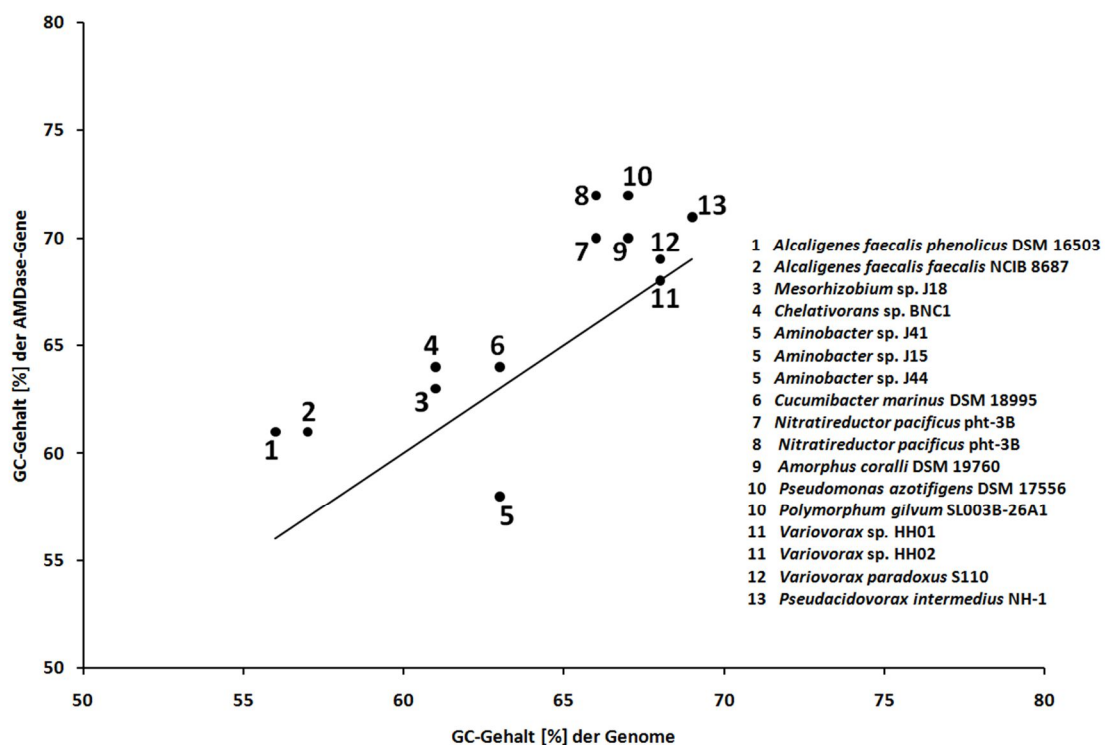


Abbildung 45: GC-Gehalt der AMDase-Gene in Abhängigkeit zum GC-Gehalt der Genome. Die *amd*-tragenden Bakterien sind mit Nummer versehen. *Nitratireductor* besitzt zwei Varianten des Gens. Die Gerade entspricht identischer GC-Gehalte bei AMDase-Genen und Genomen.

Die Verwandtschaft der Aminosäuresequenzen der Gene spiegelt in etwa die phylogenetische Verwandtschaft wider (Abbildung 31). Auf Aminosäureebene ist eine hohe Sequenzübereinstimmung zwischen den Vertretern der einzelnen Klassen sichtbar. Dies ist Indiz für die Entwicklung der AMDase-Gene aus einem gemeinsamen Vorläufer. Die beiden Vertreter der *γ-Proteobacteria* befinden sich in den Zweigen der *α-Proteobacteria* und *β-Proteobacteria*. Das Enzym aus *Pseudomonas azotifigens* ist homolog zu Enzymen der *α-Proteobacteria*, während das Enzym aus *Enterobacter cloacae* Sequenzübereinstimmungen mit AMDasen der *β-Proteobacteria* aufweist. Dies spricht für einen Erwerb der Gene durch horizontalen Gentransfer. Aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen und Gemeinsamkeiten in der Sequenzumgebung der *amd*-Gene, ließen sich die bisher entdeckten Enzyme in 7 Enzymcluster einteilen. Auffällig beim Vergleich der Genumgebung war die Übereinstimmung von Nukleotidsequenzabschnitten in den Organismen *Nitratireductor pacificus* und *Cucumibacter marinus*, zweier mariner Proben sowie *Amorphus coralli* und *Chelativorans* sp. BNC1. Dies deutet auf den Austausch größerer Sequenzbereiche über einen horizontalen Gentransfer hin, der, im Vergleich zu den restlichen Vertretern, kürzere Zeit zurück liegen könnte.

Die Entstehung und Verbreitung von Genen ist schwer nachzuvollziehen. Die unzähligen Möglichkeiten der DNA-Rekombination bei Prokaryoten, Reparaturmechanismen und kurze Generationszeiten erschweren eine Spurensuche erheblich. Es gibt keine offensichtlichen Sequenzmerkmale wie Phagengene, Transposons oder Spuren anderer beweglicher Elemente in unmittelbarer Sequenzumgebung der AMDase-Gene. Das Nichtvorhandensein schließt derartige Ereignisse bei der Verbreitung der Gene jedoch nicht aus.

4.3.4 Clusterbildung der AMDasen innerhalb der *Proteobacteria*

Die Klassifizierung der AMDasen erfolgte durch Vergleiche der Proteinsequenzen und Sequenzumgebung der AMDase-Gene und machte eine Einteilung der Gene in sieben Cluster möglich (Tabelle 14). Gemeinsame Merkmale sind das Vorkommen von Genen, kodierend für Transporter der TT-Familie, TRAP-Transporter oder ABC-Transporter. Auffällig war auch das gehäufte Auftreten von Genen, kodierend für ein MR/MLE (Mandelat-Racemase/Muconat laktonisierendes Enzym).

Tabelle 14: Übersicht über AMDase-Cluster. Abkürzungen: TTT (dreiteilige Tricarboxylat-Transporter), ABC (Transporter mit ATP-Bindungskassette), TRAP (dreiteilige ATP-unabhängige periplasmatische Transporter), MR/MLE (Mandelat-Racemase/Muconat laktonisierendes Enzym), AMDase (Arylmalonat-Decarboxylase) nicht bekannt (n.b.), biochemisch charakterisiert (b.c.), x (vorhanden). Das Gen aus *Pseudoacidovorax* wurde nicht mit einbezogen, da keine ausreichenden Sequenzdaten zur Verfügung stehen.

Cluster	Transporter	Organismen	MR/MLE	AMDase-Aktivität
I	TTT	<i>Bordetella bronchiseptica</i> KU 1201	n.b.	b.c.
		<i>Achromobacter</i> sp. KU1311	n.b.	b.c.
		<i>Enterobacter cloacae</i> KU1313	n.b.	b.c.
		<i>Achromobacter</i> sp. HH01		Plattentest
II	TTT	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	x	putativ
		<i>Variovorax paradoxus</i> 110B	x	putativ
		<i>Variovorax</i> sp. HH01	x	b.c.
		<i>Variovorax</i> sp. HH02	x	b.c.
		<i>Variovorax paradoxus</i> B4	x	putativ
		<i>Variovorax paradoxus</i> 4MFCol3.1	x	putativ
III	TTT	<i>Alcaligenes faecalis phenolicus</i> DSM 16503		putativ
		<i>Alcaligenes faecalis subsp. faecalis</i> NCIB 8687		putativ
IV	TTT	<i>Aminobacter</i> sp. J15	x	putativ
		<i>Aminobacter</i> sp. J44	x	putativ
		<i>Aminobacter</i> sp. J41	x	putativ
V	TTT	<i>Chelativorans</i> sp. BNC1	x	putativ
		<i>Amorphus coralli</i> DSM 19760	x	putativ
VI	ABC	<i>Cucumibacter marinus</i> DSM 18995		putativ
		<i>Nitratireductor pacificus</i> pht-3B		putativ
VII	TRAP	<i>Nitratireductor pacificus</i> pht-3B	x	putativ
		<i>Mesorhizobium</i> sp. J18	x	b.c.
		<i>Pseudomonas azotifigens</i> DSM 17556	x	putativ
		<i>Polymorphum gilvum</i> SL003B-26A1		b.c.

Fünf der sieben Cluster sind durch Gene, kodierend für Transporter der TTT-Familie (TC 2.A.80) in unmittelbarer Sequenzumgebung zu *amd* gekennzeichnet. Bei den Organismen handelt es sich hauptsächlich um β -Proteobacteria, mit Ausnahme der *Aminobacter*-Stämme (Cluster IV), *Amorphus coralli* und *Chelativorans* sp. BNC1 (Cluster V), die zu den α -Proteobacteria gehören. Die dreiteiligen, Na⁺-abhängigen Tricarboxylat-Transporter befördern u.a. Citrat und Citrat-Derivate. Der Vermutung liegt nahe, dass Proteine der TTT-Familie an der Erkennung und Aufnahme des Substrates der AMDasen beteiligt sind. Die Transporter bestehen aus zwei Membranproteinen und einem periplasmatischen Substratbindungsprotein (Winnen et al. 2003). Der erste beschriebene Vertreter dieser Transporter ist TctCBA aus *Salmonella typhimurium* (Somers and Kay 1983; Sweet et al. 1984; Widenhorn et al. 1988a), wobei TctA und TctB integrale Membranproteine sind und Tct das periplasmatische Citrat-Bindungsprotein (Widenhorn et al. 1988b). Weitere orthologe Proteine wurden u.a. in *Bordetella pertussis* (Antoine et al. 2000), *Halobacteria* und *Thermococci* (Makarova et al. 2015) oder *Corynebacterium glutamicum* (Brockner et al. 2009) beschrieben. Gene kodierend für TctC-Homologe sind bei einigen β -Proteobacteria

überrepräsentiert (Antoine et al. 2003). Nur eine geringe Anzahl dieser Gene sind Teil polycistronischer Operons der Transporter der TTT-Familie. Der Großteil dieser als *bug* (*Bordetella uptake gene*) bezeichneten Gene sind „verwaiste“ Gene und dienen wahrscheinlich als extracytoplasmatische Substratrezeptoren (Antoine et al. 2003). Das Vorkommen in anderen Organismen schwankt von einem bis elf Genen, wobei die Bodenbakterien meist die größeren Genzahlen aufweisen (Antoine et al. 2003). Dies bestätigt sich auch für die *amd*-tragenden Bakterien, die, laut IMG-Datenbank, zwischen 15 und 29 Gene der TTT-Familie kodieren, angeführt von den *Variovorax*-Stämmen mit 113-157 annotierten Genen. In einigen Bakterien wird die Expression des *tctCBA*-Operons von einem Zweikomponenten-Regulationssystem gesteuert (Widenhorn et al. 1988b; Widenhorn et al. 1989; Antoine et al. 2003; Brocker et al. 2009). Für das periplasmatische Rezeptorprotein aus *Bordetella pertussis* wurde darüber hinaus eine Beteiligung an der Substrat-Erkennung nachgewiesen (Antoine et al. 2005). Für einige der 91 Kopien der periplasmatischen Rezeptorproteine aus *Bordetella pertussis*, die von „verwaisten“ Genen kodiert werden, wurden bereits Strukturanalysen durchgeführt. So handelt es sich bei dem Protein BugD vermutlich um einen Aspartat-Rezeptor (Huvent et al. 2006a), während BugE als Glutamat-Rezeptor identifiziert wurde (Huvent et al. 2006b). Beide Rezeptoren fallen zusammen mit Bug27, welcher verschiedene aromatische Substrate bindet (Herrou et al. 2007), in den Cluster F der Substratbindungsproteine (Berntsson et al. 2010a). Die Einteilung in Cluster erfolgte abhängig von Merkmalen der räumlichen Strukturen der Proteine. Cluster F umfasst Substratbindungsproteine mit einer großen Bandbreite an Substraten von trigonal planaren Anionen bis hin zu Aminosäuren und kompatiblen Soluten wie Betain und Glycin (Berntsson et al. 2010b).

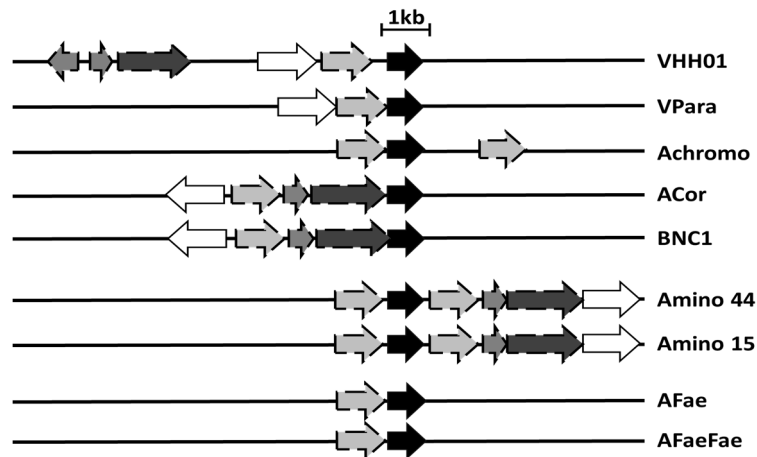


Abbildung 46: Vorkommen der Gene der TTT-Familie in der Sequenzumgebung des *amd*-Gens. Abgebildet sind die Genumgebungen des Gens *amd* in den Stämmen *Variovorax* sp. HH01 (VHH01), *Variovorax paradoxus* S110 (VPara), *Achromobacter* sp. HH01 (Achromo), *Amorphus coralli* DSM19760 (ACor), *Chelativorans* sp. BNC1 (BNC1), *Aminobacter* sp. J44 (Amino 44), *Aminobacter* sp. J15 (Amino 15), *Alcaligenes faecalis phenolicus* DSM 16503 (AFae), *Alcaligenes faecalis faecalis* NCIB 8687 (AFaeFae). ORFs sind als Pfeile dargestellt und kodieren AMDasen (schwarz), Mandelat-Racemasen/Muconat-laktonisierende Enzyme (weiß mit durchgehenden Linien) und Transporter der TTT-Familie (breit gestrichelt). Gene, kodierend für TctC-Homologe sind hellgrau, TctB-Homologe grau und TctA-Homologe dunkelgrau unterlegt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung von Genen, kodierend für Proteine anderer Funktionen, verzichtet.

Abbildung 46 zeigt das Vorkommen der für Homologe der TTT-Familie kodierenden Gene in der Sequenzumgebung der AMDase-Gene. Alle Vertreter der β -Proteobacteria (für die Sequenzdaten vorliegen) kodieren Gene für TctC-Homologe in unmittelbarer Nachbarschaft zu den AMDase-Genen, während die α -Proteobacteria der Gattungen *Aminobacter*, *Chelativorans* und *Amorphus* vermutlich ein Operon bestehend aus *tctC*, *tctB* und *tctA* besitzen. Die hohe Zahl an Vertretern dieser Gruppe könnte ein Indiz für einen möglichen Ursprung der Arylmalonat-Decarboxylasen in einem der TTT-Cluster sein.

