

Der biologische Abbau von hydroxylierten Alkylethern

Dissertation

Von der Fakultät Bau- und Umweltingenieurwissenschaften der Universität Stuttgart

zur Erlangung der Würde einer Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)

genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Dipl.-Ing. Christine Woiski

aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Karl-Heinrich Engesser

Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Hauer

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2018

Universität Stuttgart

Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft

Abteilung Biologische Abluftreinigung

2018

Für die Wissenschaft. Und Susi.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten fanden am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Abteilung Biologische Abluftreinigung der Universität Stuttgart statt. Die Versuche zur Proteinanalyse und Sauerstoffzehrung wurden an der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe von Dr. David Schleheck durchgeführt.

Die Arbeiten wurden selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Mittel durchgeführt.

Vorwort

Es ist geschafft, die Dissertation ist geschrieben!

Mein Forscherdrang wurde während meiner Diplomarbeit geweckt, bei der ich bereits bakterielle Abbaewege untersuchen durfte. Begeistert von Mikrobiologie, Molekularbiologie, Genetik, nur Randbereiche während des Studiums der Umweltschutztechnik, folgte als logische Konsequenz die Promotion auf diesem Gebiet, ohne vorher auch nur zu erahnen, wie viel Wissen und welche Fähigkeiten man sich in dieser Zeit aneignet. Nun ist es vollbracht und es ist an der Zeit, denjenigen zu danken, die ihren Anteil hierbei hatten.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Karl-Heinrich Engesser. Er hat mit die Möglichkeit gegeben, diesen großen Schritt in meiner akademischen Ausbildung zu gehen, stand mir stets mit Rat zur Seite und hat mich nicht zuletzt mit Vertrauen und Zuversicht maßgeblich unterstützt.

Danken möchte ich der Landesgraduiertenförderung. Durch ihr Stipendium blieb mir die ein oder andere substantielle Sorge erspart.

Im Besonderen bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen Steffen Helbich, Martina Kiel, Daniel Dobslaw, Diego Salamanca, Thomas Gerl, Jen Lin Leong und Niko Strunk. Ohne den fachlichen Austausch mit ihnen und das gegenseitige Helfen bei mancherlei Versuchen, die kritische Betrachtung und Beurteilung der erzielten Ergebnisse und das ausgesprochen gute Arbeitsklima wäre mir das Verfassen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein herzlicher Dank geht an Andrea Matzig für die große Unterstützung und Hilfe bei sämtlichen organisatorischen Fragen, die die Arbeit als Doktorandin und auch als wissenschaftliche Mitarbeiterin mit sich bringen.

Eine große Inspiration war mir der Aufenthalt an der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe von Dr. David Schleheck, an der ich neben für mich bis dahin noch unbekanntem Arbeitstechniken auch wunderbare Menschen kennenlernen durfte. Mein Dank gilt hier neben David Schleheck vor allem Ann-Katrin Felux, die mir bei der Durchführung der Versuche zur Seite stand, sowie Michael Weiss und Manuel Serif. Sie alle bereiteten mir eine großartige Zeit.

Herrn Professor Bernhard Hauer möchte ich dafür danken, dass er als Mitberichter dieser Arbeit fungiert. Er und Mitarbeiter seines Instituts, vor allem Björn Mückschel, Jonas Klebensberger und Andreas Hunold, konnten mir während meiner Arbeit entweder durch fachlichen Rat oder durch das Überlassen von Bakterienstämmen oder Plasmiden oder auch beidem in so mancher Situation weiterhelfen.

Ähnliche Unterstützung erfuhr ich durch Dr. Joseph Altenbuchner, dem ich danke für seine Empfehlungen und Hilfestellungen und insbesondere für das Plasmid pCro2a, das eine entscheidende Rolle in dieser Arbeit gespielt hat.

Nicht zuletzt gebührt mein Dank all jenen Menschen, die mich privat zu jeder Zeit unterstützt, aufgemuntert, motiviert, abgelenkt, sich mit mir geärgert und mit mir gefreut haben. Monika und Karl Woiski, Andreas und Sabrina Woiski, Dragana Rabrenovic, Nicole Kratz, Claudia Schröter, Marleen Denneler, Barbara Morell, Katrin Wißmann, Willi Helbich, Thomas Keierleber, Philipp Beyer, Linda Vetten, Lucie Schremmer, Sabine Wagner, Claudia Thomas, Vanessa und Filippo Azzarone, Jennifer und Romain Amiot, Alina Thomas, Dorothea Holl und Ursula Hess – sie alle haben ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	10
Geräteverzeichnis	13
Zusammenfassung	15
Abstract	17
1 Einleitung	19
2 Grundlagen	21
2.1 2-Butoxyethanol	21
2.1.1 Eigenschaften	21
2.1.2 Produktion	21
2.2 Stand der Forschung	22
2.2.1 Aerober Abbau von Polyethylenglycol (PEG)	22
2.2.2 Anaerober Abbau von Polyethylenglycol	27
2.2.3 Aerober Abbau von Polypropylenglycol (PPG)	29
2.2.4 Abbau von Alkylphenolpolyethoxylaten	31
3 Material und Methoden	33
3.1 Chemikalien	33
3.2 Medien, Lösungen und Puffer	33
3.3 GC-MS-Analyse	35
3.4 Isolierung Butoxyethanol abbauender Reinstämme	36
3.5 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	37
3.6 Untersuchungen der klassischen Mikrobiologie	37
3.7 Bestimmung der optischen Dichte (OD)	38
3.8 OD ₅₄₆ -KBE-Verhältnis	38
3.9 Salztoleranz	38
3.10 Antibiotikaresistenz	39
3.11 Wachstumskurven und Induktionstests	39
3.12 Butoxyethanol-Sensitivitätstest	39
3.13 Metabolitdetektion	39
3.14 Sauerstoffelektrode	40
3.15 NAD-Umsatz im Rohextrakt	41
3.16 Substratpattern	41
3.17 DNA-Isolierung	41
3.18 Bestimmung von DNA-Konzentrationen	42
3.19 PCR	42
3.20 Agarose-Gelelektrophorese	44

3.21	Elektroporation	45
3.21.1	Elektroporation <i>E. coli</i>	45
3.21.2	Elektroporation <i>Pseudomonas</i> sp.	46
3.22	Colony-PCR	46
3.23	Genom-Sequenzierungen	46
3.23.1	Genom-Sequenzierung von <i>P. putida</i> BOE100	46
3.23.2	Genom-Sequenzierung von <i>P. vancouverensis</i> BOE200	47
3.24	Proteinanalyse	47
3.24.1	Separieren der löslichen von der Membranfraktion und Proteinfällung	47
3.24.2	Beladen der IPG-Strips und isoelektrische Fokussierung (IEF)	48
3.24.3	Herstellung der Proteingele für die 2D-PAGE	49
3.24.4	Equilibrierung der IPG-Strips und Start der 2D-Gelelektrophorese	49
3.24.5	Gradientengel für die Membranfraktion	50
3.24.6	Färben und Entfärben der Gele	51
3.25	Transposonmutagenese	51
3.26	Identifizierung der inaktivierten Gene	52
3.26.1	Restriktion, Selbstligation und Klonierung	52
3.26.2	Inverse PCR	54
3.27	Genexpressionsanalyse BOE200	54
3.28	Überexpression in <i>P. putida</i> KT2440	55
3.28.1	Die Konstruktion der Expressionsplasmide	55
3.28.2	Überexpression der Gene <i>egeA</i> bzw. <i>egeABC</i>	57
4	Ergebnisse	59
4.1	Butoxyethanol abbauende Reinstämme	59
4.2	Untersuchungen der klassischen Mikrobiologie	61
4.3	OD ₅₄₆ -KBE-Verhältnis	64
4.4	Salztoleranz	65
4.5	Antibiotikaresistenz	66
4.6	Wachstumskurven und Induktionstests	67
4.6.1	Wachstum von BOE3	67
4.6.2	Wachstum von BOE100	68
4.6.3	Induktionstest BOE100	69
4.6.4	Wachstum von BOE200	70
4.6.5	Wachstum der BOE-Stämme	71
4.7	Butoxyethanol-Sensitivitätstest	72
4.8	Metabolitdetektion	74
4.9	Sauerstoffelektrode	76
4.10	NAD-Umsatz im Rohextrakt	77

4.11	Substratpattern.....	79
4.12	Genom-Sequenzierungen	80
4.12.1	Genom-Sequenz von <i>P. putida</i> BOE100	80
4.12.2	Genom-Sequenz von <i>P. vancouverensis</i> BOE200	80
4.13	Proteinanalyse	83
4.14	Transposonmutagenese BOE100	89
4.15	Transposonmutagenese BOE3	92
4.16	Genexpressionsanalyse BOE200.....	95
4.17	Die Etherspaltungsenzyme EgeA, EgeB und EgeC.....	101
4.17.1	EgeA	101
4.17.2	EgeB	108
4.17.3	EgeC.....	109
4.18	<i>Ege</i> -Gene in den BOE-Stämmen	111
4.19	Überexpression in <i>P. putida</i> KT2440	112
4.19.1	Die Expressionsplasmide pCom10.egeA(P) und pCom10.egeABC(P).....	112
4.19.2	Überexpression der Gene <i>egeA</i> bzw. <i>egeA</i> , <i>egeB</i> und <i>egeC</i>	113
4.20	Der Abbauweg von Butoxyethanol	115
5	Diskussion.....	117
5.1	Butoxyethanol-Abbauer	117
5.1.1	Substratverwertung der BOE-Stämme	118
5.1.2	Wachstum mit Butoxyethanol.....	119
5.1.3	Antibiotikaresistenzen	120
5.2	Die einzelnen Schritte des Abbaus von 2-Butoxyethanol.....	121
5.2.1	Die Oxidation der Hydroxylgruppe.....	121
5.2.2	Die Spaltung des Ethers.....	125
5.2.3	Der weitere Abbau der Spaltungsprodukte	128
5.2.4	Kompakt: Der Abbauweg von 2-Butoxyethanol	129
5.3	Ausblick.....	130
6	Literaturverzeichnis	131
7	Anhang	153
7.1	16S rRNA-Gensequenzen.....	153
7.2	OD-Werte.....	158
7.3	Nukleotidsequenz BOE3	164
7.4	Nukleotidsequenzen der Gene <i>egeA</i> , <i>egeB</i> und <i>egeC</i>	168
7.5	Aminosäuresequenzen von EgeA, EgeB und EgeC	169
7.6	Aminosäuresequenz von SCS7.....	169
7.7	Lebenslauf	170