Auffällig ist auch das gehäufte Auftreten von Genen für Mandelat-Racemasen/Muconat-laktonisierende Enzyme (MR/MLE) in der Umgebung der AMDase-Gene bei einem Großteil aller *amd*-tragenden Organismen (Abbildung 32, Tabelle 14). Mandelat-Racemasen (EC 5.1.2.2) und Muconat-Cycloisomerasen (auch Muconat-laktonisierende Enzyme, EC 5.5.1.1) gehören zur Enolase-Superfamilie und sind am Stoffwechsel aromatischer Verbindungen beteiligt (Hasson et al. 1998). Die Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -abhängigen Metalloenzyme, welche unterschiedliche chemische Reaktionen katalysieren, stammen von einem gemeinsamen Vorläufermolekül ab (Neidhart et al. 1990). Mandelat-Racemasen katalysieren die Umwandlung von Enantiomeren der Mandelsäure, während Muconat laktonisierende Enzyme die Cycloisomerisierung von *cis,cis*-Muconaten zu Muconolactonen ermöglichen (Neidhart et al. 1990). Sowohl AMDasen als auch MR/MLE katalysieren die Abspaltung eines

α -Protons einer Carboxylgruppe des Substrates, welche zur Bildung eines instabilen, anionischen Zwischenproduktes führt (Hasson et al. 1998; Okrasa et al. 2008). Die Rolle dieses Enzyms bei der Aufnahme oder Umwandlung von AMDase-Substraten oder -Produkten ist unklar. *Cucumibacter marinus*, *Polymorphum gilvum* und den *Alcaligenes*-Stämmen fehlt ein MR/MLE-Gen in mittelbarer Nachbarschaft zu *amd*. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Stämme *amd*-Gene exprimieren und aktive AMDasen produzieren. Für *Achromobacter* sp. HH01 stehen nur wenige Sequenzinformationen zur Verfügung. In dem vorliegenden Sequenzabschnitt war keine MR/MLE kodiert (Abbildung 32). Trotzdem konnte der Stamm mittels Plattenscreening isoliert werden. Dies würde bedeuten, dass das MR/MLE-Gen in keinem funktionellen Zusammenhang zu *amd* steht und für die Verwertung des AMDase-Substrates nicht zwingend nötig ist. Jedoch sind Sequenzdaten stromabwärts des *amd* erforderlich und die Verifizierung der AMDase-Aktivität des *Achromobacter*-Isolates mittels HPLC, um eine abschließende Bewertung tätigen zu können. *Achromobacter* sp. HH01 stellt zum heutigen Zeitpunkt den einzigen Vertreter des Clusters I dar, für den Informationen über die Sequenzumgebung vorliegen und erlaubt so eine Einteilung des Clusters in die TTT-Familie.

Cluster VII umfasst *amd*-tragende Bakterien mit TRAP-Transportern in der Sequenzumgebung der *amd*-Gene, zu denen *Nitratireductor*, *Pseudomonas* und *Polymorphum* gehören. Auch *Mesorhizobium* ist Teil dieses Clusters, jedoch liegen keine Daten über Sequenzen stromaufwärts des MR/MLE vor. Aber der Stamm kodiert eine Vielzahl von Genen putativer TRAP-Transporter an anderen Stellen im Genom (<https://img.igi.doe.gov>). TRAP-Transporter (TC 2.A.56) sind dreiteilige, ATP-unabhängige periplasmatische Transporter, die sowohl in Bakterien als auch in Archaeen vorkommen und die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten und anderen organischen Anionen unter Ausnutzung eines elektrochemischen Gradientens ermöglichen (Kelly and Thomas 2001; Fischer et al. 2010). Der erste beschriebene TRAP-Transporter stammte aus *Rhodobacter capsulatus* (Forward et al. 1997). Weitere Exemplare wurden neben einer Vielzahl von Bakterien und Archaeen, auch in den humanpathogenen Organismen *Haemophilus influenzae* (Müller et al. 2006) und *Vibrio cholerae* (Mulligan et al. 2012) entdeckt. Sowohl TT-Transporter als auch TRAP-Transporter und ABC-Transporter nutzen periplasmatische Substratbindungsproteine (Jason A. Forward et al. 1997; Nikaido and Hall 1998; Winnen et al. 2003). Bei TRAP-

Transporter unterteilen sich diese in Vertreter der DctP- und der TAXI-Familie, wobei letztere weniger verbreitet sind in Bakterien, aber die einzigen Substratbindungsproteine der TRAP-Transporterfamilie in Archaea (Kelly and Thomas 2001). Die Membranproteine der TRAP-Transporter bestehen aus einer großen Untereinheit „M“, welche den Transporttunnel bildet (Rabus et al. 1999) und einer kleinen Untereinheit „Q“, deren Funktion bisher nicht geklärt werden konnte (Wyborn et al. 2001). Das Substratspektrum der Substratbindungsproteine ist breit gefächert. Als Substrate dienen u.a. C₄-Dicarboxylate, wie L-Malat, Fumarat und Succinat, N-Acetylneuraminsäure, Lactat, Glutamat, Gluconat, Ectoin und verschiedene Benzoat-Derivate (Mulligan et al. 2011). Die Aufnahme von 4-Chlorobenzoat in *Comamonas* sp. DJ-12 wird durch den TRAP-Transporter FcbT1-T3 ermöglicht (Chae and Zylstra 2006). Die dazugehörigen Gene befinden sich in einem induzierbaren Operon, zusammen mit einem Gen, welches ein Enzym kodiert, das die Umwandlung von 4-Chlorobenzoat zu 4-Hydroxybenzoat katalysiert. Ein analoger Zusammenhang wäre auch zwischen den Genen der TRAP-Transporter und der AMDase-Gene denkbar.

Cluster V umfasst die kleinste Gruppe *amd*-tragender Organismen mit den Vertretern *Nitratireductor pacificus* und *Cucumibacter marinus*, beides marine Isolate, mit ABC-Transportern in unmittelbarer Nachbarschaft zu den AMDase-Genen. Die ubiquitären ABC-Transporter sind eine der größten Superfamilien paraloger Proteine und Gegenstand einer Vielzahl von Übersichtsartikeln (Schneider and Hunke 1998; Higgins 2001; Davidson et al. 2008). Ein typischer Aufbau dieser Transporter besteht aus zwei Transmembrandomänen und zwei ATP-Bindungsdomänen. Für die Aufnahme von Substanzen in die Zellen sind die ABC-Transporter meist mit einem Substratbindungsprotein ausgestattet, dass im Periplasma bei Gram-negativen Bakterien lokalisiert ist oder verankert über eine Lipidgruppe an der Cytoplasmamembran bei Gram-positiven Organismen (Perego et al. 1991). Bei den an *amd* angrenzenden Genen der beiden marinen Isolate handelt es sich um putative Peptid/Nickel-Transportsysteme (Navarro et al. 1993). Stromaufwärts kodieren Gene für die Permease-Untereinheiten und das Substratbindungsprotein, getrennt durch einen ORF, annotiert als mögliche Oxidoreductase. Stromabwärts kodieren Gene die beiden ATP-Bindungsdomänen. Der Einschub der beiden Gene in das ABC-Transporter-Operon stellt dessen Funktionalität in Frage, auch wenn die einzelnen Gene des Operons erhalten geblieben sind. Einige andere Organismen kodieren ABC-Transporter zusätzlich zu Genen für Transporter der TT-Familie oder des TRAP-Systems. Die *Alcaligenes*-Stämme kodieren stromabwärts Gene für ABC-

Transporter-Untereinheiten, deren Substrat verzweigt Aminosäuren sein könnten. *Alcaligenes faecalis phenolicus* und *Cucumibacter* besitzen Gene, kodierend für putative ABC-Transporter zur Aufnahme von Eisen-(III)-Ionen. *Pseudomonas* und *Mesorhizobium* kodieren stromaufwärts ihres AMDase-Gens ABC-Systeme, homolog zu Aminosäure- bzw. Polyamin-Transportern. Die Gene des putativen Transporters für verzweigte Aminosäuren in *Pseudomonas* befinden sich sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts des *amd* und lassen somit eine Integration des Sequenzabschnittes mit Genen, kodierend für AMDase, MR/MLE und TRAP-System in das bestehende Operon des ABC-Transporters vermuten. Dies könnte sowohl in einem Schritt durch Einbau des gesamten Sequenzabschnittes als auch sukzessive erfolgt sein. Eine Notwendigkeit der ABC-Transporter zur Aufnahme der AMDase-Substrate ist bei der vorhergesagten Substrat-Spezifität der Transporter unwahrscheinlich. Zukünftige Versuche sollten klären, ob (i) die einzelnen Bakterienstämme AMDase-aktiv sind, (ii) Transporter oder MR/MLE an der Aufnahme und dem Abbau der AMDase-Substrate beteiligt sind und (iii) ob AMDase-Gene einzeln exprimiert werden oder als Teil eines Operons zusammen mit Genen, kodierend für MR/MLE und/oder Transportern im Umfeld der *amd*-Gene. Es wird sich zeigen, ob weitere AMDasen, die in Datenbanken oder mittels Screening entdeckt werden, sich in die bestehenden Cluster einfügen oder ob aufgrund der neuen Datenlage eine Reorganisation der Enzymgruppen nötig ist.

4.3.5 Putativer Abbauweg und Energiebilanz des Substrates Phenylmalonat am Beispiel von *Variovorax paradoxus* S110

Einige der Organismen mit *amd*-Genen stammen aus Bodenproben, die auf Phenylmalonat als einziger Kohlenstoffquelle angereichert wurden. Um den Nutzen des Substrats Phenylmalonat für die Bakterien abschätzen zu können, wurde der Energiegewinn eines putativen Abbauweges (3.8.4) betrachtet. Das Decarboxylierungsprodukt der Reaktion ist Phenylelessigsäure. Phenylelessigsäure ist ein zentrales Stoffwechselzwischenprodukt einer Vielzahl von natürlichen und anthropogenen aromatischen Verbindungen (Luengo et al. 2001). Orthologe Gene, die für Phenylacetat abbauende Enzyme kodieren, sind bei Bakterien weit verbreitet. Die Funktionalität dieser Gene wurde jedoch nur in wenigen Organismen, darunter *Pseudomonas putida* und *Escherichia coli*, nachgewiesen (Olivera et al. 1998; Ismail et al. 2003; Di Gennaro et al. 2007; Teufel et al. 2010).. Der aerobe Abbau beginnt mit der Aktivierung des Phenylacetats durch die Phenylacetat-CoenzymA-Ligase (Martínez-Blanco et al. 1990). Der weitere Ablauf, sowie die Rolle der einzelnen Enzyme des Abbauweges sind bis

heute nicht eindeutig geklärt. Bei einem möglichen aeroben Abbauweg (Teufel et al. 2010), dargestellt in Abbildung 43, kommt es nach der Bildung des Phenylacetyl-CoAs zur Epoxidierung des Thioesters an Position 1 und 2 des Ringsystems, katalysiert durch eine aus 5 Untereinheiten bestehenden Oxygenase (PaaABCDE). Diese Gene sind bei etwa 16 % aller sequenzierten Bakterienarten zu finden, vor allem in vielen *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria* und *γ-Proteobacteria* (Fuchs et al. 2011). Die anschließende Isomerisierung (PaaG) und Ringspaltung (PaaZ) führt zu einer 2,3-gesättigten, aliphatischen Dicarbonsäure und Acetyl-CoA. Danach erfolgt eine β -Oxidation des 2,3-Dehydroadipyl-CoAs durch die Enzyme PaaJ, PaaH und PaaF und die Bildung von Succinyl-CoA und eines weiteren Moleküls Acetyl-CoA.

Die Ausbeute des Abbauweges besteht somit aus einem Molekül Succinyl-CoA und zwei Molekülen Acetyl-CoA, sowie einem Reduktionsäquivalent $\text{NADH}+\text{H}^+$. Die Aktivierung der Phenylelessigsäure verbraucht ein ATP. Am Beispiel des komplett sequenzierten *Variovorax paradoxus* S110 (Han et al. 2011) wurde die weitere Bilanzierung durchgeführt. Für diesen Organismus wäre eine Einspeisung der Stoffwechselprodukte in den Citratzyklus denkbar. Pro Acetyl-CoA könnten so drei Moleküle $\text{NADH}+\text{H}^+$, ein FADH_2 und ein Molekül ATP gewonnen werden. Der Abbau von Succinyl-CoA würde ein Molekül ATP über Substratstufenphosphorylierung, sowie je ein Molekül $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 ergeben. Zusammen ergibt dies acht Moleküle $\text{NADH}+\text{H}^+$, drei Moleküle FADH_2 und zwei Moleküle ATP.

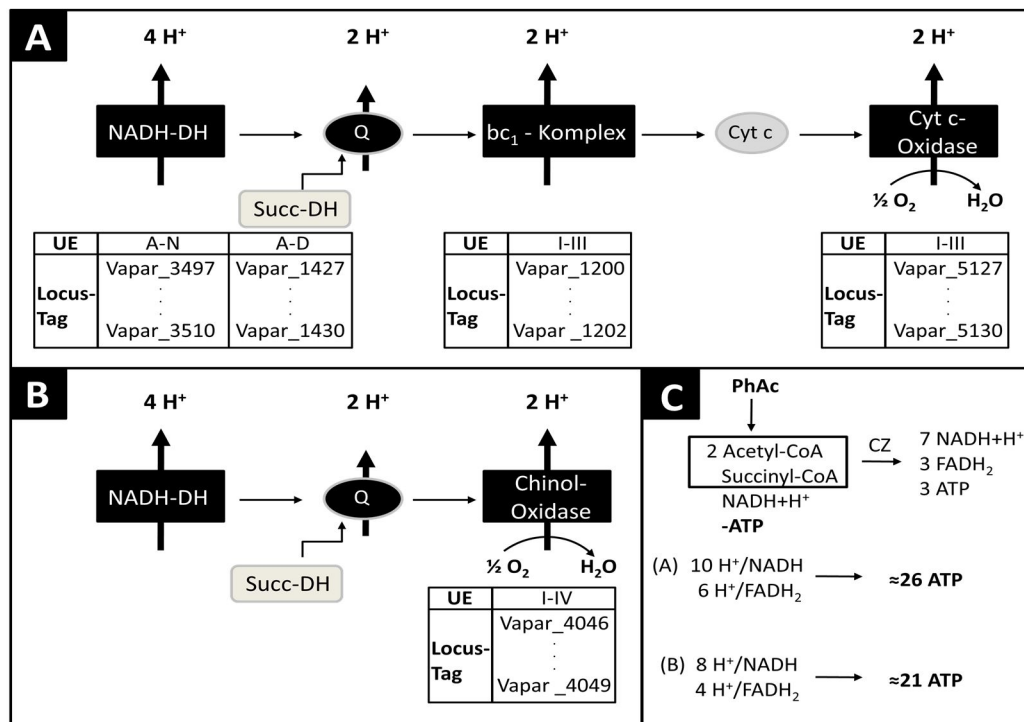


Abbildung 47: putative Elektronentransportketten am Beispiel von *Variovorax paradoxus* S110. (A) Hypothetische Elektronentransportkette (ETK) bei aerober Atmung zur Verwertung der Reduktionsäquivalente des Phenylacetat-(PhAc)-Abbaupfades, bestehend aus NADH-Dehydrogenase (NADH-DH), Ubichinon (Q), Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreductase (bc₁-Komplex), Cytochrom c (Cyt c) und terminaler Cytochrom-c-Oxidase. Alternativ wäre ein ETK mit terminaler Chinol-Oxidase möglich (B). Locus-Tags der Gene aus *Variovorax paradoxus* S110, die potentielle Bestandteile der Atmungsketten kodieren, wurden in den Tabellen unterhalb der ETK aufgeführt. Die ermittelten Energiebilanzen des PhAc-Abbaupfades sind in Abschnitt C zu sehen. UE: Untereinheiten, CZ: Citratzyklus

Bei einer hypothetischen Elektronentransportkette bestehend aus NADH-Dehydrogenase, Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreductase und Cytochrom-c-Oxidase bzw. Succinat-Dehydrogenase, Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreductase und Cytochrom-c-Oxidase und einem Protonen/ATP-Verhältnis von 4 (Steigmiller et al. 2008) ergeben sich 26 ATP pro Phenylacetat und somit 80% der Energie eines Moleküls Glucose bei aerober Veratmung. Alternative Elektronentransportketten, wie bei der Übertragung der Elektronen aus dem Chinon-Pool auf eine Chinol-Oxidase würden zu geringeren Ausbeuten führen und etwa 21 ATP pro Molekül Phenylacetat ergeben. Theoretisch wären also hohe bis moderate ATP-Ausbeuten denkbar und sollten ein gutes Wachstum auf Phenylacetat und komplexeren Verbindungen, welche in diesen Stoffwechselweg münden, ermöglichen. Verdopplungszeiten bei Wachstum auf Phenylacetat liegen bei 180 min für *E. coli* (Parrott et al. 1987) oder bei 83 min für *Klebsiella aerogenes* nach Anpassung an das Substrat (Grant 1967) und sind somit zwar deutlich geringer als die Energiebilanz erwarten lassen würde, ermöglichen aber immer noch ein moderates Wachstum. Interessant wären vergleichende

Wachstumskurven AMDase-aktiver Organismen für die Substrate Phenylmalonat, Phenylacetat und Succinat, sowie Transkriptom-Analysen Phenylmalonat und Phenylacetat induzierter und nicht induzierter Kulturen.

Weitere entscheidende Faktoren für den tatsächlichen Nutzen eines Substrates als effektive Kohlenstoff- und Energiequelle sind die Toxizität einer Verbindung, die Geschwindigkeit des Abbaus oder das Vorhandensein geeigneter Transportmechanismen. Da das natürliche Substrat der Arylmalonat-Decarboxylasen nicht bekannt ist, ist keine Aussage über den möglichen Einfluss dieser Verbindung auf den Stoffwechsel der Organismen möglich, der eventuell über die Funktion als Kohlenstoff- und Energiequelle hinausgeht. Desweiteren könnten Konzentrationen und Halbwertszeiten des Substrats im Habitat der Organismen Hinweise auf die ursprüngliche Funktion der Enzyme geben.

4.3.6 AMDase-Aktivität innerhalb der Gattung *Variovorax*

Variovorax ist mit sechs Vertretern zurzeit die AMDase-reichste Gattung der *Proteobacteria*. Zudem konnten vier weitere, AMDase-aktive Isolate in den untersuchten Bodenproben der Gattung *Variovorax* zugeordnet werden (Tabelle 9). Neben *Variovorax paradoxus*-Stämmen, konnten auch in den Typstämmen *Variovorax boronicumulans* und *Variovorax dokdonensis* AMDase-Aktivitäten mittels Plattentest nachgewiesen werden. Das häufige Vorkommen des *amd* im Stammbaum dieser Bakterien lässt einen frühen Erwerb bzw. eine frühe Bildung des Gens in der Entstehungsgeschichte der *Variovorax*-Gattung vermuten. Möglicherweise war *Variovorax* eines der ersten *Proteobacteria*, die dieses Gen bildeten bzw. über horizontalen Gentransfer erwarben. Die AMDase-Gene der *Variovorax*-Stämme gehören zu einem der fünf Cluster der TTT-Familie. Der Vergleich der Sequenzumgebung des AMDase-Gens verschiedener *Variovorax*-Stämme (Abbildung 41) zeigte eine konservierte Sequenz im Bereich des *amd*. Auffällig ist das Fehlen eines Sequenzabschnitts, bestehend aus Genen kodierend für einen LysR-Regulator, eine Mandelat Racemase/Muconat laktonisierendes Enzym, ein putatives TctC und die Arylmalonat-Decarboxylase in den Stämmen *Variovorax paradoxus* EPS und *Variovorax paradoxus* sp. CF313. Desweiteren ist auch bei *Variovorax* sp. URHB0020 mit großer Wahrscheinlichkeit kein *amd* im Genom enthalten. Es ist davon auszugehen, dass die Stämme *Variovorax* sp. URHB0020, *Variovorax paradoxus* EPS und *Variovorax paradoxus* sp. CF313 keine AMDase-Aktivität aufweisen. Auch die Typstämmen der Arten *Variovorax gingsengisoli*, *Variovorax soli* und *Variovorax defluvii* waren im Plattentest AMDase-negativ. Denkbar wäre, dass das AMDase-Gen aufgrund eines geringen

selektiven Vorteils für die Bakterien in den jeweiligen Habitaten (meist Boden) verloren gegangen ist.

4.3.7 Hypothesen zum seltenen Vorkommen der AMDasen

Für die begrenzte Anzahl an Vertretern der Arylmalonat-Decarboxylasen und ihre Beschränkung auf die *Proteobacteria* sind verschiedene Gründe denkbar. In Abbildung 48 sind drei mögliche Hypothesen aufgeführt, die das seltene Auftreten dieser Enzyme erklären könnten. Nach Hypothese 1 wären die AMDasen evolutiv junge Enzyme, die erst innerhalb der *Proteobacteria* entstanden sind und deren Ursprung in der *amd*-reichsten Gattung *Variovorax* liegen könnte. Die zweite Hypothese erklärt das seltene Vorkommen als Resultat der eingeschränkten Suchkriterien. Die Sequenzmotive wurden mittels charakterisierter Enzymen abgeleitet, die alle dem Phylum der *Proteobacteria* angehören. Von diesem Sequenzmuster abweichende AMDase-spezifische Merkmale anderer bakterieller oder archaealer Vertreter würden durch das Suchraster fallen. Da *Proteobacteria* eines der dominanten und gut kultivierbaren Phyla in Böden sind (Ottow 2011), ist auch die Isolation von AMDase-aktiven *Proteobacteria* aus Bodenproben wahrscheinlich. Allerdings hätte man hier zusätzlich AMDase-aktive Stämme häufig vorkommender und kultivierbarer Vertreter anderer Phyla, wie *Actinobacteria* oder *Firmicutes* erwarten können, was die erste Hypothese stützen würde. Im Umfeld der putativen AMDase aus *Bordetella bronchiseptica* RB50 (Okrasa et al. 2008), welche die höchste Aminosäuresequenz-Übereinstimmung zu putativen Maleat *cis-trans* Isomerasen zeigte, könnte die Suche nach AMDasen anderer Bakterienphyla und archaealer Varianten begonnen werden, um die zweite Hypothese zu überprüfen. Doch auch bei einem Vorkommen von AMDase-Aktivitäten in anderen Prokaryoten, wäre die Entstehung des *amd*-Gens mit seiner konservierten Sequenz innerhalb der *Proteobacteria* in jüngerer Vergangenheit nicht auszuschließen.

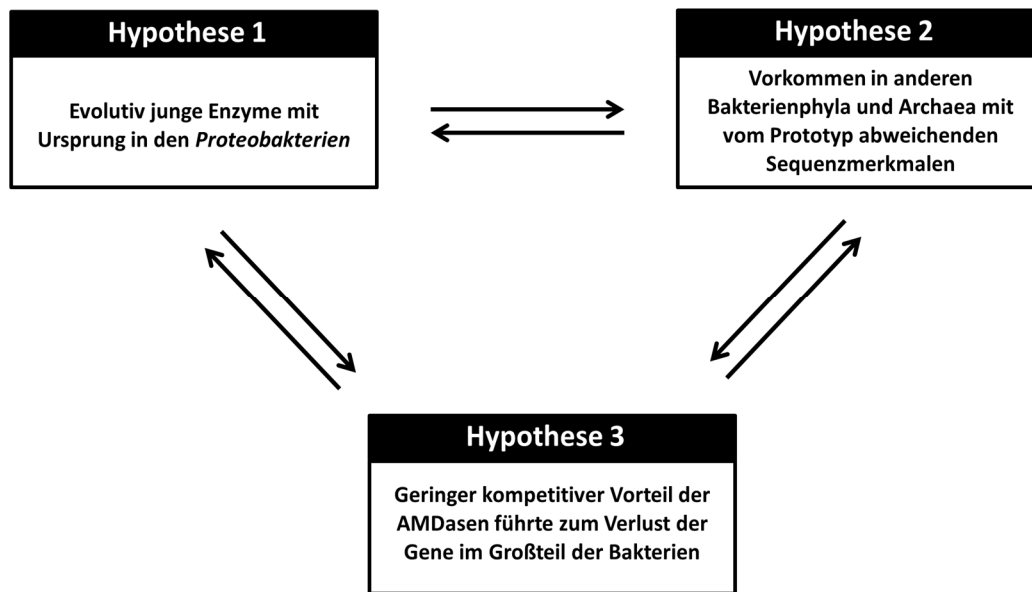


Abbildung 48: Hypothesen zum seltenen Vorkommen der AMDasen.

Eine weitere Hypothese zum singulären Auftreten der Enzyme könnte ein geringer kompetitiver Vorteil der Arylmalonat-Decarboxylasen innerhalb des natürlichen Lebensraums der Organismen sein. Durch einen geringen selektiven Druck wäre ein Verlust des Gens über die Zeit denkbar. Möglicherweise ist ein solches Ausdünnen der Arylmalonat-Decarboxylasen im Stammbaum der Gattung *Variovorax* sichtbar (4.3.6). Es würde sich aber erneut die Frage stellen, ob es bei den AMDase-positiven Organismen Faktoren gegeben hat, die den Erhalt der *amd*-Gene begünstigten. Nicht nur das seltene Vorkommen dieser Enzyme, sondern das vereinzelte Auftreten in Bakterienstämmen bei dem Großteil der *amd*-tragenden Gattungen, verstärkt den Verdacht, dass diesem Gen keine große Bedeutung im Stoffwechsel beizumessen ist, unabhängig vom evolutionären Ursprung der Enzyme. Es bleibt abzuwarten, welche Hypothese die Entdeckung weiterer AMDasen stützt.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine Reihe weiterführender Versuche nahe. Zukünftige Experimente sollten klären, ob die einzelnen Bakterienstämme, welche putative AMDase-Gene tragen, AMDase-aktiv sind. Desweiteren ist die Frage zu klären, ob und welche der *amd* umliegenden Gene in einem funktionellen Zusammenhang zu den AMDase-Genen stehen. Besonders interessant ist, ob die Transporter oder MR/MLE an der Aufnahme und dem Abbau der AMDase-Substrate beteiligt sind und ob AMDase-Gene einzeln exprimiert werden oder als Teil eines Operons zusammen mit Genen, kodierend für MR/MLE und/oder Transportern im Umfeld der *amd*-Gene.

Wichtig ist auch die Fortsetzung der Suche nach Enzymen mit AMDase-Aktivität. Besonders interessant wären Enzyme anderer Bakterienphyla mit von bekannten AMDasen abweichenden Sequenzmustern. Voraussetzung hierfür ist die Optimierung der funktionellen Metagenom-Screenings durch alternative Wirte oder verbesserte Expressionssysteme. Im Umfeld der putativen AMDase aus *Bordetella bronchiseptica* RB50 (Okrasa et al. 2008), welche die höchste Aminosäuresequenz-Übereinstimmung zu putativen Maleat *cis-trans* Isomerasen zeigte, könnte die Suche nach AMDasen anderer Bakterienphyla und archaealer Varianten begonnen werden.

Die meisten Forschungen beschäftigten sich bisher mit der Optimierung der AMDase aus *Bordetella bronchiseptica*. Eine Vielzahl von Enzymvarianten machte die beachtliche Formbarkeit der Substratbindungstasche der Arylmalonat-Decarboxylasen deutlich und unterstrich das große Potenzial der AMDasen als Biokatalysator für verschiedenste α -Aryl- und α -Alkenylmalonate, welche in herausragender Enantiomerenreinheit von bis zu 99% *ee* gebildet werden können. Das gesammelte Wissen über Struktur und Reaktionsmechanismus der Enzyme macht AMDasen zu vielversprechenden Kandidaten für „Protein Engineering“ durch gerichtete Evolution und ergebnisorientierter Umgestaltung („rational redesign“). Weitere Ansatzpunkte wären z.B. die Untersuchung der Rolle der ermittelten AMDase-spezifischen Aminosäuren mit unbekannter Funktion hinsichtlich Stabilität und Reaktionsmechanismus oder die Rekonstruktion eines putativen, gemeinsamen Vorgängermoleküls der AMDasen und Racemasen als Ausgangspunkt für zukünftige Optimierungsversuche.

5 Literaturverzeichnis

- Aakvik, T., K. F. g. Degnes, et al. (2009). "A plasmid RK2-based broad-host-range cloning vector useful for transfer of metagenomic libraries to a variety of bacterial species." FEMS Microbiology Letters **296**(2): 149-158.
- Adams, M. J., G. H. Ellis, et al. (1994). "Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism." Structure **2**(7): 651-668.
- Altenbuchner, J., M. Siemann-Herzberg, et al. (2001). "Hydantoinases and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids." Current Opinion in Biotechnology **12**(6): 559-563.
- Amann, R. L., W. Ludwig, K.H. Schleifer (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiol Rev **59**: 143-169.
- Anand, R., P. C. Dorrestein, et al. (2002). "Structure of Oxalate Decarboxylase from *Bacillus subtilis* at 1.75 Å Resolution." Biochemistry **41**: 7659-7669.
- Anesti, V., I. R. McDonald, et al. (2005). "Isolation and molecular detection of methylotrophic bacteria occurring in the human mouth." Environmental Microbiology **7**(8): 1227-1238.
- Antoine, R., I. Huvent, et al. (2005). "The Periplasmic Binding Protein of a Tripartite Tricarboxylate Transporter is Involved in Signal Transduction." Journal of Molecular Biology **351**: 799-809.
- Antoine, R., F. Jacob-Dubuisson, et al. (2003). "Overrepresentation of a Gene Family Encoding Extracytoplasmic Solute Receptors in *Bordetella*." Journal of Bacteriology **185**(4): 1470-1474.
- Antoine, R., D. Raze, et al. (2000). "Genomics of *Bordetella pertussis* toxins." International Journal of Medical Microbiology **290**(4): 301-305.
- Bachmann, B. J. (1983). "Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Edition 7." Microbiological Reviews **7**(2): 180-230.
- Bar-Even, A., E. Noor, et al. (2011). "The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters." Biochemistry **50**(21): 4402-4410.
- Bellais, S., M. Arthur, et al. (2006). "Aslfm, the D-Aspartate Ligase Responsible for the Addition of D-Aspartic Acid onto the Peptidoglycan Precursor of *Enterococcus faecium*." Journal of Biological Chemistry **281**(17): 11586-11594.
- Benning, M. M., T. Haller, et al. (2000). "New Reactions in the Crotonase Superfamily: Structure of Methylmalonyl CoA Decarboxylase from *Escherichia coli*." Biochemistry **39**: 4630-4639.
- Berg, M. and P. Dimroth (1998). "The biotin protein MadF of the malonate decarboxylase from *Malonomonas rubra*." Archives of Microbiology **170**: 464-468.
- Bergthorsson, U., D. I. Andersson, et al. (2007). "Ohno's dilemma: Evolution of new genes under continuous selection." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(43): 17004-17009.
- Bernstein, J.R., et al. (2007). "Directed Evolution of Ribosomal Protein S1 for Enhanced Translational Efficiency of High GC *Rhodopseudomonas palustris* DNA in *Escherichia coli*." Journal of Biological Chemistry **282**(26): p. 18929-18936.
- Berntsson, R. P.-A., S. H. J. Smits, et al. (2010a). "Addendum to "A structural classification of substrate-binding proteins" [FEBS Lett. 584 (2010) 2606-2617]." FEBS Letters **584**(20): 4373.
- Berntsson, R. P.-A., S. H. J. Smits, et al. (2010b). "A structural classification of substrate-binding proteins." FEBS Letters **584**(12): 2606-2617.
- Bertani, G. (2004). "Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems." Journal of Bacteriology **186**(3): 595-600.
- Bethesda Research Laboratories (1986). "BRL pUC host: *E. coli* DH5aTM competent cells." Bethesda Research Laboratories Focus **8**: 9-12.
- Biebl, H. and N. Pfenning (1978). "Growth Yields of Green Sulfur Bacteria in Mixed Cultures with Sulfur and Sulfate Reducing Bacteria." Archives of Microbiology **117**: 9-16.