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Abbau von PEG über PEG-Carboxylat.....	26
Abbildung 2.2 Abbau von PEG nach Pearce & Heydeman, 1980	26
Abbildung 2.3 Abbau von PEG nach Thélu et al., 1980	27
Abbildung 2.4 Anaerober Abbau von PEG nach Schramm & Schink (1991).....	29
Abbildung 2.5 Anaerober Abbau von 2-Phenoxyethanol nach Speranza et al. (2003)	29
Abbildung 2.6 Abbau von Polypropylenglycol nach Hu et al. (2008)	30
Abbildung 3.1 Plasmidkarten der Expressionsplasmide.....	56
Abbildung 4.1 Gelbild BOX-PCR-Fingerprinting.....	59
Abbildung 4.2 Phylogenetischer Baum	61
Abbildung 4.3 BOE-Stämme.....	63
Abbildung 4.4 Zellmorphologie BOE-Stämme	64
Abbildung 4.5 Salztoleranz BOE-Stämme	65
Abbildung 4.6 Wachstumskurven BOE3.....	67
Abbildung 4.7 Wachstumskurven BOE100.....	68
Abbildung 4.8 Induktionstest BOE100	69
Abbildung 4.9 Wachstumskurven BOE200	71
Abbildung 4.10 Wachstumskurven BOE-Stämme.....	72
Abbildung 4.11 BET-Sensitivitätstest.....	73
Abbildung 4.12 GC-Chromatogramm BOE100 mit BET und Chloramphenicol	75
Abbildung 4.13 GC-Chromatogramm BOE100 mit BET und Chlorethoxyethanol	75
Abbildung 4.14 Enzymaktivität BOE100	78
Abbildung 4.15 2D-Proteingele BOE100	83
Abbildung 4.16 Gradientengel der Membranfraktion.....	84
Abbildung 4.17 Ausschnitt Glyoxylat- und Dicarboxylat-Metabolismus (KEGG).....	87
Abbildung 4.18 Butanoat-Metabolismus (KEGG).....	88
Abbildung 4.19 Screening von knock-out Mutanten.....	89
Abbildung 4.20 Gencluster der an der Oxidation von BET beteiligten Enzyme	91
Abbildung 4.21 Wachstum von BOE100, P13 F44 und P22 F29 mit C5–C8-Alkoholen.....	92
Abbildung 4.22 Sequenzierter DNA-Bereich in BOE3.....	94
Abbildung 4.23 Genexpression BOE200	95
Abbildung 4.24 Sequenz-Alignment EgeA aus BOE3 und BOE200.....	100
Abbildung 4.25 Sequenz-Alignment EgeB aus BOE3 und BOE200.....	100
Abbildung 4.26 Sequenz-Alignment EgeC aus BOE3 und BOE200.....	100
Abbildung 4.27 Gencluster <i>egeABC</i> in BOE200	101
Abbildung 4.28 Die von SCS7 katalysierte Reaktion von IPC-B zu IPC-C	105
Abbildung 4.29 Strukturmodelle für EgeA.....	106
Abbildung 4.30 Multiple sequence alignment SCS7, EgeA(B3) und EgeA(P)	107

Abbildung 4.31 Strukturmodelle für EgeB.....	109
Abbildung 4.32 Strukturmodelle für Ege(C)	111
Abbildung 4.33 Agarosegel ege-PCR.....	112
Abbildung 4.34 Agarosegelbilder Expressionsplasmid	113
Abbildung 4.35 Wachstumskurven Überexpression.....	114
Abbildung 4.36 Der Abbauweg von 2-Butoxyethanol.....	115

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Verwendung von Butoxyethanol in der EU (Stand 1997)	20
Tabelle 2-1 Eigenschaften von Butoxyethanol	21
Tabelle 3-1 Verwendete Bakterienstämme	37
Tabelle 3-2 Verwendete Plasmide	37
Tabelle 3-3 PCR-Standardansätze	43
Tabelle 3-4 Standard-PCR-Programme	43
Tabelle 3-5 PCR-Primer	44
Tabelle 3-6 Ege-PCR	44
Tabelle 3-7 IEF-Programm DAVID RAPID	49
Tabelle 3-8 Acrylamidgel 12 %ig für 2 2D-Gele	49
Tabelle 3-9 Gelzusammensetzung Gradientengel	50
Tabelle 3-10 Restriktionsansatz	52
Tabelle 3-11 Ligationsansatz Selbstligation	53
Tabelle 3-12 Sequenzierungsprimer	53
Tabelle 3-13 iPCR-Primer BOE3	54
Tabelle 4-1 BOE-Stämme	60
Tabelle 4-2 Koloniemorphologie BOE-Stämme	62
Tabelle 4-3 Ergebnisse Schnelltests	62
Tabelle 4-4 Antibiotika-Resistenztest	66
Tabelle 4-5 Wachstumsparameter BOE3	68
Tabelle 4-6 Wachstumsparameter BOE100	68
Tabelle 4-7 Wachstumsparameter Induktionstest BOE100	70
Tabelle 4-8 Wachstumsparameter BOE200	71
Tabelle 4-9 Wachstumsparameter BOE-Stämme	72
Tabelle 4-10 Atmungsraten von BOE100	77
Tabelle 4-11 Substratpattern BOE-Stämme	79
Tabelle 4-12 Statistiken Genom BOE100	81
Tabelle 4-13 Statistiken Genom BOE200	82
Tabelle 4-14 Ergebnisse des Peptidmassenfingerprints der BOE100-Gene	86
Tabelle 4-15 Knock-out Mutanten BOE100	89
Tabelle 4-16 Substratpattern der knock-out Mutanten von BOE100	90
Tabelle 4-17 Substratpattern BOE3-Mutanten	93
Tabelle 4-18 Tn5-Insertionsstellen der BOE3-knock-out Mutanten	93
Tabelle 4-19 Annotierung BOE3	94
Tabelle 4-20 Ergebnisse Genexpressionsanalyse BOE200	95
Tabelle 4-21 blastp-Ergebnisse EgeA(B3) aus BOE3	102
Tabelle 4-22 blastp-Ergebnisse EgeA(P) aus BOE200	102

Tabelle 4-23 HHpred-Analyse von EgeA, EgeB und EgeC.....	103
Tabelle 4-24 blastp-Ergebnisse EgeB(B3) aus BOE3.....	108
Tabelle 4-25 blastp-Ergebnisse EgeB(P) aus BOE200.....	108
Tabelle 4-26 blastp-Ergebnisse EgeC(B3) aus BOE3.....	110
Tabelle 4-27 blastp-Ergebnisse EgeC(P) aus BOE200.....	110
Tabelle 7-1 OD ₅₄₆ -Werte Salztoleranz	158
Tabelle 7-2 OD ₅₄₆ -Werte Wachstumskurven BOE3	159
Tabelle 7-3 OD ₅₄₆ -Werte Wachstumskurven BOE100	160
Tabelle 7-4 OD ₅₄₆ -Werte BOE100-Induktionstest	160
Tabelle 7-5 OD ₅₄₆ -Werte Wachstumskurven BOE200	161
Tabelle 7-6 OD ₅₄₆ -Werte Wachstumskurven der BOE-Stämme.....	162
Tabelle 7-7 OD ₅₄₆ -Werte BET-Sensitivitätstest	163
Tabelle 7-8 OD ₅₄₆ -Werte Wachstum BOE100, P13 F44 und P22 F29 mit Alkoholen	164
Tabelle 7-9 OD ₅₄₆ -Werte Überexpressionsversuch.....	164

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure(n)
Ac	Acetat
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALR	Abteilung Biologische Abluftreinigung
Amp	Ampicillin
APnEO	Alkylphenolpolyethoxylat
APS	Ammoniumpersulfat
BES	Butoxyessigsäure
BET	Butoxyethanol
BGA	Butylglycolacetat
B ⁱ	Butoxyethanol-induziert
BOH	<i>n</i> -Butanol
bp	Basenpaar(e)
BSB	Biochemischer Sauerstoffbedarf
Cm	Chloramphenicol
DCM	Dichlormethan
DCPK	Dicyclopropylketon
DEG	Diethylenglycol
DGA	Diglycolsäure/diglycolic acid
DH	Dehydrogenase
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure/deoxyribonucleic acid
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EG	Ethylenglycol
EPA	United States Environmental Protection Agency
FC	Fold Change
FDR	False Discovery Rate
GC	Gaschromatograph
GC-MS	Gaschromatograph mit Massenspektrometer
G ⁱ	Glucose-induziert
Glc	Glucose
GST	Glutathion-S-transferase
GMC	Glucose-Methanol-Cholin
<i>H.</i>	<i>Hydrogenophaga</i>
HPVC	High Production Volume Chemicals
IEF	Isoelektrische Fokussierung
iPCR	Inverse PCR
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ISWA	Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft
KBE	Koloniebildende Einheit
kbp	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
LB	Lysogeny Broth

LFKW	Lehr- und Forschungsklärwerk
M	Molare Masse
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MCS	multiple cloning site/Polylinker
MM	Minimalmedium
mRNA	Boten-RNA/messenger RNA
MS	Massenspektrometer
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MW	Molekulargewicht
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NB	Nutrient Broth
NPnEO	Nonylphenolpolyethoxylat
nt	Nukleotid(e)
OD _n	Optische Dichte bei der Wellenlänge n
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OPnEO	Octylphenolpolyethoxylat
ori	Replikationsursprung/origin of replication
ORF	Offener Leserahmen/open reading frame
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAG	Polyalkylenglycol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCDH	PEG-Carboxylatdehydrogenase
PCR	Polymerasekettenreaktion/polymerase chain reaction
PCR-H ₂ O	Steriles Reinstwasser, verwendet v. a. für PCR
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptidmassenfingerprint
PMS	Phenazinmethosulfat
PPG	Polypropylenglycol
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
RNA	Ribonukleinsäure/ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute/rounds per minute
<i>S.</i>	<i>Sphingopyxis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat/sodium dodecyl sulfate
skt	Sektoren
TEG	Triethylenglycol
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TetEG	Tetraethylenglycol
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time of Flight Mass Spectrometry
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
rRNA	Ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA

VK	Vorkultur
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Geräteverzeichnis

Autoklaven	Webeco GmbH, Selmsdorf
Cleanbenches	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
DNA-Messküvette	TrayCell, Hellma Analytics, Müllheim
Elektroporationsgerät	MicroPulser, Bio-Rad Laboratories, USA
French Press	SLM Aminco, USA
Gaschromatograph	7890A GC, 7683B Injektor, Agilent Technologies, Inc., USA
Homogenisierer	BeadBug Homogenzier, Benchmark Scientific, USA
Inkubationsschränke	Heratherm Incubator, Thermo Scientific, USA
Magnetrührer	Heidolph MR 2000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Massenspektrometer	5975C VL MSD, Agilent Technologies, Inc., USA
Mikroskop	Zeiss KF 2, 45 07 11 mit Zeiss Okular 46 40 26 01, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskopkamera	TCA-3.0C Mikroskopkamera, Tuscon, China
Photometer	Ultrospec III, Pharmacia LKB Biotechnology, Schweden Spectronic Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA
pH-Sonde	SenTix 41, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim i. OB
Protein-Gelkammer	PROTEAN II xi Cell, Bio-Rad Laboratories, USA
Protein-IEF-Kammer	PROTEANTM IEF Cell, Bio-Rad Laboratories, USA
Reinstwasseranlage	PURELAB Ultra, ELGA LabWater, UK
Sauerstoffelektrode	ConOx, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim i. OB
Schüttler	Multitron, Infors GmbH, Einsbach
Thermocycler	MyCycler, Bio-Rad Laboratories, USA
Zentrifugen	Himac CT15E, VWR International, USA Mikro 200 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen Rotanta 460 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen Rotixa 50 RS, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen Megafuge 1.0 R, Heraeus GmbH, Hanau Sigma 6K10, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Vortexer	IKA MS 1 Minishaker, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau
Waagen	BP 2100 S, Sartorius AG, Göttingen BA 310 P, Sartorius AG, Göttingen
Wärmebad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach

Zusammenfassung

Es wurden 11 Bakterienstämme isoliert, die 2-Butoxyethanol (BET) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Anhand ihrer 16S rRNA-Gensequenzen wurden die Isolate identifiziert als *Pseudomonas knackmussii* BOE1, *Pseudomonas putida* BOE2, *Hydrogenophaga pseudoflava* BOE3, *Pseudomonas umsongensis* BOE4, *Gordonia terrae* BOE5, *Pseudomonas extremaustralis* BOE6, *Pseudomonas plecoglossicida* BOE7, *Pseudomonas* sp. BOE10, *Pseudomonas putida* BOE100, *Pseudomonas vancouverensis* BOE200 und *Cupriavidus oxalaticus* BOE300.

Alle weiteren Untersuchungen fokussierten sich auf die Stämme BOE3, BOE100 und BOE200. Die Wachstumsparameter wurden bestimmt und die höchsten Wachstumsraten betrugen $0,204 \text{ h}^{-1}$ für BOE3 bei 4 mM BET, $0,645 \text{ h}^{-1}$ für BOE100 bei 5 mM BET und $0,395 \text{ h}^{-1}$ für BOE200 bei 6 mM BET. Die zugehörigen Verdopplungszeiten lagen bei 204 min (BOE3), 64 min (BOE100) und 105 min (BOE200). BOE3 wuchs nicht in LB-Medium. BOE100 war der einzige Stamm, der Salzkonzentrationen bis zu 3,5 % tolerieren konnte, was in etwa der Salzkonzentration der Meere entspricht.