- Bijtenhoorn, P., H. Mayerhofer, et al. (2011). "A Novel Metagenomic Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Attenuates *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Virulence on *Caenorhabditis elegans*." *Plos one* **6**(10): e26278.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA " *Nucleic Acids Research* **7**(6): 1513-1523
- Blaesse, M., T. Kupke, et al. (2000). "Crystal structure of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD complexed with a pentapeptide substrate." *EMBO Journal* **19**(23): 6299-6310.
- Böhnke, S. and M. Perner (2014). "A function-based screen for seeking RubisCO active clones from metagenomes: novel enzymes influencing RubisCO activity." *ISME Journal* **9**: 735-745.
- Boone, C. D., S. Gill, et al. (2013). "Carbonic Anhydrase: An Efficient Enzyme with Possible Global Implications." *International Journal of Chemical Engineering* **2013**: 6.
- Bornscheuer, U. T. and R. J. Kazlauskas (2004). "Catalytic Promiscuity in Biocatalysis: Using Old Enzymes to Form New Bonds and Follow New Pathways." *Angewandte Chemie International Edition* **43**(45): 6032-6040.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding " *Analytical Chemistry* **72**: 248-254.
- Brocker, M., S. Schaffer, et al. (2009). "Citrate Utilization by *Corynebacterium glutamicum* Is Controlled by the CitAB Two-Component System through Positive Regulation of the Citrate Transport Genes *citH* and *ctCBA*." *Journal of Bacteriology* **191**(12): 3869-3880.
- Brosius, J., A. Ullrich, et al. (1981). "Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli* ." *Plasmid* **6**: 112-118.
- Bunik, V. I., A. Tylicki, et al. (2013). "Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models." *FEBS Journal* **280**: 6412-6442.
- Carbonell, P., G. Lecointre, et al. (2011). "Origins of Specificity and Promiscuity in Metabolic Networks." *Journal of Biological Chemistry* **286**(51): 43994-44004.
- Carmona, M., M. T. Zamarro, et al. (2009). "Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**(1): 71-133.
- Carrea, G. and S. Riva (2000). "Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents." *Angewandte Chemie International Edition* **39**: 2226-2254.
- Chae, J.-C. and G. J. Zylstra (2006). "4-Chlorobenzoate Uptake in *Comamonas* sp. Strain DJ-12 is mediated by a Tripartite ATP-Independent Periplasmic Transporter." *Journal of Bacteriology* **188**(24): 8407-8412.
- Chan, K. K., B. M. Wood, et al. (2009). "Mechanism of the Orotidine 5'-Monophosphate-Decarboxylase-Catalyzed Reaction: Evidence for Substrate Destabilization." *Biochemistry* **48**: 5518-5531.
- Chang, G.-G. and L. Tong (2003). "Structure and Function of Malic Enzymes, A New Class of Oxidative Decarboxylases." *Biochemistry* **42**(44): 12721-12733.
- Chen, D., H. Tang, et al. (2013). "Structural and computational studies of the maleate isomerase from *Pseudomonas putida* S16 reveal a breathing motion wrapping the substrate inside." *Molecular Microbiology* **87**(6): 1237-1244.
- Chen, K. and F. H. Arnold (1991). "Enzyme Engineering for Nonaqueous Solvents: Random Mutagenesis to Enhance Activity of Subtilisin E in Polar Organic Media." *Biotechnology* **9**: 1073-1077.
- Chow, J., F. Kovacic, et al. (2012). "The Metagenome-Derived Enzymes LipS and LipT Increase the Diversity of Known Lipases." *PLOS one* **7**(10): e47665
- Clemente-Jiménez, J. M., S. Martínez-Rodríguez, et al. (2008). "Optically Pure α -Amino Acids Production by the "Hydantoinase Process". " *Recent Patents on Biotechnology* **2**: 35-46.
- Craig, J. W., F.-Y. Chang, et al. (2010). "Expanding Small-Molecule Functional Metagenomics through Parallel Screening of Broad-Host Range Cosmid Environmental DNA Libraries in Diverse *Proteobacteria*." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(5): 1633-1641.
- D'Ascoli, R., M. A. Rao, et al. (2006). "Impact of river overflowing on trace element contamination of volcanic soils in south Italy: Part II Soil biological and biochemical properties in relation to trace element speciation." *Environmental Pollution* **144**(1): 317-326.

- Davidson, A. L., E. Dassa, et al. (2008). "Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems." Microbiology and Molecular Biology Reviews **72**(2): 317-364.
- Di Gennaro, P., S. Ferrara, et al. (2007). "Styrene lower catabolic pathway in *Pseudomonas fluorescens* ST: identification and characterization of genes for phenylacetic acid degradation." Archives of Microbiology **188**(2): 117-125.
- Dimroth, P. (1980). "A New Sodium-Transport System Energized By The Decarboxylation Of Oxaloacetate" FEBS Letters **122**(2): 234-236.
- Dimroth, P. (1986). "Preparation, Characterization, and Reconstitution of Oxaloacetate Decarboxylase from *Klebsiella aerogenes*, a Sodium Pump." Methods in Enzymology **125**: 530-540.
- Dimroth, P. and W. Hilpert (1984). "Carboxylation of Pyruvate and Acetyl Coenzyme A by Reversal of the Na⁺ Pumps Oxaloacetate Decarboxylase and Methylmalonyl-CoA Decarboxylase." Biochemistry **23**(22): 5360-5366.
- Dimroth, P., P. Jockel, et al. (2000). "Coupling mechanism of the oxaloacetate decarboxylase Na⁺ pump." Biochimica et Biophysica Acta **1505**: 1-14.
- Dimroth, P. and B. Schink (1998). "Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria." Archives of Microbiology **170**: 69-77.
- Dokainish, H. M., B. F. Ion, et al. (2014). "Computational investigations on the catalytic mechanism of maleate isomerase: the role of the active site cysteine residues." Physical Chemistry Chemical Physics **16**(24): 12462-12474.
- Dul'tseva, N. M., S. M. Chernitsina, et al. (2012). "Isolation of Bacteria of the Genus *Variovorax* from the Thioploca Mats of Lake Baikal." Microbiology **81**(1): 72-83.
- Dumont, M. G. and J. C. Murrell (2005). "Stable isotope probing [mdash] linking microbial identity to function." Nat Rev Micro **3**(6): 499-504.
- Effenberger, F. and J. Böhme (1994). "Enzyme-catalysed enantioselective hydrolysis of racemic naproxen nitrile." Bioorganic & Medicinal Chemistry **2**(7): 715-721.
- Eliot, A. C. and J. F. Kirsch (2004). "Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations." Annual Review of Biochemistry **73**: 383-415.
- Elliott, M. and N. F. Janes (1978). "Synthetic pyrethroids – a new class of insecticide." Chemical Society Reviews **7**: 473-505.
- Feliks, M., B. M. Martins, et al. (2013). "Catalytic Mechanism of the Glycyl Radical Enzyme 4-Hydroxyphenylacetate Decarboxylase from Continuum Electrostatic and QM/MM Calculations." Journal of the American Chemical Society **135**: 14574-14585.
- Fierer, N., M. Breitbart, et al. (2007). "Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil." Applied and Environmental Microbiology **73**(21): 7059–7066.
- Fisch, F., C. M. Fleites, et al. (2010). "A Covalent Succinylcysteine-like Intermediate in the Enzyme-Catalyzed Transformation of Maleate to Fumarate by Maleate Isomerase." Journal of the American Chemical Society **132**(33): 11455-11457.
- Fischer, M., Q. Y. Zhang, et al. (2010). "Caught in a TRAP: substrate-binding proteins in secondary transport." Trends in Microbiology **18**(10): 471-478.
- Fisher, S. L. (2008). "Glutamate racemase as a target for drug discovery." Microbial Biotechnology **1**(5): 345-360.
- Foerster, K. U., C. v. Mering, et al. (2005). "Environments shape the nucleotide composition of genomes." EMBO reports **6**: 1208-1213.
- Forward, J. A., M. C. Behrendt, et al. (1997). "TRAP Transporters: a New Family of Periplasmic Solute Transport Systems Encoded by the *dctPQM* Genes of *Rhodobacter capsulatus* and by Homologs in Diverse Gram-Negative Bacteria." Journal of Bacteriology **179**(17): 5482-5493.
- Fuchs, G., M. Boll, et al. (2011). "Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four." Nature Reviews Microbiology **9**: 803-816.
- Gabor, E., K. Liebeton, et al. (2007). "Updating the metagenomics toolbox." Biochemical Journal **2**: 201-206.

- Gabor, E. M., W. B. L. Alkema, et al. (2004). "Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques." Environmental Microbiology **6**(9): 879-886.
- Gaida, S. M., N. R. Sandoval, et al. (2015). "Expression of heterologous sigma factors enables functional screening of metagenomic and heterologous genomic libraries." Nature Communications **6**: 7045-7054.
- Gallagher, T., E. E. Snell, et al. (1989). "Pyruvoyl-dependent Histidine Decarboxylase." The Journal of Biological Chemistry **264**(21): 12737-12743.
- Gans, J., M. Wolinsky, et al. (2005). "Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil." Science **309**: 1387-1390.
- Gaucher, E. A., S. Govindarajan, et al. (2008). "Palaeotemperature trend for Precambrian life inferred from resurrected proteins." Nature **451**(7179): 704-707.
- Getzoff, E. D., D. E. Cabelli, et al. (1992). "Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance." Nature **358**(6384): 347-351.
- Glueck, S. M., S. Gümüs, et al. (2010). "Biocatalytic carboxylation." Chemical Society Reviews **39**: 313-328.
- Gormann, L. A. S. and J. S. Dordick (1992). "Organic Solvents Strip Water off Enzymes." Biotechnology and Bioengineering **39**: 392-397.
- Gouy, M., S. Guindon, et al. (2010). "SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building." Molecular Biology and Evolution **27**(2): 221-224.
- Graf, R., S. Anzali, et al. (2008). "The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant." Clinics in Dermatology **26**(4): 326-333.
- Grant, D. J. W. (1967). "Kinetic Aspects of the Growth of *Klebsiella aerogenes* with Some Benzenoid Carbon Sources " Journal of General Microbiology **46**: 213-224.
- Haltia, T. and E. Freire (1995). "Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1228**(1): 1-27.
- Han, J.-I., H.-K. Choi, et al. (2011). "Complete Genome Sequence of the Metabolically Versatile Plant Growth-Promoting Endophyte *Variovorax paradoxus* S110." Journal of Bacteriology **193**(5): 1183-1190.
- Han, J.-I., H.-K. Choi, et al. (2011). "Complete Genome Sequence of the Metabolically Versatile Plant Growth-Promoting Endophyte *Variovorax paradoxus* S110 " Journal of Bacteriology **193**(5): 1183-1190.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids." Journal of Molecular Biology **166**: 557-580.
- Handa, S., J. H. Koo, et al. (1999). "Stereochemical Course of Biotin-Independent Malonate Decarboxylase Catalysis." Archives of Biochemistry and Biophysics **370**: 93-96.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, et al. (1998). "Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products." Chemistry and Biology **5**(10).
- Harrington, P. J. and E. Lodewijk (1997). "Twenty Years of Naproxen Technology." Organic Process Research & Development **1**(1): 72-76.
- Harrison, I. T., B. Lewis, et al. (1970). "Nonsteroidal antiinflammatory agents. I. 6-Substituted 2-naphthylacetic acids." Journal of Medical Chemistry **13**(2): 203-205.
- Hasson, M. S., I. Schlichting, et al. (1998). "Evolution of an enzyme active site: The structure of a new crystal form of muconate lactonizing enzyme compared with mandelate racemase and enolase." Biochemistry **95**: 10396-10401.
- Hatakeyama, K., M. Goto, et al. (2000). "Molecular Analysis of Maleate *cis-trans* Isomerase from Thermophilic Bacteria." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **64**(3): 569-576.
- Hernández-Acosta, P., D. G. Schmid, et al. (2002). "Molecular Characterization of the *Arabidopsis thaliana* Flavoprotein AtHAL3a Reveals the General Reaction Mechanism of 4'-Phosphopantothienoylcysteine Decarboxylases." The Journal of Biological Chemistry **277**(23): 20490-20498.
- Herrou, J., C. Bompard, et al. (2007). "Structure-based Mechanism of Ligand Binding for Periplasmic Solute-binding Protein of the Bug Family." Journal of Molecular Biology **373**: 954-964.

- Higgins, C. F. (2001). "ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview." Research in Microbiology **152**: 205-210.
- Hill, G. T., N. A. Mitkowski, et al. (2000). "Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities." Applied Soil Ecology **15**(1): 25-36.
- Ho, M.-C., J.-F. Ménétret, et al. (2009). "The origin of the electrostatic perturbation in acetoacetate decarboxylase." Nature **459**: 393-397.
- Horn, S. (2007). "Neuartige Phenylmalonsäure-Decarboxylasen aus Bodenbakterien." Diplomarbeit.
- Huder, J. B. and P. Dimroth (1995). "Expression of the Sodium Ion Pump Methylmalonyl-Coenzyme A-Decarboxylase from *Veillonella parvula* and of Mutated Enzyme Specimens in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **177**(13): 3623–3630.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel, et al. (1998). "Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity." Journal of Bacteriology **180**(18): 4765-4774.
- Hurley, J. H., L. A. M. Dean, et al. (1991). "Catalytic Mechanism of NADP⁺-Dependent Isocitrate Dehydrogenase: Implications from the Structures of Magnesium-Isocitrate and NADP⁺ Complexes." Biochemistry **30**: 8671-8678.
- Huvent, I., H. Belrhali, et al. (2006a). "Crystal Structure of *Bordetella pertussis* BugD Solute Receptor Unveils the Basis of Ligand Binding in a New Family of Periplasmic Binding Proteins." Journal of Molecular Biology **356**: 1014-1026.
- Huvent, I., H. Belrhali, et al. (2006b). "Structural analysis of *Bordetella pertussis* BugE solute receptor in a bound conformation." Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography **62**(11): 1375-1381.
- Hwang, C.-C., A. J. Berdis, et al. (1998). "Oxidative Decarboxylation of 6-Phosphogluconate by 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Proceeds by a Stepwise Mechanism with NADP and APADP as Oxidants." Biochemistry **37**: 12596-12602.
- Hwang, K. Y., C.-S. Cho, et al. (1999). "Structure and mechanism of glutamate racemase from *Aquifex pyrophilus*." Nature structural biology **6**(5): 422-426.
- Iding, H., T. Dünwald, et al. (2000). "Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida* as Stable Catalyst for the Synthesis of Chiral 2-Hydroxy Ketones." Chemistry A European Journal **6**(8): 1483-1495.
- Iiams, V., B. J. Desai, et al. (2011). "Mechanism of the Orotidine 5'-Monophosphate Decarboxylase-Catalyzed Reaction: Importance of Residues in the Orotate Binding Site." Biochemistry **50**(39): 8497-8507.
- Ijima, Y., K. Matoishi, et al. (2005). "Inversion of enantioselectivity of asymmetric biocatalytic decarboxylation by site-directed mutagenesis based on the reaction mechanism." Chemical Communications: 877-879.
- Ilmberger, N., S. Güllert, et al. (2014). "A Comparative Metagenome Survey of the Fecal Microbiota of a Breast- and a Plant-Fed Asian Elephant Reveals an Unexpectedly High Diversity of Glycoside Hydrolase Family Enzymes." PLOS one **9**(9): e106707.
- Ilmberger, N., D. Meske, et al. (2012). "Metagenomic cellulases highly tolerant towards the presence of ionic liquids—linking thermostability and halotolerance." Applied Microbiology and Biotechnology **95**: 135–146.
- Ilmberger, N. and W. R. Streit (2010). "Screening for Cellulase-Encoding Clones in Metagenomic Libraries." Methods in Molecular Biology **668**: 177-188.
- Im, W.-T., Q.-M. Liu, et al. (2010). "*Variovorax ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **60**: 1565–1569.
- Imaram, W., B. T. Saylor, et al. (2011). "EPR spin trapping of an oxalate-derived free radical in the oxalate decarboxylase reaction." Free Radical Biology & Medicine **50**: 1009-1015.
- Iqbal, H. A., J. W. Craig, et al. (2014). "Antibacterial enzymes from the functional screening of metagenomic libraries hosted in *Ralstonia metallidurans*." FEMS Microbiology Letters **354**(1): 19-26.

- Ismail, W., M. E.-S. Mohamed, et al. (2003). "Functional genomics by NMR spectroscopy. Phenylacetate catabolism in *Escherichia coli*." European Journal of Biochemistry **270**: 3047-3054.
- Jamshidia, S., S. Jalilib, et al. (2015). "Study of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase in complex with the top three OMP, BMP, and PMP ligands by molecular dynamics simulation." Journal of Biomolecular Structure and Dynamics **33**(2): 404-417.
- Janssen, P. H. (2006). "Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes." Applied and Environmental Microbiology **72**(3): 1719-1728.
- Janssen, P. H., P. S. Yates, et al. (2002). "Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia." Applied and Environmental Microbiology **68**(5): 2391-2396.
- Jason A. Forward, M. C. Behrendt, et al. (1997). "TRAP Transporters: a New Family of Periplasmic Solute Transport Systems Encoded by the *dctPQM* Genes of *Rhodobacter capsulatus* and by Homologs in Diverse Gram-Negative Bacteria." Journal of Bacteriology **179**(17): 5482-5493.
- Jebbar, M., L. Sohn-Bösser, et al. (2005). "Ectoine-Induced Proteins in *Sinorhizobium meliloti* Include an Ectoine ABC-Type Transporter Involved in Osmoprotection and Ectoine Catabolism." Journal of Bacteriology **187**(4): 1293-1304.
- Jensen, R. A. (1976). "Enzyme Recruitment in Evolution of New Function." Annual Review of Microbiology **30**(1): 409-425.
- Jiménez, N., J. A. Curiel, et al. (2013). "Uncovering the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Gallate Decarboxylase Involved in Tannin Degradation." Applied and Environmental Microbiology **79**(14): 4253-4263.
- Jin, L., K. K. Kim, et al. (2012). "*Variovorax defluvi* sp. nov., isolated from sewage." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **62**: 1779-1783.
- Just, V. J., M. R. Burrell, et al. (2007). "The identity of the active site of oxalate decarboxylase and the importance of the stability of active-site lid conformations." Biochemical Journal **407**: 397-406.
- Karaca, A., S. Cetin, et al. (2010). Effects of Heavy Metals on Soil Enzyme Activities. Soil Heavy Metals, Springer Berlin Heidelberg. **19**: 237-262.
- Kato, Y., J. Yamagishi, et al. (1995). "Maleate *cis-trans* Isomerase from *Arthrobacter* sp. TPU 5446." Journal of Fermentation and Bioengineering **80**(6): 610-612.
- Kazlauskas, R. J. (2005). "Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis." Current Opinion in Chemical Biology **9**(2): 195-201.
- Kelly, D. J. and G. H. Thomas (2001). "The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea." FEMS Microbiology Reviews **25**(4): 405-424.
- Kim, B.-Y., H.-Y. Weon, et al. (2006). "*Variovorax soli* sp. nov., isolated from greenhouse soil." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**: 2899-2901.
- Kim, M., K.-H. Lee, et al. (2013). "Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era." Genetics&Informatics **11**(3): 102-113.
- Kim, S. S., I.-G. Choi, et al. (1999). "Molecular cloning, expression, and characterization of a thermostable glutamate racemase from a hyperthermophilic bacterium *Aquifex pyrophilus*." Extremophiles **3**(3): 175-183.
- Kluger, R. and K. Tittmann (2008). "Thiamin Diphosphate Catalysis: Enzymic and Nonenzymic Covalent Intermediates." Chemical Reviews **108**: 1797-1833.
- Kourist, R., J.-K. Guterl, et al. (2014). "Enzymatic Decarboxylation—An Emerging Reaction for Chemicals Production from Renewable Resources." ChemCatChem **6**(3): 689-701.
- Kourist, R., P. D. d. María, et al. (2011). "Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of profens-recent trends and developments." Green Chemistry **13**: 2607-2618.
- Kourist, R., Y. Miyauchi, et al. (2011). "Engineering the Promiscuous Racemase Activity of an Arylmalonate Decarboxylase." Chemistry- A European Journal **17**: 557-563.
- Küchler-Krischun, J., C. Schell, et al. (2014). Naturbewußtsein 2013. Bevölkerungsumfrage zu Natur und biologischer Vielfalt. B. f. Naturschutz. Berlin, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit.

- Kuettner, E. B., A. Keim, et al. (2008). "Active-Site Mobility Revealed by the Crystal Structure of Arylmalonate Decarboxylase from *Bordetella bronchiseptica*." Journal of Molecular Biology **377**: 386-394.
- Kurz, M. (2008). "Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers." Saline Systems **4**: 6.
- Kusumoto, T., T. Ueda, et al. (1990). "Ferroelectric liquid crystalline compounds having a chiral center directly connected to the core aromatic ring. Synthesis of chiral 4-(1-propoxyethyl)benzenol and -benzoic acid, 4-(1-carboxyethyl)benzenol and the esters derived therefrom." Chemistry Letters **19**(4): 523-526.
- Lane, D. J., Ed. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. London: Wiley.
- Lane, D. J., B. Pace, et al. (1985). "Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses." Proceedings of the National Academy of Sciences **82**: 6955-6959.
- Law, R. J., J. N. R. Hamlin, et al. (2008). "A Functional Phenylacetic Acid Catabolic Pathway Is Required for Full Pathogenicity of *Burkholderia cenocepacia* in the *Caenorhabditis elegans* Host Model." Journal of Bacteriology **190**(21): 7209-7218.
- Layh, N., A. Stolz, et al. (1994). "Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen nitrile and naproxen amide to S-naproxen by new bacterial isolates." Journal of Bacteriology **33**(2): 175-182.
- Leadbetter, J. R. and E. P. Greenberg (2000). "Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*." Journal of Bacteriology **184**(4): 6921-6926.
- Leis, B., A. Angelov, et al. (2015). "Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermus thermophilus*." Frontiers in Microbiology **6**.
- Li, T., L. Huo, et al. (2012). "Decarboxylation mechanism in biological system." Bioorganic Chemistry **43**: 2-14.
- Liebl, W., A. Angelov, et al. (2014). "Alternative hosts for functional (meta)genome analysis." Applied Microbiology and Biotechnology **98**: 8099-8109.
- Liebl, W., A. Angelov, et al. (2014). "Alternative hosts for functional (meta)genome analysis." Applied Microbiology and Biotechnology **98**(19): 8099-8109.
- Liese, A., K. Seelbach, et al., Eds. (2006). Industrial Biotransformations, Wiley-VCH.
- Lightfield, J., N. R. F. Ram, et al. (2011). "Across Bacterial Phyla, Distantly-Related Genomes with Similar Genomic GC Content Have Similar Patterns of Amino Acid Usage." PLOS one **6**(3): e17677.
- Lind, M. E. S. and F. Himo (2014). "Theoretical Study of Reaction Mechanism and Stereoselectivity of Arylmalonate Decarboxylase." ACS Catalysis **4**: 4153-4160.
- Liu, Z.-H., Y.-M. Cao, et al. (2013). "Acrylamide biodegradation ability and plant growth promoting properties of *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969." Biodegradation **24**: 855-864.
- Luengo, J. M., J. L. García, et al. (2001). "The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications." Molecular Microbiology **39**(6): 1434-1442.
- Maimanakis, J. (2009). "Biochemische Charakterisierung einer neuartigen Phenylmalonat-Decarboxylase aus *Variovorax* sp. HH01." Diplomarbeit.
- Makarova, K. S., M. Y. Galperin, et al. (2015). "Comparative genomic analysis of evolutionarily conserved but functionally uncharacterized membrane proteins in archaea: Prediction of novel components of secretion, membrane remodeling and glycosylation systems." Biochimie: 1-11.
- Martínez-Blanco, H., A. Reglero, et al. (1990). "Purification and Biochemical Characterization of Phenylacetyl-CoA Ligase from *Pseudomonas putida*." The Journal of Biological Chemistry **265**(12): 7084-7090.
- Martins, B. M., M. Blaser, et al. (2011). "Structural Basis for a Kolbe-Type Decarboxylation Catalyzed by a Glycyl Radical Enzyme." Journal of the American Chemical Society **133**: 14666-14674.
- Matoishi, K., M. Ueda, et al. (2004). "Mechanism of asymmetric decarboxylation of α -aryl- α -methylmalonate catalyzed by arylmalonate decarboxylase originated from *Alcaligenes bronchisepticus*." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **27**: 161-168.

- McCutcheon, J. P. and N. A. Moran (2010). "Functional Convergence in Reduced Genomes of Bacterial Symbionts Spanning 200 My of Evolution." Genome Biology and Evolution **2**: 708-718.
- McMahon, M. D., C. Guan, et al. (2012). "Metagenomic Analysis of *Streptomyces lividans* Reveals Host-Dependent Functional Expression." Applied and Environmental Microbiology **78**(10): 3622-3629.
- Meyer, D., L. Walter, et al. (2011). "Conversion of Pyruvate Decarboxylase into an Enantioselective Carboligase with Biosynthetic Potential." Journal of the American Chemical Society **133**: 3609-3616.
- Miwa, H., I. Ahmed, et al. (2008). "*Variovorax boronicumulans* sp. nov., a boronaccumulating bacterium isolated from soil." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **58**: 286-289.
- Miyamoto, K. and H. Ohta (1992a). "Purification and properties of a novel arylmalonate decarboxylase from *Alcaligenes bronchisepticus* KU 1201." European Journal of Biochemistry **210**: 475-481.
- Miyamoto, K., S. Tsuchiya, et al. (1992). "Stereochemistry of enzyme-catalyzed decarboxylation of alpha-methyl-alpha-phenylmalonic acid." Journal of the American Chemical Society **114**(15): 6256-6257.
- Miyamoto, K., T. Tsutsumi, et al. (2007). "Stereochemistry of Decarboxylation of Arylmalonate Catalyzed by Mutant Enzymes." Chemistry Letters **36**(5): 656-657.
- Miyamoto, K., Y. Yatake, et al. (2008). "Screening, cloning, expression, and purification of an acidic arylmalonate decarboxylase from *Enterobacter cloacae* KU1313" Applied Microbiology and Biotechnology **78**(5): 793-799.
- Miyamoto, K., Y. Yatake, et al. (2007). "Purification and characterization of arylmalonate decarboxylase from *Achromobacter* sp. KU1311." Journal of Bioscience and Bioengineering **104**(4): 263-267.
- Miyauchi, Y., R. Kourist, et al. (2011). "Dramatically improved catalytic activity of an artificial (S)-selective arylmalonate decarboxylase by structure-guided evolution." Chemical Communications **47**.
- Miyazaki, M., H. Kakidani, et al. (1997). "Cysteine188 revealed a Being Critical for the Enzyme Activity of Arylmalonate Decarboxylase by Site-Directed Mutagenesis." Bulletin of the Chemical Society of Japan **70**: 2765-2769.
- Montecchia, M. S., M. Tosi, et al. (2015). "Pyrosequencing Reveals Changes in Soil Bacterial Communities after Conversion of Yungas Forests to Agriculture." PLOS one **10**(3): e0119426.
- Moran, N. A. (2002). "Microbial Minimalism: Genome Reduction in Bacterial Pathogens." Cell **108**: 583-586.
- Moreau, P. L. (2007). "The Lysine Decarboxylase CadA Protects *Escherichia coli* Starved of Phosphate against Fermentation Acids." Journal of Bacteriology **189**(6): 2249-2261.
- Müller, A., E. Severi, et al. (2006). "Conservation of Structure and Mechanism in Primary and Secondary Transporters Exemplified by SiaP, a Sialic Acid Binding Virulence Factor from *Haemophilus influenzae*." Journal of Biological Chemistry **281**(31): 22212-22222.
- Mulligan, C., M. Fischer, et al. (2011). "Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea." FEMS Microbiology Reviews **35**: 68-86.
- Mulligan, C., M. Fischer, et al. (2011). "Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea." FEMS Microbiology Reviews **35**: 68-86.
- Mulligan, C., A. P. Leech, et al. (2012). "The Membrane Proteins SiaQ and SiaM Form an Essential Stoichiometric Complex in the Sialic Acid Tripartite ATP-independent Periplasmic (TRAP) Transporter SiaPQM (VC1777-1779) from *Vibrio cholerae*." Journal of Biological Chemistry **287**(5): 3598-3608.
- Nakano, Y., Y. Yoshida, et al. (1995). "Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors." Gene **162**: 157-158.
- Navarro, C., L.-F. Wu, et al. (1993). "The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transporter system for Nickel." Molecular Microbiology **9**(6): 1181-1191.