Butoxyethanol wird initial zu Butoxyethanal und weiter zu Butoxyessigsäure oxidiert. Im Stamm BOE100 erfolgt die erste Reaktion durch die PQQ- und Cytochrom c_{550} -abhängige Alkoholdehydrogenase PedE. Tn5-Mutanten, in denen Gene des Genclusters der Alkoholdehydrogenase PedE, aber auch Gene zur Synthese von PQQ bzw. Cytochrom c_{550} inaktiviert waren, wuchsen nicht mehr mit BET. Diese Gene sind demnach essentiell für die Oxidation von BET zum Aldehyd in BOE100, auch wenn Butoxyethanol nicht das einzige Substrat ist, sondern andere Alkohole wie z. B. *n*-Hexanol und *n*-Octanol ebenfalls von demselben Enzym oxidiert werden.

Erst nach der Oxidation von Butoxyethanol zu Butoxyessigsäure erfolgt die Spaltung des Ethers. Das Etherspaltungsenzym wurde im Stamm BOE3 durch Transposonmutagenese-Versuche identifiziert. Es handelt sich um die bisher nicht beschriebene membranständige Fettsäure-alpha-Hydroxylase EgeA (Ege: „Ethylenglycolether“). In den Stämmen BOE100 und BOE200 wurde dieses Enzym ebenfalls detektiert. *EgeA* wurde in BOE200 beim Wachstum mit Butoxyethanol hochreguliert, was durch eine Genexpressionsanalyse gezeigt werden konnte. Die Aminosäuresequenzen von EgeA von BOE3 und BOE200 stimmen zu 71 % überein, die von BOE100 und BOE200 sind identisch.

Überexpressions-Versuche haben gezeigt, dass EgeA für eine vollständige Funktionalität die beiden Hilfsproteine EgeB und EgeC benötigt. Das Membranprotein EgeB ist verwandt mit der Proteintranslocaseuntereinheit SecE aus *E. coli* K12, das lösliche Protein EgeC mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein Ubl4a aus *Homo sapiens*, das für die Biogenese endständig-verankerter Proteine vonnöten ist. Da EgeA ein Membranprotein ist, wird vermutet, dass

EgeB und EgeC für den Transport und die Lokalisierung von EgeA in die Membran benötigt werden.

Die Gesamtgenome von BOE100 und von BOE200 wurden sequenziert und die Gene *egeB* und *egeC* auch auf dem Chromosom von BOE100 identifiziert. In den meisten *Pseudomonas*-Stämmen unter den isolierten Butoxyethanol-Abbauern, nämlich BOE1, BOE2, BOE4, BOE6 und BOE10, wurden diese Gene sowie *egeA* mittels PCR ebenfalls nachgewiesen, was ein Hinweis darauf ist, dass in diesen Stämmen die Spaltung des Ethers ebenfalls nach Oxidation der Alkohol- zur Säuregruppe durch die Fettsäure-alpha-Hydroxylase EgeA erfolgt.

Abstract

Eleven bacterial strains capable of using 2-butoxyethanol (BET) as sole source of carbon and energy were isolated. On the basis of their 16S rRNA gene sequences, the strains were identified as *Pseudomonas knackmussii* BOE1, *Pseudomonas putida* BOE2, *Hydrogenophaga pseudoflava* BOE3, *Pseudomonas umsongensis* BOE4, *Gordonia terrae* BOE5, *Pseudomonas extremaustralis* BOE6, *Pseudomonas plecoglossicida* BOE7, *Pseudomonas* sp. BOE10, *Pseudomonas putida* BOE100, *Pseudomonas vancouverensis* BOE200, and *Cupriavidus oxalaticus* BOE300.

All further analyses focused on the strains BOE3, BOE100, and BOE200. The growth parameters were determined and the highest growth rates achieved were 0.204 h⁻¹ for BOE3 at 4 mM BET, 0.64 h⁻¹ for BOE100 at 5 mM BET, and 0.395 h⁻¹ for BOE200 at 6 mM BET. The corresponding doubling times were 204 min (BOE3), 64 min (BOE100), and 105 min (BOE200), respectively. BOE3 did not grow in LB medium. BOE100 was the only strain that tolerated salt concentrations of up to 3.5 % in MM, which is equal to the salinity of seawater.

Initially, butoxyethanol is oxidized to butoxyethanal and further to butoxyacetic acid. In strain BOE100, the first reaction is catalyzed by the PQQ- and cytochrome c₅₅₀-dependent alcohol dehydrogenase PedE. Genes belonging to the *ped* gene cluster or necessary for the formation of PQQ or cytochrome c₅₅₀ were knocked-out in Tn5-mutants unable to grow on butoxyethanol. Therefore, these genes are essential for the oxidation of BET in strain BOE100. However, the oxidation of the hydroxyl group is not restricted to BET, since other alcohols such as *n*-hexanol and *n*-octanol are dehydrogenated by the same enzyme.

The ether cleavage takes place after the conversion of butoxyethanol to butoxyacetic acid. The responsible enzyme was identified by transposon mutagenesis experiments in strain BOE3 as the membrane protein fatty acid alpha hydroxylase EgeA (Ege: ethylene glycol ether) which has not been described so far. This enzyme was detected in strains BOE100 and BOE200, as well. *EgeA* was up regulated in strain BOE200 growing on butoxyethanol as shown by the results of a differential gene expression analysis. The amino acid sequences of EgeA from BOE3 and BOE200 share 71 % identities, EgeA from BOE100 and BOE200 are identical.

Overexpression experiments revealed that two additional proteins, EgeB and EgeC, are required for full functionality of EgeA. The membrane protein EgeB is related to the protein translocase subunit SecE in *E. coli* K12, and the soluble protein EgeC to the ubiquitin-like protein Ubl4A in *Homo sapiens*, a protein needed for tail-anchored trans-membrane protein biogenesis. As EgeA is located in the membrane, the presumption is that EgeB and EgeC are required for the transport and localization of EgeA into the membrane.

The genomes of BOE100 and BOE200 were sequenced and the genes *egeB* and *egeC* were found on the chromosome of BOE100, as well. These genes and *egeA* were also detected by PCR in most of the other *Pseudomonas* strains among the BOE-strains, namely BOE1, BOE2, BOE4, BOE6, and BOE10, indicating that the ether bond is cleaved by the fatty acid alpha hydroxylase EgeA within these strains, as well.

1 Einleitung

Am 20. April 2010 gab es die bis heute größte Ölkatastrophe in der Geschichte der Menschheit. Im Golf von Mexiko explodierte die Ölförderplattform Deepwater Horizon und es traten bis zum 16. Juli 2010 insgesamt etwa 780 Mio. Liter Öl aus dem Bohrloch aus (EPA, 2011; Atlas & Hazen, 2011). Als Folge trieben Ölteppiche an der Meeresoberfläche und führten zu erheblichen Schäden an Küsten und Stränden und deren Flora und Fauna. Zur Minderung der Ölverschmutzung setzte BP die Öldispersierungsmittel Corexit EC9500A und EC9527A ein. Dispersierungsmittel sorgen dafür, dass sich das Öl in kleine Tröpfchen verteilt und absinkt bzw. erst gar nicht an die Oberfläche gelangt.

Während der gesamten Dauer dieses Unglückes wurden rund 7 Mio. Liter Corexit eingesetzt, davon etwa 2,9 Mio. Liter Corexit EC9500 in der Tiefsee direkt am Austrittsloch. (BP Gulf Science Data, 2014a; BP Gulf Science Data, 2014b; Kleindienst et al., 2015). An der Oberfläche wurden ca. 3,2 Mio. Liter Corexit EC9500 und 813 000 Liter Corexit EC9527A versprüht. Der Hauptbestandteil von Corexit EC9527A ist mit 30–60 % 2-Butoxyethanol (BET) (Nalco, 2011; Kover et al., 2014). Es gelangten folglich mindestens 243 900 Liter BET innerhalb kürzester Zeit in die Umwelt.

Butoxyethanol ist ein Glycolether, der aufgrund der hohen Produktionsmengen von etwa 161 kt/a in der EU (2003) und 45–227 kt/a in den USA (2002) zu den „High Production Volume Chemicals“ (HPVC) zählt (European Chemicals Bureau, 2006; OECD, 2004). Diese Verbindung kommt natürlicherweise nicht vor und ist folglich ausschließlich anthropogenen Ursprungs.

BET wird vor allem als Lösungsmittel in Oberflächenbeschichtungen, Farben und Lacken verwendet, aber auch in Schmiermitteln, Ölen und Farbstoffen. Es ist Bestandteil in Detergenzien und Reinigungsmitteln, in Druckfarben, Hydrofracking-Flüssigkeiten, Textilien, Haarfärbemitteln, Agrarchemikalien, Herbiziden, Löschaum und, wie bereits erwähnt, in Öldispersierungsmitteln (OECD, 1997; U.S. EPA, 2010; Committee on Energy and Commerce U.S. House of Representatives, 2011; OECD, 2004). Es dient außerdem als Ausgangschemikalie zur Herstellung anderer Chemikalien, beispielsweise Butylglycolacetat (BGA) und diverse Weichmacher (OECD, 1997; OECD, 2004). Tabelle 1-1 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Anwendungen in der EU im Jahr 1997.

Als Folge der mannigfachen Verwendung gelangt Butoxyethanol in die Umwelt, in der es in etwa folgendermaßen verteilt ist: Wasser: 84,2 %; Luft: 11,4 %; Boden: 4,19 %; Sediment: 0,132 % (OECD, 2004). Die Halbwertszeiten betragen für Boden 7 Tage bis 4 Wochen, für Luft 3,3 bis 33 Stunden, für Oberflächengewässer 7 Tage bis 4 Wochen und für Grundwasser 14 Tage bis 8 Wochen (Howard, 1991). Die hohe Wasserlöslichkeit, der relativ niedrige

Einleitung

Dampfdruck und das geringe Boden-Adsorptionspotential sind Gründe dafür, dass es überwiegend im Wasser zu finden ist. Dort gilt es als leicht biologisch abbaubar (OECD, 1997). Der OECD Ready Biodegradability Test zeigte eine Abbaurrate von mehr als 77 % nach 3 Tagen und 100 % nach 7 Tagen, ein BSB-Abbautest (Biochemischer Sauerstoffbedarf) über einen Zeitraum von 20 Tagen ergab eine Abbaurrate von 75 % und bei einem OECD 28-day closed bottle test wurden 88 % BET abgebaut (OECD, 1997).

Tabelle 1-1 Verwendung von Butoxyethanol in der EU (Stand 1997)

Produkttyp	Menge in t/a	prozentualer Anteil
Oberflächenbeschichtungen	70000	77,8 %
Detergenzien und Reinigungsmittel	4000	4,4 %
Druckfarben	5000	5,5 %
Rohstoff für die BGA-Produktion	11000	12,2 %
Gesamt	90000	

Diese Angaben wurden berechnet (OECD, 1997)

Obwohl leicht biologisch abbaubar, ist weder über den Abbauweg dieser Chemikalie noch über die Bakterienstämme, die Butoxyethanol abbauen können, viel bekannt. Diese Arbeit soll Aufschluss darüber geben, welche Bakterien für den Abbau von Butoxyethanol in der Umwelt verantwortlich sind und mit welchen Enzymen die Reaktionen katalysiert werden. Dabei liegt der Fokus klar auf der Spaltung des Ethers.

Hierfür wurden zunächst Bakterien isoliert, die Butoxyethanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten können. Diese Bakterienstämme wurden charakterisiert hinsichtlich Morphologie, Substratspektrum, Wachstumsgeschwindigkeiten, Salztoleranz und Antibiotikaresistenzen.