- Neidhart, D. J., G. L. Kenyon, et al. (1990). "Mandelate racemase and muconate lactonizing enzyme are mechanistically distinct and structurally homologous." *Nature* **347**: 692-694.
- Nie, Y., Y.-Q. Tang, et al. (2012). "The Genome Sequence of *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1^T Reveals Its Genetic Basis for Crude Oil Degradation and Adaptation to the Saline Soil." *PLOS one* **7**(2): e31261.
- Nikaido, H. and J. A. Hall (1998). "Overview of Bacterial ABC Transporters." *Methods in Enzymology* **292**: 3-20.
- Nishida, H. (2012a). "Evolution of genome base composition and genome size in bacteria." *Frontiers in Microbiology* **3**(420): 1-3.
- Nishida, H. (2012b). "Genome DNA Sequence Variation, Evolution, and Function in Bacteria and Archaea." *Current Issues in Molecular Biology* **15**(1): 19-24.
- Obata, R. and M. Nakasako (2010). "Structural Basis for Inverting the Enantioselectivity of Arylmalonate Decarboxylase Revealed by the Structural Analysis of the Gly74Cys/Cys188Ser Mutant in the Liganded Form " *Biochemistry* **49**: 1963-1969.
- Okrasa, K., C. Levy, et al. (2008). "Structure and Mechanism of an Unusual Malonate Decarboxylase and Related Racemases." *Chemistry A European Journal* **14**: 6609 – 6613.
- Okrasa, K., C. Levy, et al. (2009). "Structure-guided Directed Evolution of Alkenyl and Arylmalonate Decarboxylases." *Angewandte Chemie International Edition* **48**: 7691-7694.
- Olivera, E. R., B. Miñambres, et al. (1998). "Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: The phenylacetyl-CoA catabolon." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(11): 6419-6424.
- Ono, H., K. Sawada, et al. (1999). "Characterization of Biosynthetic Enzymes for Ectoine as a Compatible Solute in a Moderately Halophilic Eubacterium, *Halomonas elongata*." *Journal of Bacteriology* **181**(1): 91-99.
- Ottow, J. C. G. (2011). *Mikrobiologie von Böden. Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 157
- Pace, C. N., B. A. Shirley, et al. (1996). "Forces contributing to the conformational stability of proteins." *The FASEB Journal* **10**(1): 75-83.
- Pareek, C. S., R. Smoczynski, et al. (2011). "Sequencing technologies and genome sequencing." *Journal of Applied Genetics* **52**: 413-435.
- Park, H. U. and K. J. Lee (1998). "Cloning and heterologous expression of the gene for BLIP4, a β -lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces exfoliatus* SMF19." *Microbiology* **144**: 2161-2167.
- Parrott, S., S. Jones, et al. (1987). "2-Phenylethylamine Catabolism by *Escherichia coli* K12." *Journal of General Microbiology* **133**: 347-351.
- Patel, R. N. (2004). "Biocatalytic Synthesis of Chiral Pharmaceutical Intermediats." *Food Technology and Biotechnology* **42**(4): 305-325.
- Perego, M., C. F. Higgins, et al. (1991). "The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation." *Molecular Microbiology* **5**(1): 173-185.
- Piccirilli, J. A., J. J. David Rozzell, et al. (1987). "The Stereospecificity of Oxaloacetate Decarboxylase: A Stereochemical Imperative?" *Jornal of the American Chemical Society* **109**: 8084-8085.
- Poelje, P. D. v. and E. E. Snell (1990). "Pyruvoyl-Dependent Enzymes." *Annual Review of Biochemistry* **59**: 29-59.
- Rabausch, U., J. Juergensen, et al. (2013). "Functional Screening of Metagenome and Genome Libraries for Detection of Novel Flavonoid-Modifying Enzymes." *Applied and Environmental Microbiology* **79**(15): 4551-4563.
- Rabus, R., D. L. Jack, et al. (1999). "TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters." *Microbiology* **145**: 3431-3445.
- Radzicka, A. and R. Wolfenden (1995). "A Proficient Enzyme " *Science* **267**: 90-93.
- Richard, H. and J. W. Foster (2004). "*Escherichia coli* Glutamate- and Arginine-Dependent Acid Resistance Systems Increase Internal pH and Reverse Transmembrane Potential." *Journal of Bacteriology* **186**(18): 6032-6041.

- Rocha, E. P. C. and A. Danchin (2002). "Base composition bias might result from competition for metabolic resources." Trends in Genetics **18**(6): 291-294.
- Rodríguez, H., I. Angulo, et al. (2010). "*p*-Coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: Structural insights into the active site and decarboxylation catalytic mechanism." Proteins: Structure, Function and Bioinformatics **78**(7): 1662-1676.
- Roesch, L. F. W., R. R. Fulthorpe, et al. (2007). "Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity." ISME Journal **1**: 283-290.
- Rückert-John, J., I. Bormann, et al. (2013). Umweltbewußtsein in Deutschland 2012. Ergebnisse einer repräsentativen Bevölkerungsumfrage. Umweltbundesamt. Dessau-Rößlau, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit.
- Ryu, K. and J. S. Dordick (1992). "How Do Organic Solvents Affect Peroxidase Structure and Function?" Biochemistry **31**(9): 2588-2598.
- Sambrook, J. and D. W. Russel (2001). Molecular cloning, a laboratory manual New York, USA Spring Harbor Laboratory Press
- Schipper, C., C. Hornung, et al. (2009). "Metagenome-Derived Clones Encoding Two Novel Lactonase Family Proteins Involved in Biofilm Inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*." Applied and Environmental Microbiology **75**(1): 224–233.
- Schloss, P. D. and J. Handelsman (2003). "Biotechnological prospects from metagenomics." Current Opinion in Biotechnology **14**(3): 303-310.
- Schmidt, T. M., E.F. DeLong, N.R. Pace (1991). "Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing." J. Bacteriol. **173**: 4371-4378.
- Schneider, E. and S. Hunke (1998). "ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains." FEMS Microbiology Reviews **22**: 1-20.
- Schuike, I. and G. Daum (2009). "Phosphatidylserine Decarboxylases, Key Enzymes of Lipid Metabolism." IUBMB Life **61**(2): 151-162.
- Somers, J. M. and W. W. Kay (1983). "Genetic Fine Structure of the Tricarboxylate Transport (*tct*) Locus of *Salmonella typhimurium*." Molecular Genetics and Genomics **190**: 20-26.
- Sonawane, H. R., N. S. Bellur, et al. (1992). "Recent developments in the synthesis of optically active β -arylpropanoic acids: An important class of non-steroidal anti-inflammatory agents." Tetrahedron: Asymmetry **3**(2): 163-192.
- Spain, A. M., L. R. Krumholz, et al. (2009). "Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*." ISME Journal **3**: 992-1000.
- Staley, J. T. and A. Konopka (1985). "Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats." Annual Review of Microbiology **39**: 321-346.
- Steele, H. L., K.-E. Jaeger, et al. (2009). "Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes." Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **16**: 25-37.
- Steigmiller, S., P. Turina, et al. (2008). "The thermodynamic H^+ /ATP ratios of the H^+ -ATP synthases from chloroplasts and *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(10): 3745-3750.
- Strauss, E. and T. P. Begley (2001). "Mechanistic Studies on Phosphopantothienoylcysteine Decarboxylase." Journal of the American Chemical Society **123**(26): 6449-6450.
- Strauss, E., H. Zhai, et al. (2004). "Mechanistic Studies on Phosphopantothienoylcysteine Decarboxylase: Trapping of an Enethiolate Intermediate with a Mechanism-Based Inactivating Agent." Biochemistry **43**: 15520-15533.
- Streit, W. R. and R. A. Schmitz (2004). "Metagenomics-the key to the uncultured microbes." Current Opinion in Microbiology **7**: 492-498.
- Sweet, G. D., C. M. Kay, et al. (1984). "Tricarboxylate-binding Proteins of *Salmonella typhimurium*. Purification, Crystallization, And Physical Properties" Journal of Biological Chemistry **259**(3): 1586-1592.

- Tanner, A., L. Bowater, et al. (2001). "Oxalate Decarboxylase Requires Manganese and Dioxygen for Activity: Overexpression and Characterization of *Bacillus subtilis* Yvrk and YoaN." Journal of Biological Chemistry **276**: 43627-43634.
- Tanner, M. E. (2002). "Understanding Nature's Strategies for Enzyme-Catalyzed Racemization and Epimerization." Accounts of Chemical Research **35**: 237-246.
- Tatusov, R. L., N. D. Fedorova, et al. (2003). "The COG database: an updated version includes eukaryotes." BMC Bioinformatics **4**: 41.
- Taupp, M., K. Mewis, et al. (2011). "The art and design of functional metagenomic screens." Current Opinion in Biotechnology **22**: 465-472.
- Tejada, M., J. L. Moreno, et al. (2008). "Soil amendments with organic wastes reduce the toxicity of nickel to soil enzyme activities." European Journal of Soil Biology **44**(1): 129-140.
- Terao, Y., K. Miyamoto, et al. (2006). "Improvement of the activity of arylmalonate decarboxylase by random mutagenesis." Applied Microbiology and Biotechnology **73**: 647-653.
- Terao, Y., K. Miyamoto, et al. (2006). "Introduction of single mutation changes arylmalonate decarboxylase to racemase." Chemical Communications: 3600-3602.
- Terao, Y., K. Miyamoto, et al. (2007). "The Adol Type Reaction Catalyzed by Arylmalonate Decarboxylase." Chemistry Letters **36**(3): 420-421.
- Teufel, R., V. Mascaraque, et al. (2010). "Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(32): 14390-14395.
- Thomas, S. H., R. D. Wagner, et al. (2008). "The Mosaic Genome of *Anaeromyxobacter dehalogenans* Strain 2CP-C Suggests an Aerobic Common Ancestor to the Delta-Proteobacteria." PLOS one **3**(5): e2103.
- Toney, M. D. (2005). "Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes." Archives of Biochemistry and Biophysics **433**: 279-287.
- Torsvik, V., J. Goksøyr, et al. (1990). "High Diversity in DNA of Soil Bacteria." Applied and Environmental Microbiology **56**(3): 782-787.
- Tsai, S.-W. and H.-J. Wei (1994). "Enantioselective esterification of racemic naproxen by lipases in organic solvent." Enzyme and Microbial Technology **16**(4): 328-333.
- Uchiyama, T. and K. Miyazaki (2009). "Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening." Current Opinion in Biotechnology **20**(6): 616-622.
- Unger, K. K. and E. Weber (1995). Handbuch der HPLC. Teil 1 Leitfaden für Anfänger und Praktiker. 2., Überarbeitete Auflage. Darmstadt, GIT VERLAG GMBH:38
- Versées, W., S. Spaepen, et al. (2007). "The crystal structure of phenylpyruvate decarboxylase from *Azospirillum brasilense* at 1.5 Å resolution Implications for its catalytic and regulatory mechanism." FEBS Journal **274**: 2363-2375.
- Vig, K., M. Megharaj, et al. (2003). "Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review." Advances in Environmental Research **8**(1): 121-135.
- Vollmer, W., D. Blanot, et al. (2008). "Peptidoglycan structure and architecture." FEMS Microbiology Reviews **32**: 149-167.
- Voordeckers, K., C. A. Brown, et al. (2012). "Reconstruction of Ancestral Metabolic Enzymes Reveals Molecular Mechanisms Underlying Evolutionary Innovation through Gene Duplication." PLOS Biology **10**(12): e1001446.
- Warren, S., B. Zerner, et al. (1966). "Acetoacetate Decarboxylase. Identification of Lysine at the Active Site." Biochemistry **5**(3): 817-823.
- Widenhorn, K. A., W. Boos, et al. (1988a). "Cloning and Properties of the *Salmonella typhimurium* Tricarboxylate Transport Operon in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **170**(2): 883-888.
- Widenhorn, K. A., Jacqueline M. Somers, et al. (1989). "Genetic Regulation of the Tricarboxylate Transport Operon (*tctl*) of *Salmonella typhimurium*." Journal of Bacteriology **171**(8): 4436-4441.
- Widenhorn, K. A., J. M. Somers, et al. (1988b). "Expression of the Divergent Tricarboxylate Transport Operon (*tctl*) of *Salmonella typhimurium*." Journal of Bacteriology **170**(7): 3223-3227.
- Wierenga, R. K., E. G. Kapetanious, et al. (2010). "Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst." Cellular and Molecular Life Sciences **67**(23): 3961-3982.

- Willems, A., J. Deleys, et al. (1991). "*Comamonadaceae*, a New Family Encompassing the Acidovorans rRNA Complex, Including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov. for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969)." International Journal of Systematic Bacteriology **41**(3): 445-450.
- Winnen, B., R. N. Hovorup, et al. (2003). "The tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family." Research in Microbiology **154**: 457–465.
- Wu, N., Y. Moi, et al. (2000). "Electrostatic stress in catalysis: Structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(5): 2017-2022.
- Wuensch, C., S. M. Glueck, et al. (2012). "Regioselective Enzymatic Carboxylation of Phenols and Hydroxystyrene Derivatives." Organic Letters **14**(8): 1974-1977.
- Wuensch, C., T. Pavkov-Keller, et al. (2015). "Regioselective Enzymatic β -Carboxylation of para-Hydroxy- styrene Derivatives Catalyzed by Phenolic Acid Decarboxylases." Advanced Synthesis & Catalysis **357**(8): 1909-1918.
- Wyborn, N. R., J. Alderson, et al. (2001). "Topological analysis of DctQ, the small integral membrane protein of the C4-dicarboxylate TRAP transporter of *Rhodobacter capsulatus*." FEMS Microbiology Letters **194**: 13-17.
- Yablonski, M. J., D. A. Pasek, et al. (1996). "Intrinsic Activity and Stability of Bifunctional Human UMP Synthase and Its Two Separate Catalytic Domains, Orotate Phosphoribosyltransferase and Orotidine-5'-phosphate Decarboxylase." Journal of Biological Chemistry **271**(18): 10704-10708.
- Yoon, J.-H., S.-J. Kang, et al. (2006). "*Variovorax dokdonensis* sp. nov., isolated from soil." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**: 811–814.
- Zhang, H.-J., Q.-W. Zhou, et al. (2012). "Biotransformation of the Neonicotinoid Insecticide Thiacloprid by the Bacterium *Variovorax boronicumulans* Strain J1 and Mediation of the Major Metabolic Pathway by Nitrile Hydratase." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**: 153-159.
- Zheng, W. H., Å. Våstermark, et al. (2013). "Evolutionary relationships of ATP-Binding Cassette (ABC) uptake porters." BMC Microbiology **13**: 98-117.

6 Publikationen

Eine Publikation ist in Vorbereitung.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
APS	Ammoniumpersulfat
Au	Absorptionseinheiten
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CoA	Coenzym A
CSP	Zitronensäurepuffer
DMSO	Dimethylsulfoxid
ee	Enantiomerenüberschuss
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KPP	Kaliumphosphat-Puffer
LB	Lysogeny Broth
MCS	Multiple Cloning Site
NTA	Nitrilotriessigsäure
PhAc	Phenyllessigsäure
PhM	Phenylmalonsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
SDS	Natiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

7.2 Sequenzen

Partielle Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens des Isolates 15¹(2)3

TAGAGTTTGATTATGGCTCAGAACGACGCTGGCGGCAGGCCTAACGCATGCAAGTCGAGCGAACCCCTTCGGGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGC GTGGGAACGTGCCCTTCTACGGAATAGCCCTGGGAACTGGGAGTAATACCGTATACGCCCTTGGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGGATCGGCCCGC GTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCTACCAAGCCTACGATCCATAGCTGGTTTGGAGGATGATACGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAG ACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGCAACCTGATCTAGCCATGCCCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCT TTCAGCCGGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAAT TACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACCGACGAAAGTTGGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAACCTGCCTTCAAACTATTGGTCTGGAGTTGCA GAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGAGAGGTGAAATTCGATAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATGACTGACGCTGAG GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGTCTGCGGGCAGCATGCTGTTCCGTGACACA CCTAACGATTAAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAA TTCGAAGCAACGCGCAGACCTTACCAACCTTGACATCGCAGGACAGCCCGAGAGATCGGGTCTTCTCGTAAGAGACCTGTGGACAGGTGCTGATGGCT GTCGTCAGCTCGTGTGATGATGTTCCGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCCACTCCAGTTGCCATCATTCCGTTGGGCACTCTGGAAGAACTGCC GATGATAAGTCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTACGGTTGGGTACACACGTGCTACAATGGTGGTACAGTGGGTTAATCC CAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAACAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG GGCTTGTACACACCGCCCTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACCCGACGCGCTGCGCTAACCCAGCAATGGGGGCGAGCGGACCAGGTAGGATCAGCG ACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGA

Partielle Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens des Isolates 2²(1)

TCGGTTACCTTGTACGACTTACCCAGTCACGAACCTGCCGTGGTAATCGCCCTCCTTGGGTTAAGCTAACTACTTCTGGCAGAACCCGCTCCCATGGT GTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCGGGAACGTATTACCGTGACATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGC GATCCGGACTACGACTGGTTTTATGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCCTTTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGC CATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCACTGAATGTAGCAACTAATGACAAGGTTGCGCTCG TTGCGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTACGGTTCTCTTTCGAGCACTAAGCCATCTCTGGCGAATTC CGTACATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTCAACCTT GCGGCCGTACTCCCGAGCGGTCAACTTACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGTCAGTGAAGACCCAACAACAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCA GGGTATCTAATCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACAGGTCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCGATATCTACGCATT TCACTGCTACACGCGGAATTCATCCCCCTTACCGTACTTAGCTATGCAAGTCACAGATGCAAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACAACTGTCTTAC ATAACCGCTGCGCACGCTTTACGCCCCAGTAATTCGATTAAACGCTTGACCCCTACGTTATACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTAGCCGGTGCTTATTCTTA CGGTACCGTCATTAGCCTTCTGTATTAGAAAAGACCGTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCTGCACGCGCATGGCTGGAT CAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAAATTCCTCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCAGTGTGGTGGTCTGCTCTCAGACCAGCTA CAGATCGAAGGCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTACCTAATCTGCCATCGGCCGCTCCATTCCGCGCAAGGTCTTGCATCCCTGCTTTCATCCGTAGAT CGTATGCGGTATTAGCAGACTTTCGCTGCGTTATCCCCACGATTGGGCACGTTCCGATGTATTACTACCCGTTCCGCACTCGCCGCCAGGATTGCTCCC GCGCTGCCGTTGCACTGTGATAAGGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGAATCAAACCTA

Partielle Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens des Isolates 2²(4)

TAGAGTTTGATTCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGGAGCAATCTGGCGGCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCAATCGTGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCAGGGGATCGCA AGACCTTGCGCGAATGGAGCGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGCCTTCGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCA AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCA GGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTCTTTGTACGGAACGAAACGGTCTTTTCTAATACAGAAGGCTAATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCT AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGTTGTGA AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGTGACTGCATAGCTAGAGTACGGTAGAGGGGGATGGAATTCGCGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATAT GCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC ACGCCCTAACGATGTCAACTGGTTGTT

Partielle Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens des Isolates 14²(4)

TTAGAGTTTGATTCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGGAGCAATCTGGCGGCGAGTGGCGAAC GGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCAATCGTGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCAGGGGATCGC AAGACCTTGCGCGAATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGCCTTCGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG CAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTCTTTGTACGGAACGAAACGGTCTTTTCTAATACAGAAGGCTAATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGTTGTG AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGTGACTGCATAGCTAGAGTACGGTAGAGGGGGATGGAATTCGCGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAT ATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT CCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGTCTTCACTGACTCAGTAACGAAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT GAAACTCAAGGAATTGACGGGACCCGACAGCGGTGGATGATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGGAAACCTTACCCACCTTTGACATGTACGGAAT TCGCCAGAGATGGCTTAGTGCTGAAAGAGAACCCTAACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG AGCGCAACCTTGTCTAGTTGCTACATTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATG GCCCTTAGGTGGGGTACACACGTACATAATGGCTGGTACAAAGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCATAAAACAGTCGTAGTCCGGA TCGCAGTCTG

Partielle Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens des Isolates 14²(3)

TCGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCACGAACCTGCCGTGGTAATCGCCCTCCTTGC GGTTAAGCTAACTACTTCTGGCAGAACCCGCTCCCATGGT
 GTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTACCGTGACATTTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGC
 GATCCGGACTACGACTGGTTTTATGGGATTAGTCCCTCGCGGGTTGGCAACCCCTTTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGC
 CATGAGGACTTGACGTCATCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCACTGAATGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCG
 TTGCGGGGACTTAACCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTGTTACGGTTCTCTTCGAGCACTAAGCCATCTCTGCGCAATTC
 CGTACATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCATTTCTTTGAGTTTCAACCTT
 GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGTCAGTGAAGACCCAACAACCAAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCA
 GGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACAGGTCACAGGGGATTGCCCTCGCCATCGGTGTTCCCTCCGCATATCTACGCATT
 TCACTGCTACACGCGGAATTCATCCCCCTTACCGTACTCTAGCTATGCAGTCACAGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACAAGTGTCTTAC
 ATAACCGCCTGCGCAGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGCTAGTTAGCCGGTGTCTATTCTTA
 CGGTACCGTCATTAGCCTTCTGTATTAGAAAAGACCGTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCTGACGCGGCATGGCTGGAT
 CAGGCTTTCGCCATTGTCCAAATTCCTCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCTGGTCTCTCAGACCAGCTA
 CAGATCGAAGGCTTGGTAGCCTTTACCTCACCAACTACCTAATCTGCCATCGGCCGCTCCATTTCGCGCAAGGCTTTCGATCCCCGCTTTCATCCGTAGAT
 CGTATGCGGTATTAGCACAGCTTTCGCTGCGTTATCCCCACGATTGGGCACGTTCCGATGTATTACTACCCGTTTCGCCACTCGCCGCCAGGATTGTCCC
 GCGCTGCCGTTGACTGTGATGTAAGGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAACCTA

Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens des Isolates 15²(1)1 (IMG-Daten)

CTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGGAGCAATCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATAC
 ATCGGAACGTGCCAATCGTGGGGGATAACGACGAGGAAAGCTGTGCTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCGCG
 AATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGCCTTCGATCTGATGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGA
 CTGAGACACGCCCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAAGGATGAAGGCCT
 TCGGGTTGTAACCTGCTTTGTACGGAACGAAACGGCTCTTTCTAATAAAGAGAGCTAATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTAATGTAAGACAGTTGTGAAATCCCCGGGCTC
 AACCTGGGAACCTGCTGCTGACTGCAATTGCTGGAGTACGGCAGAGGGGATGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACAC
 CGATGGCGAAGGCAATCCCTGGGCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGA
 TGTCAACTGGTTGTTGGGTCTTCACTGACTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT
 TGACGGGGACCCGACAAGCGGTGGATGATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTACGGAATTCGCCAGAGATGGC
 TTAGTGCTCGAAAGAGAACCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCAGTCTGTGCTGTAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTG
 ATTAGTTGCTACATTGAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGTTGACAAACCGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCTCATGGCCCTTATAGGTGGG
 GCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAACAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT
 CGACTGCGTGAAGTCGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCG
 GGTTCGCCAGAAGTAGTTAG

partielle	Nukleotidsequenz	des	16S	rRNA-Gens	des	Isolates	15 ² (1)2
	TAGAGTTTGATTCTGGCTCAGATTGAACGCTAGCGGAATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGAATTCGGTCTGGTGCGAGTGGCGAACGG						
	GTGAGTAATGCATCGGAACGTGCCAGTAGCGGGGGATAACTACGCGAAAGCGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGGGGGGATCGTA						
	AGACCTCTCACTATTGGAGCGGCCGATGTGCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGTTTGAGAGGACGACCA						
	GCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGCCATTCCGCGTGTG						
	CGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGGCGGGAAGAAATCGGTGCGGATAATACCCTGATCGGATGACGGTACCCGAGAATAAGCACGGGCT						
	AACCTAGCTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTCGGAAAGAAAGATGTGA						
	AATCCAGGGCTCAACCTTGAAGTGCATTTTAACTACCGGGCTAGAGTGTGTAGAGGGAGGTGGAATTCGCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATAT						
	GCGGAGGAACACCGATGGCGAAAGCAGCCTCTGGGATAACACTGACGCTCAGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA						
	CGCCCTAAACGATGCACTAGCTGTTGGT						

Nukleotidsequenz des PCR-Screening-Produktes von 2²(4)

TGCACCTCGCTGAGCTTCTTTCGTGGGCTCGCCTTACCCCGCAGCTGAAGCGCGAGATGGAACAGGCCACGGGCTGCCCTGCACGACGATGAGCGACG
 CCATCTGGCGGGCTGCGCCACCTGAAGGTGCGGCGGTGGCCGTGCGCACCGCTACATCGACGAGGTCAACACGCGAGCTGCGCACCTACCTCGAACA
 GAGCGACTTCGAACGCTCGCGCTCGAAGGCTGGCCATCTCCGACGTGACAGGCCGTGGGCCAGGTGTGACCGAGGTGCTGGTGCACCTGTGCTCGAA
 GGTGTTGCAAGACAGCCCGCGCCGATGGCTCCTCATCTCGTGGGA

Nukleotidsequenz des PCR-Screening-Produktes von 14²(3)

GAGATGAGGAGGCGCTGCGCGCCGGGCTGGTCTTCAACACCTTCAGGCACAGGTCGACCAGCACCTCGGTGACACCTGGCCACGGCTGCACGTG
 GAGATGCCAGGCTTCGAGCGCCAGCGGTTCAAGTCGCTCTGTTGAGGTAGGTGCGCAGCTGCGTGTGACCTCGTCGATGTAGGCGGTGGCGACG
 GCCACGCGCTGCACCTTCAGGTGGCGCAGGCCCGCAGGATGGCGTCTGCTCATGCTGTCAGGGCAGGCCCGTGGCTGTTCCATCTCGCGCTTACGT
 GGCGGGTGAAGGCGACGCCGGAAGAGCTCAGCGAGGTGCCAT

Nukleotidsequenz des PCR-Screening-Produktes von 14²(4)

TCCGACGAGATGAGGAGGCGCTGCGCGCCGGGCTGGTCTTCAACACCTTCAGGCACAGGTCGACCAGCACCTCGGTGACACCTGGCCACGGCCTGC
 ACGTCGGAGATGGCCAGGCTTCGAGCGCCAGCGGTTCAAGTCGCTCTGTTGAGGTAGGTGCGCAGCTGCGTGTGACCTCGTCGATGTAGGCGGTG
 GCGACGGCCACGCGCTGCACCTTCAGGTGGCGCAGGCCCGCAGGATGGCGTCTGCTCATGCTGTCAGGGCAGGCCCGTGGCTGTTCCATCTCGCGCTTACGT
 TCAGCTGGCGGGTGAAGGCGACGCCGGAAGAGCTCAGCGAGGTGCA

Nukleotidsequenz des PCR-Screening-Produktes von 15²(1)1

TTGCACCTCGCTGAGCTTCTTTCGCGGCGCCGACCTCAACCGCGAGCTCGAAGCCGAAATGACACGCGCCACCGGCTTGCCCTGCACCACTGAGCAACG
 CCATCGTCGGCGTGTGCGGCACCTCGGCGTACGCGCGTGGCGGTGGCCACCGCGTACATCGACGAAGTCAACGTGCACCTGCGCAAGTACCTGGAGC
 AGAGCGGCTTCGAGCCTTTCGCGTCAAGGCTTTCCATCTCCGACGTGAAGGCCGTGGCGAAGTGCCGACGAGGTGCTGTGTCACCTGTGATGAA
 AGTGTTCGATGCCAGGCGCGCCGACGGCATCTCATCTGCTGCA

Nukleotidsequenz des PCR-Screening-Produktes von 15²(1)2

TGCACCTCGCTGAGCTTCTATCGCGGCGCATCCGCCAATGCCGACTTCTGTCGCGCAGATGCGCGAGGCGACCGGGCTGCCCTGCACCACCATGAGCGCGG
CGATCATCCGCGCCTTGCGCAGCGTGGGCGGCAAGCGCGTCCGCTGGCCACGGGTACGTGACGCGGTCAACCGGACGCTCGAGGCCATATCTGCGCG
AGGAGGCATCGACGTACCGTCTGCCAGGGCTGGGTGTGACCGATGTGACAGGCCATGACAGGCCGTGCGCCCGCAGACGCTGGTGGATCTCTGCCGTA
CCGTCCACGCGCAGGCGCCGACAGTGATGCCATCTGCTGCTTGGCGCA

Aminosäuresequenz des PCR-Screening-Produktes von 15²(1)2

GKLGTTAAADALRIGSRIRDTLSFYRGASANADLLAQMREATGLPCTTMSAAIIRALRSVGGKRVAVATGYVDVNRLEAYLREEAIDVTVCOGLGVTDVQA
MQAVGPQLVLDLCLRTVHAQAPDSDAILLSCG

Nukleotidsequenz der Fosmidklone (Bereich um *amd*) des Isolates 14²(3) (Primerwalking)

CGATCGATCCGCTGACCAGCTTCAAGCCCGTGGCCGGCGCCTTCGTGTCGCCGCTGATGATCGTCGCGGGCAACGACTTCTCTGCGAAGACACCCGCCGAA
CTCGTCAAGAACTCAAGGCGCACCCGGGCGGCTACTCTACGCGTCTGCGGGCTGGGACCGTGCAGCACCTGGGTTTCGAGATGCTCAAGCAATCCA
CCGGTGCCTTCGTGGTGATGTGCTTACCGCGCGCGCGCGCAGATCGTGCCGACGTCTGCGCGGCCAGGTGCCGTGGGCGTGGTGAGCGCCACGG
CTGCCATGGCGCAGTCGAAGGCCGCGCAAGCTGCGCGCGTGGCGTGTGAACAACGCCAAGCTCGAGGGCGCGGAAGGCGTGGCGCCGCTGGCCGAG
GCGCTGCCGGGCTTCGAGTGGCGCCGCGCATCTTCTGCTCGACCGCGGGCACGCCAACGACGTCGTCGACAAGCTCTCGGCCCGCTGAAGACCG
TGCTCGACATGCCCGAGACGGGACGCGCCGCGCGCAAGGACGCTGCGCGCCTACGCCACGCGCGCCAGCTGGGCAAGGACATGGCGGAGGAA
ACGACGCGATGGAAACGCATCATCACGGACACGCGCATCGTGGCGGAGGGGAACTGAGGTGACACAGCAGCCCCATCTCGGCCCTATCGTTCCGCCCGC
AGCCGGCGCGTGGCGTGCAGCGCCCGCTGCTCTACGGCGACGCGATCCGCTTACGCGCAAGGGCTGGGCTGGGCGAAATCTCCACGCGCGGCTAC
ACCGAGGTGATCGACTCGGTCTATCGGCAAGGCGCTGGAACCTCAAGGCGGAGGGCGCCAGTCCGCTCTCCCTCATGGGCACCTCGCTGAGCTTCTTCGCG
GCGTGCCTTACCCGCCAGCTGAAGCGCGAGATGGAACAGGCCACGGGCTGCCCTGCACGACGATGAGCGACGCCATCTCGCGGGCTGCGCCACCT
GAAGGTGACGCGCGTGGCCGTGCGCCACGCGCTACATCGACGAGGTCAACACGACGTCGCGACCTACCTCGAACAGAGCGACTTCGAACCGCTGGCGCTC
GAAGGCTGGCCATCTCCGACGTGCAGGCCGTGGGCCAGGTGTGACCGAGGTGCTGGTGCACCTGTGCTGAAGGTGTTGAAGACCGCCGCGCGC
GACGGCTCTCATCTCTCGCGCGGCTCTGTCAGCTCGATGCGGTGCGCGAGGTGAGGCGCGCTGCGGGTGCCCGTG GTGTCCAGTTGCGCCGCGG
GCTTCTGGGACCTCTGTCGCGCACCGCGGGCTCGATGCGCGCTGCGCGGGGACGGGACTGTGTTGCGCTGAACACGCTCAGCCGAGCCAGCGCCACG
CGGGCGTGGCGCCAGTGCCAGACGCGCTCGCACAGCGCTTCTGCTGCGCGCTGCGCGCTTCCGCGTAGTGCGCCAGGCGCTGCATCTTGTCCTC
GATCTCGCGCGGCTCAGGCTGTGCGGGGTCGCCCTTGGGCTGTCGACGCGCGCGGCCAATGTGCGGCCGTGCGCGGTGTGACGCTGACCTTGCGG
ATCCAGCGCGCGGGTAGGCGGTGTGACCTCGTCTCCAGCGCCATCGTACCTTCTCGCGGAAGGCCGAGACCTCGGGCGAGAGAAAGTTCGCGGTG
AACTCGCCAGGCCGCGCGGCGCGTGCACCGCGATGAGGCCAGCACCGTGCCCATGGAGAAGTTGCCCTGGTGCACCGTGGCGGGCACCGTCAACGCG
CCCAGACGTGATGGCGCCCTGGTGACGTGGGTGCTGACCTGGGACACGTCTGAGGCTTGAAGTGGGTTCTGTTCC