Zur Aufklärung des Abbauwegs von Butoxyethanol wurden Wachstumstests mit strukturanalogen und translationshemmenden Stoffen durchgeführt. Sie gaben erste Hinweise zu möglichen Metaboliten des BET-Abbaus. Abbauenzyme sollten durch Transposonmutagenese-Versuche identifiziert werden. Hierbei wurden knock-out Mutanten erzeugt, die nicht mehr in der Lage waren, Butoxyethanol abzubauen. Die inaktivierten Gene wurden durch Klonierung der DNA-Abschnitte, in die das Transposon inseriert ist, oder durch inverse PCR ermittelt. Zusätzlich wurden unterschiedliche Genexpressionsmuster zwischen Butoxyethanol-induzierten und Butoxyethanol-nicht-induzierten Zellen analysiert, um herauszufinden, welche Gene für den Abbau von Butoxyethanol benötigt werden. Die Funktionalität der identifizierten Abbaugene wurde abschließend mittels Überexpression-Versuche verifiziert.

2 Grundlagen

2.1 2-Butoxyethanol

Synonyme: 1-Butoxy-2-hydroxyethan; 1-Hydroxy-2-*n*-butoxyethan; 2-Butoxy-1-ethanol; beta-Butoxyethanol; BG; BGE; Butyl Cellosolve; Butylglycol; Butylglycoether; Butyl Oxitol Glycol; Dowanol EB; Eastman EB Solvent; EB; EGBE; Ethylenglycolbutylether; Ethylenglycol-*n*-butylether; Ethylenglycolmonobutylether; Glycol Ether EB; Glycolmonobutylether; Monobutylglycoether

2.1.1 Eigenschaften

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften von BET sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.

Tabelle 2-1 Eigenschaften von Butoxyethanol

CAS-Nummer	111-76-2	
molare Masse	118,18 g/mol	
Aggregatzustand	flüssig	
Schmelzpunkt	-74,8 °C	(European Chemicals Bureau, 2006)
Siedepunkt	171 °C	
relative Dichte	0,9 g/cm ³ bei 20 °C	
Dampfdruck	1 hPa bei 20 °C	
Löslichkeit	mischbar mit Wasser, Ethanol und Diethylether; löslich in Erdöl und den meisten organischen Lösungsmitteln	(IARC, 2006)
log <i>K</i> _{OW} -Wert	0,8	(European Chemicals Bureau, 2006)
Flammpunkt	67 °C	
Zündtemperatur	244,5 °C	
Henry-Konstante	0,08 Pa · m ³ /mol	
Viskosität	3,28 mPa · s bei 20 °C	
Brechungsindex	1,42 bei 25 °C	(OECD, 1997)
Photodegradation	direkte Photolyse ist nicht zu erwarten	
Stabilität im Wasser	Hydrolyse ist nicht zu erwarten	
Biokonzentrationsfaktor (log BCF)	0,5	(OECD, 2004)

2.1.2 Produktion

Die Butoxyethanol-Jahresproduktion betrug 2003 in der EU etwa 161 kt, in den USA wurde sie im Jahr 2002 auf 45–227 kt geschätzt (European Chemicals Bureau, 2006; OECD, 2004). Damit zählt es zu den „High production volume chemicals“ (HPV chemicals). Laut „IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans“ (2006) gibt es In-

formationen, die darauf hindeuten, dass Butoxyethanol in neun Firmen in China, sieben in Deutschland, sechs in Indien, vier in Japan, drei in den USA, jeweils zwei in Argentinien, Mexiko, Taiwan und im UK und jeweils einer Firma in Australien, Brasilien, Polen, Russland, der Slowakei und Spanien hergestellt wird.

2.2 Stand der Forschung

Der biologische Abbau von Butoxyethanol wurde bisher nicht im Detail beschrieben, daher gibt es keine Literatur zu Butoxyethanol abbauenden Bakterienstämmen, geschweige denn über deren Abbauenzyme. Der Abbau anderer Glycoether, insbesondere Polyethylenglycol (PEG), wurde hingegen untersucht. Der aktuelle Wissenstand ist hier zusammengefasst.

2.2.1 Aerober Abbau von Polyethylenglycol (PEG)

Fincher & Payne (1962) waren die ersten, die einen Reinstamm isolieren konnten, der auf Triethylenglycol (TEG) angereichert wurde und in der Lage war PEG bis hin zu PEG 400 abzubauen. Der Stamm wurde zunächst als TEG-5 bezeichnet (Payne, 1963), später als *Alcaligenes faecalis* var. *denitrificans* klassifiziert (Grant & Payne, 1983). Bei Tetraethylenglycol-induzierten Zellen konnte im Rohextrakt nach Zugabe von PEG bis MW 600 und ethoxylierten Nonylphenoxyverbindungen sowie ethoxylierten sekundären Alkoholen mit jeweils 10–20 Ethoxyeinheiten FAD-abhängige Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden (Payne & Todd, 1966). Voraussetzung war eine freie Hydroxylgruppe am Ethoxy-Ende des jeweiligen Substrates. Unter anaeroben Verhältnissen bei Vorhandensein von Nitrat erfolgte Wachstum mit Monoethylenglycol (EG), Diethylenglycol (DEG), Tri- und Tetraethylenglycol (TetEG) sowie PEG 200 und 300 (Grant & Payne, 1983).

Dass der Abbau von PEG mit einer Dehydrogenierung beginnt, wurde auch von anderen Forschergruppen bei weiteren Stämmen festgestellt. Watson & Jones isolierten 1977 drei PEG-abbauende Stämme, *Acinetobacter* sp. SC 25, *Pseudomonas* sp. KW 8 und *Flavobacterium* sp. BT 1. SC 25 und KW 8 wuchsen mit EG, DG, TEG, PEG 200 und PEG 400, wobei PEG 400 innerhalb von 14 Tagen nicht vollständig von KW 8 abgebaut wurde. Bei beiden Stämmen wurden carboxylierte Intermediate detektiert, die Hydroxylgruppen demnach je zweimalig oxidiert. BT 1 zeigte kein Wachstum mit EG, DEG und TEG, mineralisierte PEG 600, PEG 800 und PEG 1000 vollständig und PEG 200, 400 und 1500 teilweise.

Fünf gram-negative, stäbchenförmige PEG 400 abbauende Bakterienstämme wurden von Hosoya et al. (1978) isoliert: PG 1, PG 3, PG 5, PG 6 und PG 11. Sie gehören vermutlich zur Gattung *Alcaligenes* oder *Pseudomonas*. Beim Abbau von TEG konnten als Metaboliten sowohl Di- als auch Triethylenglycoldicarboxylat nachgewiesen werden.

Der Abbauweg von PEG und die daran beteiligten Enzyme wurden bisher am eingehendsten untersucht bei den 3 *Sphingopyxis*-Stämmen *S. macrogoltabida* strain 103, *S. macrogoltabida* strain 203 (beide zuvor bezeichnet als *Flavobacterium*, dann *Sphingomonas macrogoltabidus*) und *S. terrae* (ursprünglich bezeichnet als *Flavobacterium*, dann *Sphingomonas terrae*) (Takeuchi et al., 1993; Takeuchi et al., 2001). Die Stämme *S. macrogoltabida* 103 und 203 mineralisieren PEG bis zu einem Molekulargewicht von 4000, während *S. terrae* in der Mischkultur E-1 mit *Rhizobium* sp. (ursprünglich bezeichnet als *Pseudomonas*) bis zu PEG 20 000 abbaut (Yamanaka & Kawai, 1989; Kawai & Yamanaka, 1989; Kawai et al., 1978). Innerhalb der Mischkultur E-1 verwertet der Stamm *S. terrae* PEG, wohingegen *Rhizobium* sp. das überschüssige Glyoxylat, das beim PEG-Abbau Intermediat ist und partiell freigesetzt wird, als Substrat nutzt (Kawai & Yamanaka, 1986). Die PEG-Abbauenzyme waren innerhalb der Mischkultur somit im Stamm *S. terrae* zu finden.

PEG wird zunächst zu PEG-Aldehyd und dann zu PEG-Carboxylat oxidiert, bevor die Ether-spaltung erfolgt. Es konnte ein PEG induzierbares Operon identifiziert werden, das zumindest bei *S. terrae* auf einem ca. 150 kb großem Plasmid lokalisiert ist (Charoenpanich et al., 2006; Tani et al., 2007). Insgesamt wurden rund 14 kbp kloniert und sequenziert, dabei 10 Gene identifiziert: die Transposase B (*orf1*), die Transposase A (*orf2*), ein TonB-abhängiger Rezeptor (*pegB*), die PEG-Aldehyddehydrogenase PEG-AIDH (*pegC*), eine Permease (*pegD*), die PEG-Dehydrogenase PEG-DH (*pegA*), eine PEG-Carboxylat-CoA-synthetase (*pegE*), ein AraC-Typ-Regulator (*pegR*), eine weitere Transposase A (*orf3*) und ein partielles Transposon B (*orf4*). Die Sequenzen der Abbaugene in den 3 Stämmen zeigen untereinander hohe Homologien von über 99 %. Die GenBank accession numbers der Operons lauten AB196775 für Stamm 103, AB239080 für Stamm 203 und AB239603 für *S. terrae*. Dieses *peg*-Operon (*pegBCDAE*) beinhaltet die Gene für den oberen Abbauweg.

Der GC-Gehalt dieses Operons ist mit 46–54 % geringer als der durchschnittliche GC-Gehalt der DNA von *S. macrogoltabida* (63–65 %), *S. terrae* (63–65 %) und anderen Sphingomonaden (62–68 %), daher wurde vermutet, dass es ursprünglich aus einem anderen Genus stammt und über horizontalen Gentransfer in besagte Bakterienstämme gelangt ist (Takeuchi et al., 1993).

Das Regulatorgen *pegR* wird durch PEG induziert (Charoenpanich et al., 2006). Durch die Bindung von PegR an den Promotor von *pegB* (TonB-abhängiger Rezeptor) wird die Expression des *peg*-Operons positiv reguliert. PegB ist möglicherweise nötig für die Translokation von PEG oder für die Signaltransduktion, die genaue Rolle wurde nicht geklärt.

Die Permease PegD ist vermutlich am Transport von PEG beteiligt, da sie Homologien zu Glycosid-Transportern zeigt.

Grundlagen

Die PEG-Dehydrogenase PegA ist ein membrangebundenes Homodimer. Sie besteht aus zwei Untereinheiten à 58,8 kDa, an welche jeweils ein FAD nicht-kovalent bindet (Kawai et al., 1980; Sugimoto et al., 2001; Ohta et al., 2006). Sie gehört zur Gruppe der Glucose-Methanol-Cholin(GMC)-Flavoprotein-Oxidoreduktasen. In den Stämmen *S. macrogoltabida* 103 und *S. terrae* wird *pegA* durch PEG induziert, im Stamm 203 hingegen wird *pegA* konstitutiv exprimiert (Yamanaka & Kawai, 1989). Grund ist die Transposon-Insertion des Gens *pegF* zwischen *pegD* und *pegA*, die es bei den anderen beiden Stämmen nicht gibt (Tani et al., 2007).

Die Aldehyddehydrogenase PegC ist ein Membranprotein und besteht aus 4 identischen Untereinheiten mit einer Molekülmasse von je 46,1 kDa (Ohta et al., 2005). NADP ist kovalent gebunden, es handelt sich also um ein Nicotinoprotein.

Nach der Oxidation zur Dicarbonsäure erfolgt der weitere Abbau auf zwei unterschiedlichen Wegen. Die PEG-Carboxylat-CoA-synthetase PegE katalysiert die Reaktion von PEG-Carboxylat zu PEG-Carboxylat-CoA (Tani et al., 2008). Sie ist ein 61,21 kDa-Monomer, das sowohl in der Membran- als auch in der löslichen Fraktion detektiert wurde, weswegen davon ausgegangen wurde, dass es lose an die Cytoplasmamembran bindet. Da PEG-Carboxylat-CoA nicht via β -Oxidation weiter abgebaut werden kann, ist die Rolle von PegE nicht vollständig geklärt. Mögliche Funktionen sind zum einen die Translokation von PEG-Carboxylat vom Peri- ins Cytoplasma, zum anderen die Detoxifikation der Acidität von PEG-Carboxylat.

Die zweite potentielle Weiterreaktion von PEG-Dicarboxylat erfolgt mittels einer weiteren Dehydrogenase. Downstream des *peg*-Operons wurden die Gene für die PEG-Carboxylatdehydrogenase PCDH und die Glutathion-S-transferase GST identifiziert, die beide konstitutiv exprimiert werden (Somyoonsap et al., 2008). PCDH ist ein Homotetramer mit 62,7 kDa-Untereinheiten, an die je ein FAD bindet, membrangebunden, aber durch Ultraschall leicht in die lösliche Fraktion zu überführen. Als Reaktionsprodukte entstehen Glyoxylat und PEG, das um eine Glycol-Einheit kürzer ist. Durch PCDH wird folglich die Etherspaltung katalysiert. Bei der Glutathion-S-transferase GST handelt sich um ein Homodimer mit 28,9 kDa schweren Untereinheiten. GST bindet an PEG-Carboxylat-CoA, vermutlich um dessen Toxizität zu vermindern.

Ein weiteres durch PEG induzierbares potentielles Etherspaltungsenzym wurde bereits 1997 aus der Mischkultur E-1 (bestehend aus *S. terrae* und *Rhizobium* sp.) isoliert und charakterisiert (Enokibara & Kawai, 1997) und als Diglycolsäuredehydrogenase (DGA-DH) bezeichnet. Das Molekulargewicht je Untereinheit beträgt ca. 40–41 kDa, es besteht möglicherweise aus 12 Untereinheiten. Als Produkt bei der Enzymreaktion wurde Glyoxylat detektiert (Kawai, 1985; Enokibara & Kawai, 1997).

In *Sphingomonas* sp. N6, der PEG 6 000–20 000 abbaut und nahe verwandt ist mit *S. macrogoltabida*, wurde ebenfalls sowohl PEG-Dehydrogenase- als auch Diglycolsäuredehydrogenase-Aktivität festgestellt (Kawai & Takeuchi, 1996; Kawai & Enokibara, 1996). Bei beiden handelt es sich um induzierbare Membranenzyme. Der Elektronenakzeptor mit der höchsten Aktivität war im Fall der PEG-DH die Kombination aus MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) und PMS (Phenazinmethosulfat), im Fall der DGA-DH Ferricyanid (Hexacyanidoferrat(III)).

Pseudonocardia sp. strain K1, ursprünglich isoliert als Tetrahydrofuran-Abbauer (Kohlweyer et al., 2000), wächst mit PEG 6000 und PEG 8000. Sowohl PEG-Dehydrogenase-, PEG-Aldehyddehydrogenase- als auch Diglycolsäuredehydrogenase-Aktivität wurde im Rohextrakt nachgewiesen, der Abbau erfolgt demzufolge über PEG-Carboxylat (Yamashita et al., 2004a). Die Ether-spaltende DGA-DH ist ein Homodimer mit je einem Eisenatom je Untereinheit und jede Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 23,9 kDa. Das Gen wurde kloniert und exprimiert, die Sequenz wurde unter der accession number AB126017 hinterlegt (Yamashita et al., 2004b). Die Produkte der Etherspaltung sind Glyoxylat und ein um eine C2-Einheit verkürztes PEG. Die Aminosäuresequenz des Enzyms zeigt Homologien zu verschiedenen Superoxiddismutasen, nicht aber zu der DGA-DH aus *Sphingomonas terrae* (Enokibara & Kawai, 1997).

Der Stamm *Pseudomonas stutzeri* JA1001 baut PEG mit Molekulargewichten von bis zu 13 000–14 000 ab. Die Verdopplungszeiten bei Startkonzentrationen von je 0,2 % betragen 135 Minuten beim Abbau von PEG 1000 und 150 Minuten beim Abbau von PEG 10 000 (Obadors & Aguilar, 1991). Glyoxylat konnte als Metabolit identifiziert werden. Es wurde vermutet, dass der Abbauschritt vom PEG zum Glyoxylat im Gegensatz zu dem von der Arbeitsgruppe um Kawai vorgeschlagenem Abbauweg nicht von 3 Enzymen katalysiert wird, sondern von nur einem, einer im Periplasma lokalisierten PEG-Dehydrogenase.

Der Abbauweg von PEG über PEG-Carboxylat mit anschließender Spaltung des Ethers ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Im Stamm *Rhodococcus* sp. no. 432, einem Diglycolsäure-Abbauer, wurde die Glycolsäureoxidase als Etherspaltungsenzym identifiziert (Yamanaka & Kawai, 1991). Das Enzym besteht aus 3 Untereinheiten, die jeweils etwa 49–51 kDa schwer sind, mit je einem FAD pro Untereinheit. Beim Abbau von DGA entstehen Glycolsäure und Glyoxylsäure, der Abbauschritt ist damit äquivalent zu dem bereits beschriebenen PEG-Abbau, der in Abbildung 2.1 zu sehen ist.

Grundlagen

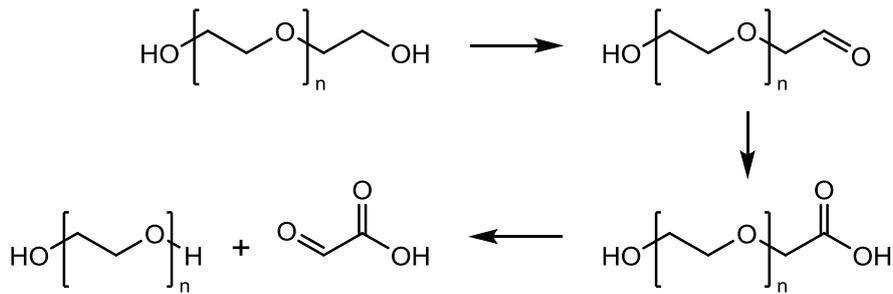


Abbildung 2.1 Abbau von PEG über PEG-Carboxylat

PEG wird zu PEG-Aldehyd und weiter zu PEG-Carboxylat oxidiert, dann erst erfolgt die Spaltung des Ethers. Dabei entstehen Glyoxylsäure und PEG, das um eine Glycoleinheit kürzer ist. Beschrieben wurde dieser Abbauweg für die Stämme *Sphingopyxis macrogoltabida* 103, *Sphingopyxis macrogoltabida* 203, *Sphingopyxis terrae*, *Sphingomonas* sp. N6, *Pseudonocardia* sp. K1 und *Pseudomonas stutzeri* JA1001 (Ohta et al., 2006; Charoenpanich et al., 2006; Somyoonsap et al., 2008; Yamashita et al., 2004a; Obradors & Aguilar, 1991; Kawai, 2010). Die Spaltung der Diglycolsäure durch den Stamm *Rhodococcus* sp. no. 432 erfolgt analog, die Produkte sind Glyoxylsäure und Glycolsäure (Yamanaka & Kawai, 1991).

Eine andere Variante für die Spaltung von PEG wurde im Stamm *Acinetobacter* sp. S8 vermutet (Pearce & Heydeman, 1980). Diethylenglycol und PEG bis PEG 200 wurden abgebaut, jedoch blieb als dead-end-Produkt Monoethylenglycol übrig. Der Abbau erfolgt durch eine sauerstoffunabhängige Abspaltung von C2-Einheiten mittels des Membran-Enzyms DEG-Lyase. Man nahm an, dass es sich bei jenen C2-Einheiten um Vinylalkohol oder Acetaldehyd handelt. Verkürztes PEG sowie Ethanol, das möglicherweise durch Reduktion von Acetaldehyd entstanden ist, wurden detektiert. Als Zwischenprodukt wurde ein Vinylether-Intermediat angenommen, dieses wurde aber nie nachgewiesen. Der vorgeschlagene Abbauweg ist in Abbildung 2.2 zu sehen

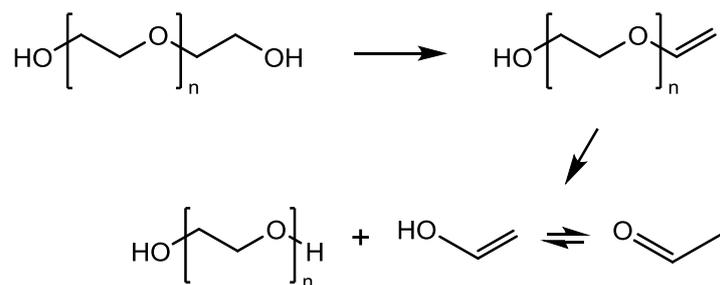


Abbildung 2.2 Abbau von PEG nach Pearce & Heydeman, 1980

PEG reagiert zunächst zu einem Vinylether, anschließend wird Vinylalkohol abgespalten, das mit Acetaldehyd in einem tautomeren Gleichgewicht steht. Der Abbauweg wurde zwar postuliert, nachgewiesen werden konnten allerdings ausschließlich verkürztes PEG sowie Ethanol. Man nahm an, dass Ethanol durch Reduktion von Acetaldehyd entsteht.

Thélu et al. (1980) postulierten, dass beim Abbau von PEG 400 durch *Pseudomonas* P 400 ein Enolether-Intermediat entsteht. Im Rohextrakt wurde sowohl beim Abbau von 2-Ethoxyethanol als auch von 2-Ethoxyacetat FAD-abhängige PEG-Dehydrogenase-Aktivität nach-

gewiesen. Die Schlussfolgerung daraus war, dass die PEG-Dehydrogenase nicht die terminale Alkoholgruppe angreift, sondern dass eine Doppelbindung gebildet und anschließend Wasser addiert wird. Der Abbauweg wurde postuliert, aber nie nachgewiesen, und ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

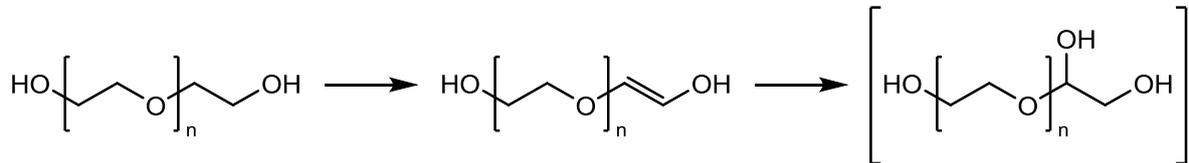


Abbildung 2.3 Abbau von PEG nach Thélu et al., 1980

Laut Thélu et al. (1980) wird im Stamm *Pseudomonas* P 400 aus PEG im ersten Schritt ein Enoether gebildet und im zweiten Schritt Wasser an die Doppelbindung addiert. Anschließend erfolgt die Spaltung des Ethers. Da es sowohl beim Abbau von 2-Ethoxyethanol als auch von 2-Ethoxyacetat FAD-abhängige Dehydrogenase-Aktivität gab, wurde dieser Abbauweg angenommen. Es wurden allerdings keine Metabolite detektiert, die diese Theorie belegen.

Über eine weitere Abbaustrategie wurde im Stamm *Pseudomonas aeruginosa* gemutmaßt, der in der Lage ist PEG bis hin zu PEG 20 000 abzubauen (Haines & Alexander, 1975). Dabei produziert der Stamm ein extrazelluläres Enzym, das hydrolytisch Ethylenglycol-, Diethylenglycol- oder auch Oligoethylenglycol-Einheiten von PEG abspaltet, welche dann weiter abgebaut werden. Weitere Untersuchungen fanden nicht statt. Der Stamm ging verloren, weswegen diese Ergebnisse nicht verifiziert werden können (Schink & Stieb, 1983).