Aminosäuresequenz AMD *Bordetella bronchiseptica* KU1201

MQQASTPTIGMIVPPAAGLVPADGARLYPDLPIASGLGLSVTPEGYDAVIESVVDHARRLQKQGAADVSLMGTSLSFYRGAAFNAALTVAMREATGLPCTTM
STAVLNGLRALGVRRVALATAYIDVNERLAFLAESLVP TGCRLSITGVEAMARVDTATLVLCVRAFEAAPDSGILLSCGGLLTDAIPEVERRLGVVVSS
PAGFWDAVRLAGGGAARPGYGRLFDES

Aminosäuresequenz AMD *Variovorax* sp. HH01

MTKPHLGLIVPPAAGAVPVDGPLYGERIRFSAGLGLGEISTRGYTEVIDSVQKALALKDEGVSAVSLMGTSLSFFRGADFNRELEAEMTRATGLPCTTMSNAI
GALRHLGVRRVAVATAYIDEVNVHLRKYLEQSGFEPLALEGLSISDVQAVGEVPTQVLVDLCMKVFDQAQAGADGILISCGGLVTLDAVREVEDRLRVPVVSSPAG
FWDLVRTAGLDARSPGHRLFA

Aminosäuresequenz AMD *Variovorax* sp. HH02

VTQPHLGLIVPPAAGAVPVDGPLYGDRIRFSAGLGLGEISTRGYTEVIDSVIGKALELKAEGASAVSLMGTSLSFFRGVAFTRQLKREMEQATGLPCTTMSDAI
LAGLRHLKVRRVAVATAYIDEVNTQLRTYLEQSDFEPLALEGLAISDVQAVGQVSTEVLVDLCLKVFEDQPGADGLISCGGLVTLDAVREVEARLRVPVVSSPAG
FWDLVRTAGLDARSPGQGLLFA

Aminosäuresequenz AMD *Variovorax paradoxus* S110

MARPHLGLIVPPAAGAVPVDGPLYGERIRFSARGLGLGEISTRGYTEVIDSVVDKALELKAEGASAVSLMGTSLSFFRGVAFTRQLKREMEQATDLPCTTMSDAI
AGLHHLKVRRVAVATAYIDEVNTQLRTYLEQSDFEPLALEGLAISDVQAVGQVPTQVLVDLCLKVFEDQPGADGLISCGGLVTLDAVREVEARLRVPVVSSPAG
FWDLVRTAGLDARSPGQGLLFA

Aminosäuresequenz AMD *Variovorax paradoxus* B4

MALPHLGLIVPPAAGAVPVDGPLYGERIRFSALGLGLGEISTRGYTEVIDSVVEKAVALKAQGACAVSLMGTSLSFFRGAAFNRLQLEVEMARATGLPCTTMSNAI
VGALRQLGVRRVAVATAYIDEVNAHLRRLYRSDFEPLALQGLAISDVQAVGRVPTQVLVDLCLRVFDAQPGAEGILISCGGLVTLDAVREVEARLRVPVVSSPA
GFWDLVRTAGLDARSPGQGLLFAEA

Aminosäuresequenz AMD *Variovorax paradoxus* 110B

MAQPHLGLIVPPAAGAVPVDGPLYGERIRFSARGLGLGEISTRGYLDVIDSVVEKAVALKKEGVSAISLMGTSLSFRRGAFFNRQLEVEMAHATGLPCTTMSNAI
IVNGLRHLKVRRVAVATAYIDEVNEQLRGYLEQSDFEPLALEGLSISDVQAVGKVPTQALVDLCLKVFDAQPGAEGILISCGGLVTLDAVREVEARLRVPVVSSPA
GFWDLVRTAGLDARSPGQGLFAWTAPA

Aminosäuresequenz AMD *Variovorax paradoxus* 4MFCol3.1

MARPHLGLIVPPAAGAVPVDGPLYGERIRFSARGLGLGEISTRGYTEVIDSVVDKALELKAEGASAVSLMGTSLSFFRGVAFTRQLKREMEQATDLPCTTMSDAI
AGLHHLKVRRVAVATAYIDEVNTQLRTYLEQSGFEPLALEGLAISDVQAVGQVPTQALVDLCLKVFDAQPGAEGILISCGGLVTLDAVREVEARLRVPVVSSPAG
FWDLVRTAGLDARSPGQGLLFA

Aminosäuresequenz AMD *Chelativorans* sp. BNC1

MSAEDPVIGLIVPPAAGLVPPAAMVPEVTFHASGLGLKEMTPCGYAGVIDLVGDHAERHAQAGAQAVALMGTSLSFFRGAAFNALITHMSNRSGLPATTM
SQAVVDELKSHGARRIAVVTAYRQDVNNLAAFLNEHGIEARSLKSLGITSADVAGTPAKRLLQLCKEAVHDAGPVDVAVLISCGGLHTLDVIVDVEISTGLPVVTS
ATAGVRGAVGLLKRSATAEATSKFLTGRA

Aminosäuresequenz AMD *Enterobacter cloacae* KU1313

MQQTSTPVIQMIVPPAAGLVPADGARLYPGLPFIAASGLGLSVTPPEGYDAVIESVVDHARRLKEQGAADVSLMGTSLSFYRGAAFNALTEAMRESTGLPCTTMS
TAVLKGLRALGVRRVALATAYIDDVNERLAAFLAEGLVPAGCRSLGITVDAMARVDTDTLVDLCVRAFEAAPDSGILLSCGGLLTDAIPEVERRLGMPPVSSS
PAGFWDAVRLAGCEVQAAPGYGRLSGVH

Aminosäuresequenz AMD *Alcaligenes faecalis phenolicus* DSM 16503

MTTDSNGAQRPVGLIVPPAAGLVPPEGPEMYPEIDFIAQGLALSSVDKEGYDQVIDQVVDAAQKLAARGAQAVSLMGTSLSFYRGSDFNELVARLRESTGLPC
STMSHAILRGLRVSGIERVAVASSYIDDVNQRLVRFLAQNQIQAQVAYGLGVNDVTAMSQISTQELVDLCLKTWDAIQKQAPGQAQGLLLSCGGLVSLAVRQV
EDKLGVTVVSSSPAGFWDLVATAGLDLFPQGMGRLAQTRQTA

Aminosäuresequenz AMD *Alcaligenes faecalis faecalis* NCIB 8687

MTTDSNGAQRPVGLIVPPAAGLVPPEGPEMYPEIDFIAQGLALSSVDKEGYDQVIDQVVDAAQKLAARGAQAVSLMGTSLSFYRGSDFNELVARLRESTGLPC
STMSHAILRGLRVSGIERVAVASSYIDDVNQRLVRFLAQNQIQAQVAYGLGVNDVTAMSQISTQELVDLCLKTWDAIQKQAPGQAQGLLLSCGGLVSLAVRQV
EDKLGVTVVSSSPAGFWDLVATAGLDLFPQGMGRLAQTRQTA

Aminosäuresequenz AMD *Achromobacter* sp. HH01

MSLHSLAPASDGRPVIGLIVPPAHGQVPPDGSVLFPHVRFIARGMGLTSVTPGGYDEVIDSVVRHAVALKEDGAQAVSLMGTSLSFYRGASANADLLAQMREAT
GLPCTTMSAAIIRALRSVGGKRVAVATGYVDVAVNRTLEAYLREEAIDVTVCCQLGVTDVQAMQAVGPQTLVDLCRTVHAQAPDSDAILSCGGLITMDVVPQVE
AELGVPVVAASPAGFWDVVSLAGHARPATGRGTLLTLA

Aminosäuresequenz AMD *Achromobacter* KU1311

MQQSSTPTIGMIVPPAAGLVPADGARLYPDLPFIAASGLGLSVTPQGYDAVIESVVDHARRLREQGAADVSLMGTSLSFYRGAAFNALTEAMREATGLPCTTMS
STAVLNGLRALGVQRVALATAYIDDVNERLAAFLAEGLVPAGCRSLGITGVEAMGRVDTDTLVDLCVRAFEAAPDSGILLSCGGLLTDAIPEVERRLGMPPVSSS
SPAGFWDAVRLAGGGGKARPGYGRLFDES

Aminosäuresequenz AMD *Pseudomonas azotifigens* DSM 17556

MSQTPNRPTVGLIVPPAAGEVPPPEPVALYGAEVNFIAAGLGLRLKLPDGYDEVIDRMGELSRELAGNADAIVLMGTSLSFYRGPEFNARLIEVMSQASGLPATT
MSCAVIEALNAVGARIALATAYVDSVNQRLADFLAASGLCVESLATLDIESVEAIAHVTQDQLLELGRRALTAAGPVDALFMSCGGLRTQEVSLQLEAEFGLPVIS
SAMAGAWAAVRLVGHSGESPGSGRLFAAGPAPDAR

Aminosäuresequenz AMD *Nitratireductor pacificus* pht-3B

MRPLPTIGMIVPPAAGDVPEPELELYGGRARFIAEGLALKALSPGYDAVIERVEALAVSLRERGAEAIISLMGTSLSFYRGAAFNALDIAGMKAATGLPATTMTDSV
IEALEALGARLAVATAYSDPVNDRLTDYLERAGFEVAALRALDIEDVDTIATVTTEALIDLGEAGKAAPGADALFISCGGLRTPVTGPVVERRSGMPVSSSALAGA
WGAMGLLGLDRHAQAGARLFDALSPDGRMG

Aminosäuresequenz AMD *Amorphus coralli* DSM 19760

MSEETPTIGMIVPPAAGEVPPPEAPAVYPPELFLAHGLGLADMAPDDYARVTDVFGDAAAGLAARGADVVGIMGTSLSFFRGADFNDALAALVAERSGRPSST
MSSAIIRALRAVSARRLAVLTAYEDDVNRLLQAYLEGHGFSIASLQALKIRAVSEVAGVGTQELVHEGRRAIEAAAGADALLISCGGLQLTDCVRQLEAKGSPPVVT
SATAGVWDLARLAGAHTPRPGFGRLEIA

Aminosäuresequenz AMD *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1

MTSRPGDGRPLVGLIVPPATGLVPPEPPALYGDALRFAARGLALATMTRDGYDDVIDRVEAAARALAAEGAAVALMGTSLSFYRGAAFNALVERMASATGLP
VTTMSCAVVEALRAVGARRLAVATAYDEVNDRLTAFLLHHGFVLGLDSLQISAVGDVLAIGDDDLIGLGTAFVAAPEADALLVSCGGLQLTSVTLPLEDRGLV
PVISSAVAGAWAAARLIGHGEAPGYGRLLLETAPKSELE

Aminosäuresequenz AMD *Aminobacter* sp. J41

MTHRTIGMIVPPANGVPPPEAPAIYPEGIRFLTRGLAIDSVSIGSFDKVIDRVVQLGKELRDEGAEEAVSLMGTSLSFFRGVAFNDELTRALHEATGLPATTMSNGIR
DALRAVGATKVAVGTAYTDDLNEKLRTYLTDSGFKVLSLESLSQSAVPEIHAVTLDTIVSLGEKTFESSGRRADAVLISCGGLRATHLAPALEAKVGVPVIAATAGL
WSTVRLGGINTRLDAGALGRVA

Aminosäuresequenz AMD *Aminobacter* sp. J44

MTHRTIGMIVPPANGVPPPEAPAIYPEGIRFLTRGLAIDSVSIGSFDKVIDRVVQLGKELRDEGAEEAVSLMGTSLSFFRGVAFNDELTRALHEATGLPATTMSNGIR
DALRAVGATKVAVGTAYTDDLNEKLRTYLTDSGFKVLSLESLSQSAVPEIHAVTLDTIVSLGEKTFESSGRRADAVLISCGGLRATHLAPALEAKVGVPVIAATAGL
WSTVRLGGINTRLDAGALGRVA

Aminosäuresequenz AMD *Aminobacter* sp. J15

MTHRTIGMIVPPANGVPPPEAPAIYPEGIRFLTRGLAIDSVSIGSFDKVIDRVVQLGKELRDEGAEEAVSLMGTSLSFFRGVAFNDELTRALHEATGLPATTMSNGIR
DALRAVGATKVAVGTAYTDDLNEKLRTYLTDSGFKVLSLESLSQSAVPEIHAVTLDTIVSLGEKTFESSGRRADAVLISCGGLRATHLAPALEAKVGVPVIAATAGL
WSTVRLGGINTRLDAGALGRVA

Aminosäuresequenz AMD *Mesorhizobium* sp. J18

MSQLPTIGMIVPPADGAVPPEPPALYGRARFLACGLALERLSAEGYDAVIGHVADLARTLKTRGARAVSLMGTSLSFYRGPEFNALAIETMEEATGLPASTMTSA
VIDALNIVGARLAVATAYRDDVNRRLASYLEWAGFEILSRALDIADVEAIQAVSSDDLVLWLGREAFEAAPSADALFISCGGLRTPVTPMLEACGVPVVISSAM
AGAWGAMRLAGLDPRASGFRLEFELPKHYRT

Aminosäuresequenz AMD 2 *Nitratireductor pacificus* pht-3B

MSMIEEPVSGREGVSGAVTTPIGLLVPPADGAVPADAADVVPGLSFRAHGLGLREMTPEGYDSVLEEVGHGARLLAGQGVSVVALMGTSLSFYRGSLFNSLELERE
IERRSGLPGLTMTAIIAACRAVAGARRLAVATAYQGVVNERLLAFLAQNGMEVVSALAALDILSIEAVHKVPDDEVTLGREAFARAERPDAIISCGGLSTRPAVRAL
EETGVPVITSLAGLWAAVARAGHDPRVASEGKLFQQHFPVT

Aminosäuresequenz AMD *Cucumibacter marinus* DSM 18995

MQDFNKNTTVQGPSEVPDADPQRPIGLIVPPAQGLVPPDANIVYPGVNFVARGLGLEMSLKGYDTVIGKVGDAEALAADGAIAISLMGTSLSFYRGDEFNERL
LEEIETRSALPATTMSSSITLACHTMGARHIAVATAYDEVVSARLCSFLKASGLEVVSVANLGIVSIDEVHSVAEADVLNIGRDAVRNAGDADAL
LISCGGLSTRAAEVLEGETDLPVVTSPLAGLWGVVAKAGRDPRVEGHGRLFRRSPKA

Aminosäuresequenz AMD *Pseudoacidovorax intermedius* NH-1

MTDSATPVLGLIVPPAAGEVPPEGPALYAGRVRFMARGLALAGIHPEGFDEVEGRIVDLSRELKAAGAQAQVSLMGTSLSFYRGAAFTEDLRARMAAATGLPCTT
MSHAIVRSRLRQLGVRVAVATAYIDTLNDRLAAYLEGEFEVTAIRGLSMTGVEAVGQVEAETLAQLARSVSVEGQPDGLLISCGGLRTLHLPRLERELGLPVTSS
SPAGFWDLMRTAGLDAASPGHGRLFDA

8 Versicherung an Eides statt

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 14.07.2015