2.2.2 Anaerober Abbau von Polyethylenglycol

Der Stamm *Desulfovibrio desulfuricans* DG2 baut EG, DEG, TEG und TetEG unter anaeroben Bedingungen ab, wobei Ethanol und Acetaldehyd Intermediate sind und Acetat und Wasserstoff die Endprodukte (Dwyer & Tiedje, 1986). Ein weiterer von dieser Gruppe isolierter Stamm ist *Bacteroides* sp. PG1, der DEG und PEG bis PEG 20 000 fermentiert. In diesem Stamm wurde ein extrazelluläres Etherspaltungsenzym vermutet, das Ethylenglycol und -Oligomere von PEG abspaltet und zunächst zu Acetaldehyd, dann weiter zu Ethanol und Acetat abbaut. Die Theorie der externen Depolymerisierung wurde allerdings von Frings et al. (1992) angezweifelt.

Der auf Brij 35 (Polyoxyethylen(23)laurylether) angereicherte Stamm *Pelobacter propionicus* KoB35 und der auf Brij 58 (Polyoxyethylen(20)cetylether) angereicherte Stamm *Acetobacterium* sp. KoB58 bauen PEG von DEG bis PEG 1000 ab, indem Acetaldehyd abgespalten und PEG auf diese Weise um eine Glycoleinheit verkürzt wird (Wagener & Schink, 1988). Acetaldehyd wird von KoB35 weiter fermentiert zu Acetat und Propionat, während Acetat im Stamm KoB58 das einzige Produkt ist.

Der strikt anaerobe Abbau von DEG bis PEG 20 000 erfolgt in den *Pelobacter venetianus*-Stämmen strain GraPEG1 (type strain; DSM 2394), strain GraPEG2 (beide SalzwassermEDIUM) und strain KoPEG2 über die Abspaltung von Acetaldehyd, was weiter zu Acetat und Ethanol umgewandelt wird (Schink & Stieb, 1983). 2-Ethoxyethanol wird ebenfalls verwertet, die methoxylierten Ether Dimethoxyethan und Tetraethylenglycoldimethylether hingegen nicht. Man ging daher davon aus, dass für den Abbau eine freie terminale Hydroxylgruppe essentiell ist. EG wird vom Stamm GraPEG1 nur in geringen Konzentrationen (< 5 mM) abgebaut, in höheren Konzentrationen wirkt es hemmend, auch auf den Abbau von PEG (Straß & Schink, 1986).

Die am Abbau beteiligten Enzyme waren unter anderem eine Dioldehydratase und eine PEG-Acetaldehydlyase, die sowohl in *P. venetianus* (Frings et al., 1992) als auch in *Acetobacterium* sp. strain HA1 detektiert wurden (Schramm & Schink, 1991). *Acetobacterium* sp. strain HA1 mineralisiert EG und PEG bis zu einem Molekulargewicht von 1000, nicht aber Ethoxyethanol und andere ethoxylierten oder methoxylierten PEGs. Als einziges Endprodukt entstand beim Abbau von PEG Acetat, Intermediat war Acetaldehyd.

Die Dioldehydratase katalysiert die Reaktion von EG zu Acetaldehyd. In *P. venetianus* strain GraPEG1 ist das Enzym im Cytoplasma lokalisiert und die Aktivität wurde durch Zugabe von Cobalaminen (Vitamin B₁₂ und -Derivate) gehemmt (Frings et al., 1992). Im Stamm *Acetobacterium* sp. HA1 hingegen wurde 65 % der Enzymaktivität in der löslichen Fraktion und 35 % in der Membranfraktion detektiert und sie konnte mittels Adenosylcobalamin gesteigert werden (Schramm & Schink, 1991). Allerdings fand auch hier eine Enzymhemmung durch andere Cobalamine statt.

Die PEG-Acetaldehydlyase spaltet Acetaldehyd von PEG ab. Cobalamine, im Speziellen Hydroxycobalamin, steigerten die Aktivität der Lyase bei *P. venetianus* GraPEG1 um bis zu 80 %, im Stamm *Acetobacterium* sp. HA1 hingegen wirkten sie hemmend.

Als Abbau-Mechanismus wurde vorgeschlagen, dass die endständige Hydroxylgruppe enzymatisch auf das benachbarte C-Atom übertragen wird und das so entstandene instabile Halbacetal anschließend zu Acetaldehyd und PEG, das um eine Glycoleinheit kürzer ist, zerfällt (Straß & Schink, 1986; Schramm & Schink, 1991). Der Abbauweg ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

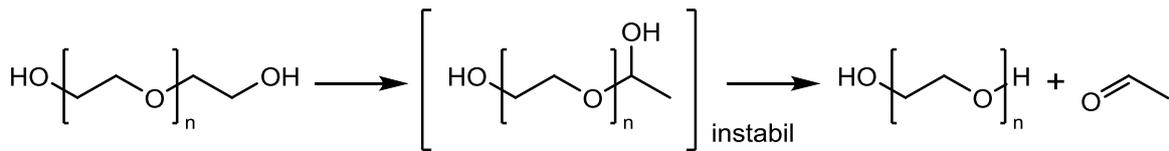


Abbildung 2.4 Anaerober Abbau von PEG nach Schramm & Schink (1991)

Die terminale Hydroxylgruppe wird auf das benachbarte C-Atom übertragen, ein instabiles Halbacetal entsteht und Acetaldehyd wird abgespalten. Der Shift der Hydroxylgruppe wurde experimentell nie bewiesen.

Diese Theorie wurde experimentell nie bewiesen. Da beim Abbau von 2-Phenoxyethanol durch den Stamm *Acetobacterium* sp. LuPhet1, der auch in der Lage war, EG und PEG bis PEG 200 abzubauen, eindeutig nachgewiesen wurde, dass bei der Spaltung des Ethers kein Hydroxyl-Shift stattfindet, sondern vielmehr ein Wasserstoffatom vom terminalen C-Atom zum benachbarten C-Atom migriert, stellt sich die Frage, ob der Abbau von PEG nicht auch analog erfolgt (Frings & Schink, 1994; Speranza et al., 2002; Speranza et al., 2003). Der Abbauweg von Phenoxyethanol ist in Abbildung 2.5 zu finden.

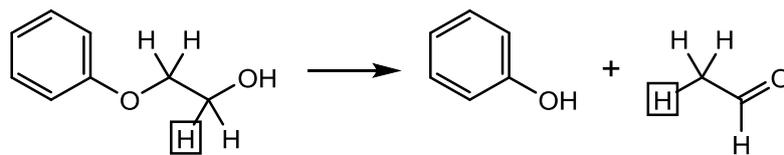


Abbildung 2.5 Anaerober Abbau von 2-Phenoxyethanol nach Speranza et al. (2003)

Ein H-Atom wird vom terminalen C- zum benachbarten C-Atom transferiert und gleichzeitig Phenol abgespalten. Dieser Mechanismus wurde unter Verwendung von deuteriertem 2-Phenoxyethanol nachgewiesen.

2.2.3 Aerober Abbau von Polypropylenglycol (PPG)

Polypropylenglycol (PPG; im Folgenden handelt es sich, wenn nicht anderweitig vermerkt, immer um das Diol, nicht um das Triol) ist im Gegensatz zu PEG hydrophob, weswegen sich unter anderem auch der biologische Abbau der beiden Substanzen unterscheidet. PEG-abbauende Bakterienstämme können in der Regel kein PPG abbauen und umgekehrt. Ausnahmen bilden die Stämme *Sphingobium* sp. strain EK-1, *Sphingopyxis macrogoltabida* strain EY-1 und *Pseudomonas* sp. strain PE-2 (Hu et al., 2007). Sie wurden auf Polyalkylenglycol (PAG) angereichert, einem Polymer, das aus zufällig angeordneten Ethylenglycol- und Propylenglycol-Einheiten besteht.

Beim Abbau von PPG durch *Microbacterium* sp. No. 7 (zuvor bezeichnet als *Stenotrophomonas maltophilia*) werden diverse PPG Dehydrogenasen induziert (Tachibana et al., 2002; Ohtsubo et al., 2015). Während des exponentiellen Wachstums vor allem mit niedermolekularen PPGs sind mindestens zwei unterschiedliche Dehydrogenasen aktiv, wobei eine davon

NAD-abhängig ist. Diese cytoplasmatische PPG-DH ist ein Homotetramer mit einem Gesamt-Molekulargewicht von 154 kDa. Sie oxidiert neben PPG(Diol) 400 und 700 und PPG(Triol) 300 und 700 auch sekundäre Alkohole (2-Propanol bis 2-Hexanol), jedoch weder primäre Alkohole und Diole noch (Poly-)Ethylenglycol oder Polyvinylalkohol (Tachibana et al., 2008). Hochmolekulare PPGs bis PPG 3000 werden hingegen von mindestens zwei unterschiedlichen im Periplasma bzw. in der Membran gelegenen Dehydrogenasen während der stationären Phase oxidiert. Bei der im Periplasma lokalisierten PPG-DH handelt es sich um ein 123 kDa schweres Homodimer, an das jeweils zwei Moleküle Pyrrolochinolinchinon (PQQ) binden (Tachibana et al., 2003). Es oxidiert PPG(Diol) 700–1000 und PPG(Triol) 700–3000, ebenso Ethylenglycol sowie Propan- und Butandiole. Anfangs werden demzufolge die niedermolekularen PPGs im Cytoplasma oxidiert, die höhermolekularen im Anschluss im Periplasma.

Hu et al. (2008) analysierten die beim Abbau von PPG 700 durch *Sphingobium* sp. strain PW-1 entstandenen Metabolite mittels MALDI-TOF und HPLC und postulierten anhand der Ergebnisse den in Abbildung 2.6 dargestellten Abbauweg. Die sekundäre Hydroxylgruppe wird zur Ketogruppe oxidiert, dann gibt es zwei mögliche Weiterreaktionen. In der ersten erfolgt die Abspaltung von Pyruvaldehyd. Dabei wird das PPG um eine Propylenglycol-Einheit verkürzt. In der zweiten erfolgt eine Hydroxylierung des sekundären C-Atoms, statt der Keto-Gruppe binden nun zwei Hydroxylgruppen. Dieser Metabolit wurde nachgewiesen, der weitere Abbau dieses Intermediats allerdings nicht beschrieben.

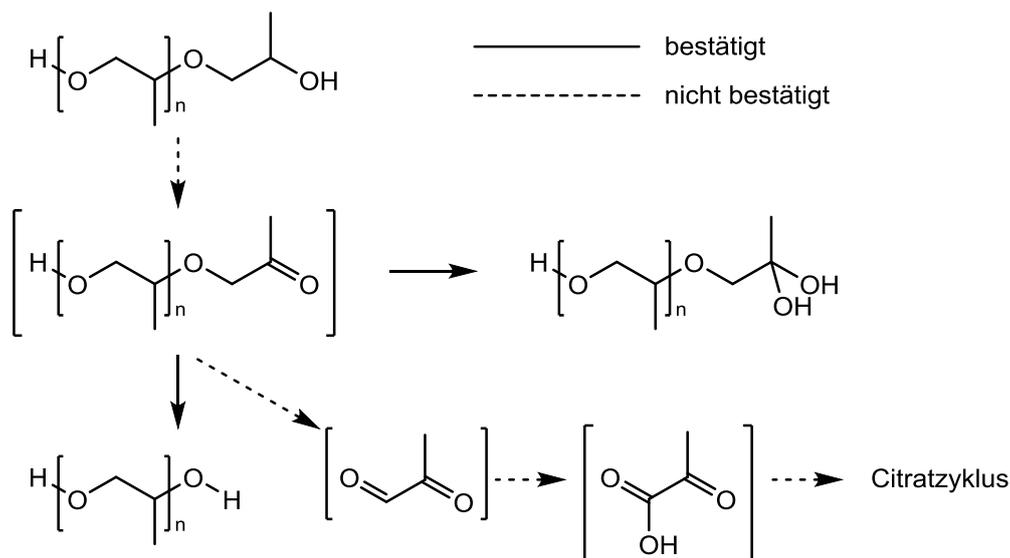


Abbildung 2.6 Abbau von Polypropylenglycol nach Hu et al. (2008)

Der Abbauweg für PPG 700 durch *Sphingobium* sp. PW-1 wurde anhand von detektierten Metaboliten postuliert. Die durchgezogenen Pfeile zeigen die tatsächlich detektierten Metabolite an, die gestrichelten hingegen die vermuteten. Im ersten Schritt wird die sekundäre OH-Gruppe oxidiert. Dann wird entweder Pyruvaldehyd abgespalten und dabei PPG um eine Propylenglycol-Einheit verkürzt oder das sekundäre C-Atom hydroxyliert, wobei ein Diol entsteht.

2.2.4 Abbau von Alkylphenolpolyethoxylaten

Industriell eingesetzte Alkylphenolpolyethoxylate (APnEOs) bestehen aus einem Alkylphenol, das über die Phenolgruppe mittels Etherverbindung mit einer unterschiedlich langen Polyethylenglycol-Kette verbunden ist. Das n gibt dabei die Anzahl der Ethylenglycol-Gruppen an. Die wichtigsten Vertreter sind Octylphenolpolyethoxylate (OPnEOs), dazu zählt z. B. Triton X-100, und Nonylphenolpolyethoxylate (NPnEOs). Der biologische Angriff erfolgt über eine Verkürzung der Polyethylenglycol-Kette. Zwei unterschiedliche Abbaumechanismen wurden vermutet.

Beim nicht vollständigen Abbau von NP6EO, NP9EO und NP20EO durch *P. putida* wurden verkürzte NPnEOs und Acetaldehyd als Metabolite sowie NP2EO als Endprodukt detektiert (John & White, 1998). Die Acetaldehyd-Produktion im Rohextrakt erfolgte unter aeroben und anaeroben Bedingungen, weswegen eine sauerstoffabhängige Reaktion ausgeschlossen wurde. Vermutet wurde ein Shift der terminalen Hydroxylgruppe auf das benachbarte C-Atom, was die Bildung eines instabilen Halbacetals zur Folge hätte, mit der anschließenden Abspaltung von Acetaldehyd. Diese Reaktion verläuft analog zum bereits erläuterten anaeroben PEG-Abbau durch die Stämme *P. venetianus* GraPEG1 (Straß & Schink, 1986) und *Acetobacterium* sp. HA1 (Schramm & Schink, 1991), dargestellt in Abbildung 2.4. Allerdings kann *P. putida* freies PEG nicht abbauen, eine sperrige hydrophobe Gruppe am Ende der PEG-Kette schien für das Etherspaltungsenzym essentiell. Derselbe Abbauweg wird auch für die Stämme *Sphingomonas* sp. NP42a, *Pseudomonas* sp. NP15b, *Sphingobium* sp. NP22b, *Sphingomonas* sp. NP41b, *Cupriavidus* sp. NP213b, *Staphylococcus* sp. NP426a und *Achromobacter* NP31a vorgeschlagen (Gu et al., 2010).

Der andere Abbaumechanismus erfolgt analog zum viel beschriebenen aeroben PEG-Abbau über die Oxidierung der Hydroxylgruppe zur Aldehyd- und Carboxylgruppe mit anschließender Etherspaltung (Tasaki et al., 2006; Liu et al., 2006; Payne & Todd, 1966; Watson & Jones, 1977; Hosoya et al., 1978; Tani et al., 2007; Ohta et al., 2006; Sugimoto et al., 2001; Yamashita et al., 2004a). Im Triton X-100-Abbauer *P. putida* S-5 wurde eine Dehydrogenase (GenBank accession number AB100375) detektiert mit 49 % (Tasaki et al., 2006), im NP2EO-Abbauer *Ensifer* sp. AS08 eine NPEO-Dehydrogenase (DQ368396) mit 40 % Homologie zu der PEG-DH aus *S. terrae* (Tasaki et al., 2006; Liu et al., 2007; Kawai et al., 1980). Untereinander zeigten diese beiden Dehydrogenasen 42 % Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Alle drei Enzyme zählen zu den GMC-Flavoprotein-Oxidoreduktasen (Tasaki et al., 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen VWR International (USA), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Sigma Aldrich (USA), Merck KGaA (Darmstadt) und Alfa Aesar (USA).

3.2 Medien, Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders angegeben wurden die Lösungen und Puffer mit deionisiertem Wasser (dH₂O) hergestellt.

SE 1000, Spurenelementlösung, 1000fach

100 mg/L	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O
30 mg/L	MnCl ₂ · 4 H ₂ O
300 mg/L	H ₃ BO ₃
200 mg/L	CoCl ₂ · 6 H ₂ O
20 mg/L	CuCl ₂ · 2 H ₂ O
20 mg/L	NiCl ₂ · 6 H ₂ O
30 mg/L	NaMoO ₄ · 2 H ₂ O

SL 100, Mineralsalzlösung, 100fach

100 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄
20 g/L	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
1 g/L	Fe(III)NH ₄ -Citrat
100 mL/L	SE 1000

PP 20, pH 7,1, Phosphatpuffer, 20fach

20 g/L	KH ₂ PO ₄
70 g/L	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O

PP 1, pH 7,1, Phosphatpuffer, 1fach

50 mL/L	PP 20
---------	-------

Ca 1000, Calciumnitratlösung, 1000fach

50 g/L	Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O
--------	--

Minimalmedium

50 mL/L	PP 20, pH 7,1
10 mL/L	SL 100
1 mL/L	Ca 1000
15 g/L	Agar-Agar (bei Festmedien)

Material und Methoden

Vollmedium LB (Lysogeny broth), nach Miller

10 g/L	Trypton
10 g/L	NaCl
5 g/L	Hefeextrakt
15 g/L	Agar-Agar (bei Festmedien)

SOC-Medium

20 g/L	Pepton
5 g/L	Hefeextrakt
0,6 g/L	NaCl
0,18 g/L	KCl
2,04 g/L	MgCl ₂
2,46 g/L	MgSO ₄
20 mL/L	1 M Glucose

Antibiotikakonzentrationen

50 µg/mL	Kanamycin (Km)
100 µg/mL	Ampicillin (Amp)
34 µg/mL	Chloramphenicol (Cm) (gelöst in Methanol)

Saline, 0,9 %ig

9 g/L	NaCl
-------	------

20 mM Tris-HCl, pH 8

20 mM	Tris
mit HCl auf pH 8 titriert	

50 mM Tris-HCl, pH 8

50 mM	Tris
mit HCl auf pH 8 titriert	

Pyrophosphatpuffer, 0,1 M, pH 8

26,6 g/L	Natriumpyrophosphat
mit HCl auf pH 8 titriert	

TAE-Puffer, 50fach

242 g/L	Tris
18,6 g/L	EDTA
57,1 mL/L	Essigsäure
zunächst Tris und EDTA in ca. 600-700 mL dH ₂ O lösen, dann die Essigsäure dazugeben und mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen.	

TAE-Puffer, 1fach

20 mL/L	TAE-Puffer, 50fach
---------	--------------------

Lösungen für die Proteinanalyse

Bradfordlösung

100 mg/L	Coomassie Brillantblau G-250
50 mL/L	Ethanol (absolut)
100 mL/L	85 %ige Phosphorsäure

Coomassie Brillantblau G-250 zunächst in Ethanol und Phosphorsäure bei 50 °C lösen, dann mit dH₂O auffüllen und im Anschluss filtrieren.

Rehydrierungspuffer

480 mg/mL	Urea
152 mg/mL	Thiourea
30 mg/mL	CHAPS
9 g/mL	DTT
2 µL/mL	Ampholyte

Equilibrierungspuffer I und II

6 M	Urea
0,375 M	Tris-HCl, pH 8,8
2 %	SDS
20 %	Glycerin
2 % (w/v)	DTT (nur bei Puffer I)
2,5 % (w/v)	Iodoacetamid (nur bei Puffer II)

TGS-Puffer, 5fach

15 g/L	Tris
72 g/L	Glycin
5 g/L	SDS

TGS-Puffer, 1fach

200 mL/L	TGS-Puffer, 5fach
----------	-------------------

Färbe-/Entfärbelösung

450 mL/L	Methanol
100 mL/L	Essigsäure
2,5 g/L	Coomassie Brillantblau G-250 (nur bei Färbelösung)

3.3 GC-MS-Analyse

Um Substrat und Metabolite im Medium zu detektieren, wurde eine Flüssig-flüssig-Extraktion mit Dichlormethan vorgenommen. Dazu wurde die Probe zunächst für 2 Minuten bei höchster Geschwindigkeit (21 000 g) zentrifugiert, um die Zellen abzutrennen. Der pH des Überstands wurde mit Phosphorsäure auf ca. 2 eingestellt. Die Extraktion erfolgte, indem die Probe mit demselben Volumen Extraktionsmittel 3–5 Minuten ausgeschüttelt wurde. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend im GC-MS analysiert.

Bei dem GC-MS handelte es sich um das 7890A GC-System mit dem 5975C VL MSD Detektor und dem 7683B Injektor der Firma Agilent Technologies, USA. Zu Beginn der Arbeit wurde die Säule HP-5ms, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m verwendet, die im späteren Verlauf gegen eine VF-5ms, 60 m, 0,25 mm, 0,25 μ m ausgetauscht worden ist. Injiziert wurden 1 μ L Probe und der Split betrug in der Regel 10:1. Das Temperaturprogramm verlief folgendermaßen: 1 min hold bei 40 °C, dann 10 °C/min bis 200 oder 250 °C. Das Trägergas war Helium, die Flussrate betrug 0,927 mL/min.

3.4 Isolierung Butoxyethanol abbauender Reinstämme

Für diese Arbeit wurden Reinstämme isoliert, die in der Lage waren, 2-Butoxyethanol vollständig abzubauen. Flüssiges Minimalmedium wurde mit BET als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle versetzt und mit folgenden Inokula angeimpft: Waldboden (Stuttgart-Büsnau), Belebtschlamm (Lehr- und Forschungsklärwerk (LFKW), Stuttgart; Raffinerie-Kläranlage, Karlsruhe), Schlamm aus einem Biowäscher (Rastatt) und Biologie aus einem Biotricklingfilter im Technikum des Instituts für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft (ISWA) der Uni Stuttgart, der von Dr. Daniel Dobslaw betrieben wurde (Stuttgart). Nach mehrfacher Überführung in frische Kolben wurden verdünnte Proben auf Minimalmediumpplatten ausplattiert und BET als Substrat hinzugegeben. Einzelne Kolonien wurden auf frische Platten überimpft, bis Reinstämme erhalten wurden. Die Stämme erhielten Labornamen: „BOE“, kennzeichnend für Butoxyethanol, und eine Nummerierung (z. B. BOE100). Um Dopplungen auszuschließen, wurde ein BOX-PCR-Fingerprinting durchgeführt (Martin et al., 1992; Versalovic et al., 1994) (s. Kapitel 3.19). Zur Identifizierung der Bakterienstämme wurde ein Teil des 16S rRNA-Gens mit den Primern 27F-CM und 1492R amplifiziert (Kapitel 3.19, Tabelle 3-5) (Weisburg et al., 1991; Frank et al., 2008) und durch eine Fachfirma sequenziert (GATC Biotech AG (Konstanz) bzw. SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen)). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit NCBI-Datenbankeinträgen abgeglichen (NCBI BLAST, blastn; database: 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea); <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990). Auf diese Weise konnte jeder Stamm einer Spezies zugeordnet werden

Um die Verwandtschaftsverhältnisse dieser Stämme untereinander und in Relation zu den Type-strains graphisch zu veranschaulichen, wurde auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzen mit dem Programm MEGA7 ein phylogenetischer Baum erstellt (Kumar et al., 2016). Das Alignment der Sequenzen erfolgte mit ClustalW (Thompson et al., 1994), der phylogenetische Baum wurde mit der Neighbor Joining-Methode angefertigt, die evolutionären Abstände mit der Maximum Composite Likelihood-Methode berechnet (Saitou & Nei, 1987; Tamura et al., 2004).

3.5 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

In Tabelle 3-1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgelistet, die nicht zu den BOE-Stämmen zählen. Tabelle 3-2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und deren Verwendungszweck.

Tabelle 3-1 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Verwendung	Herkunft
<i>E. coli</i> JM109	Klonierung	Stammsammlung ALR
<i>E. coli</i> NEB5- α	Klonierung	New England Biolabs
<i>E. coli</i> S17-1	Transposonmutagenese, Mating	Stammsammlung ALR
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Überexpression	Stammsammlung ALR

Tabelle 3-2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendung	Herkunft
pCro2a	Transposonmutagenese	AG Altenbuchner, IIG, Uni Stuttgart (Onaca et al., 2007)
pCom10	Überexpression	AG Schmid, TU Dortmund (Smits et al., 2001)

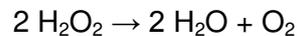
3.6 Untersuchungen der klassischen Mikrobiologie

Kolonie- und Zellmorphologie

Die Kolonien wurden betrachtet und charakterisiert anhand von Merkmalen wie Farbe, Form, Rand, Glanz und Profil. Die Zellen wurden außerdem mikroskopiert und die Zellmorphologie beschrieben.

Katalasetest

Wasserstoffperoxid kann als toxisches Nebenprodukt bei der Sauerstoffatmung anfallen. Die Katalase ist ein Enzym, das Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umwandelt:



Zum Nachweis wurde auf einem Objektträger in einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung eine Bakterienkolonie suspendiert. Bei positiver Reaktion bildeten sich sofort Gasbläschen.

Oxidaseschnelltest (Merck)

Die Cytochrom c-Oxidase ist ein Enzym der Atmungskette. Es reduziert Sauerstoff und wird dabei oxidiert. In der oxidierten Form oxidiert es Cytochrom c. Das Vorhandensein der Cytochrom c-Oxidase wurde mit den Teststreifen Bactident Oxidase der Firma Merck KGaA, Darmstadt, untersucht.

KOH-Test

Der KOH-Test macht eine Aussage über das Gramverhalten. Auf einem Objektträger wurde etwas Zellmaterial in 2%iger Kaliumhydroxidlösung suspendiert. Das Kaliumhydroxid zerstört die Zellwand gram-negativer Bakterien und das Innere der Zelle tritt aus. Mit einer Impföse tauchte man in die Flüssigkeit und zog bei positiver Reaktion die DNA als Faden heraus.

Aminopeptidasetest (Merck)

Der Aminopeptidasetest gibt Aufschluss über das Gramverhalten eines Stammes, da L-Aminopeptidase bis auf wenige Ausnahmen ausschließlich bei gram-negativen Bakterien zu finden ist. Das Enzym spaltet L-Alanin aus unterschiedlichen Substraten ab. Die verwendeten Teststreifen Bactident Aminopeptidase der Firma Merck KGaA, Darmstadt, enthalten L-Alanin-4-nitroanilid. Durch das Enzym wird das L-Anilin abgespalten. Das dabei ebenfalls entstehende 4-Nitroanilin hat eine gelbe Färbung. Der Test wurde nach Anleitung durchgeführt.

3.7 Bestimmung der optischen Dichte (OD)

Die Keimkonzentration ist proportional zur Absorption bei 546 nm, deswegen gilt die optische Dichte (OD) bei dieser Wellenlänge als Maß für die Bakterienkonzentration. Gemessen wurde sie in Kunststoffküvetten in einem Photometer gegen das Medium als Referenz. Der lineare Bereich erstreckte sich von 0 bis 0,5. Bei Werten größer als 0,5 wurde mit dem Medium verdünnt.

3.8 OD_{546} -KBE-Verhältnis

Um die OD_{546} mit den koloniebildenden Einheiten (KBE) zu korrelieren, wurde von einer sich im exponentiellen Wachstum befindlichen Flüssigkultur zunächst die OD_{546} bestimmt, anschließend eine Verdünnungsreihe hergestellt und diese ausplattiert. Nach 2–5 Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die Kolonien ausgezählt, mit der zuvor bestimmten OD_{546} ins Verhältnis gesetzt und auf $OD_{546} = 1$ genormt.

3.9 Salztoleranz

Um die Salztoleranz der Bakterienstämme zu untersuchen, wurde flüssiges MM mit verschiedenen hohen NaCl-Konzentrationen versetzt, mit einer Vorkultur des entsprechenden Stammes inokuliert und BET als Substrat hinzugegeben. Die OD_{546} wurde in bestimmten Abständen gemessen, um die Wirkung des Salzes auf das Bakterienwachstum zu beurteilen.

3.10 Antibiotikaresistenz

Jeweils 100 μ L des zu untersuchenden Bakterienstammes wurden auf einer LB-Platte ausplattiert. Da BOE3 nicht auf LB wächst, wurde hier eine MM + BET-Platte verwendet. Die Platten wurden in Sektoren eingeteilt und jeder Sektor mit einem sterilen Filterpapier bestückt. Auf jedes Filterpapier wurde eine definierte Menge eines Antibiotikums pipettiert. Nach Inkubation der Platte bei 30 °C für 1–5 Tage wurde das Ergebnis betrachtet und die Größe des ggf. entstandenen Hemmhofes dokumentiert.

3.11 Wachstumskurven und Induktionstests

In Batch-Ansätzen wurden die Wachstumsparameter bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Eine induzierte Vorkultur wurde mit frischem Minimalmedium verdünnt, Substrat hinzugefügt und die Zunahme der Zellmasse über die Zeit mittels Messung der OD_{546} bestimmt. Für die Berechnung der Wachstumskonstante μ wurden die Werte in der Phase des exponentiellen Wachstums verwendet.

Ein Substratwechsel von Vorkultur zu Hauptkultur wurde dann vorgenommen, wenn untersucht werden sollte, ob die Enzyme für den Abbau eines Substrates induziert werden oder konstitutiv vorliegen.

3.12 Butoxyethanol-Sensitivitätstest

Flüssiges Minimalmedium wurde mit dem jeweiligen Stamm inokuliert, verschiedene Butoxyethanol-Konzentrationen eingestellt und die OD_{546} in regelmäßigen Abständen gemessen, um herauszufinden, wie sich unterschiedlich hohe Konzentrationen an Butoxyethanol auf das Wachstum auswirken.

3.13 Metabolitdetektion

In Flüssigkulturen des Stammes BOE100 sollten mittels GC-MS-Analyse mögliche Metabolite identifiziert werden, um Aufschluss über den Abbauweg von Butoxyethanol zu erhalten. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Ansätze getestet.

Chloramphenicol (Cm) ist ein Antibiotikum, das als Translationshemmer wirkt und damit die Proteinbiosynthese blockiert. Wird eine Bakterienflüssigkultur mit Chloramphenicol versetzt, werden als Konsequenz keine neuen Proteine synthetisiert und ausschließlich die bereits hergestellten bleiben aktiv, bis sie mit der Zeit schadhaft und damit inaktiv werden. Der Abbau wird unterbrochen und Metabolite akkumulieren im Medium. Einer Flüssigkultur von BOE 100, die mit MM + BET gewachsen war, wurden wenige Milligramm Chloramphenicol

und zusätzlich erneut BET zugegeben. Am Folgetag wurde die Probe extrahiert und im GC-MS auf Metabolite untersucht.

2-(2-Chlorethoxy)ethanol ist ein Butoxyethanol-Strukturanaloger Stoff, der BOE100 nicht als alleiniges Wachstumssubstrat dient. Es wurde untersucht, ob Chlorethoxyethanol als Co-Substrat beim Abbau von Butoxyethanol durch die aktiven Enzyme angegriffen wird. Dazu wurde eine Flüssigkultur von BOE100 angesetzt und diese mit 10 mM Butoxyethanol und 10 mM Chlorethoxyethanol versetzt. Nach 5 Tagen Inkubation auf dem Schüttler bei 30 °C wurde der Kulturüberstand mit Dichlormethan extrahiert und im GC-MS analysiert.

3.14 Sauerstoffelektrode

Dieser Versuch wurde an der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe von Dr. David Schleheck mit seiner Unterstützung durchgeführt.

Bei BOE100-Kulturen, die zum einen mit Glucose gewachsen waren und zum anderen mit Butoxyethanol, wurde nach Zugabe unterschiedlicher Substrate die Sauerstoffzehrung gemessen. Hierfür wurden zunächst jeweils 500 mL MM mit je 1 mL einer Übernachtskultur angeimpft, die Kolben mit 2 mM Butoxyethanol bzw. 2 mM Glucose versetzt und über Nacht bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Vormittag wurden zunächst die OD_{546} gemessen und anschließend jeweils 9 mM Substrat hinzugefügt. Nach gut 3 Stunden weiterer Inkubation wurde wiederum die OD_{546} bestimmt. Die Kulturen, jetzt in der exponentiellen Wachstumsphase, wurden bei 9 °C und 12 000 rpm 20 Minuten lang zentrifugiert, mit ca. 250 mL Phosphatpuffer 1fach (PP 1) gewaschen, erneut zentrifugiert, in etwa 2 mL PP 1 resuspendiert und die OD_{546} ein weiteres Mal bestimmt. Die Zellen wurden anschließend bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Die Sauerstoffelektrode wurde bei 30 °C betrieben und dementsprechend auf 30 °C kalibriert. Hierfür wurde temperierter Phosphatpuffer mit Sauerstoff gesättigt und die Elektrode mit dieser Lösung auf die Sauerstoffsättigung von 100 % kalibriert. Zur Eliminierung von gelöstem Sauerstoff wurde einer Phosphatpufferlösung Natriumdithionit hinzugefügt und die Elektrode auf 0 % Sauerstoff kalibriert. Im Anschluss an die Kalibrierung erfolgte die Messung der Sauerstoffzehrung. Hierfür wurden jeweils 700 μ L PP 1 in die Messzelle pipettiert (30 °C), 10 μ L der vorbereiteten Zellen hinzugegeben und die Ruheatmung unter Rühren aufgezeichnet. Nachdem sich eine konstante Ruheatmung eingestellt hatte, wurden 35 μ L einer 10 mM Substratlösung hinzugegeben und die Sauerstoffzehrung weiter aufgezeichnet. Verwendet wurden Butoxyethanol, Butoxyessigsäure und Glucose sowie Methyl-*tert*-butylether (MTBE) und Diethylether.

3.15 NAD-Umsatz im Rohextrakt

Im Rohextrakt wurde die NAD-Abhängigkeit von Enzymreaktionen beim Zugabe unterschiedlicher Substrate untersucht. Dazu wurde eine mit Butoxyethanol gewachsene 1 L-Kultur zunächst bei 9 600 rpm und 4 °C für 6 Minuten zentrifugiert, drei Mal mit ca. 250 mL eiskalter Saline gewaschen und in etwa 35 mL kalter 0,1 M Pyrophosphatlösung (pH 8) resuspendiert. Die Suspension wurde 2–3 Mal mit der French Press bei einem Druck von 18 000 psi behandelt, um die Zellen aufzuschließen. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 2 °C und 11 000 rpm für 10 Minuten, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand (Rohextrakt) wurde für die Aktivitätsmessungen verwendet.

Ein Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen: 800 µL dH₂O + 800 µL Pyrophosphatlösung + 400 µL Rohextrakt + 10 µL Testsubstrat. Nachdem diese Komponenten in einer Quarzküvette gut vermischt worden waren, wurden 10 µL einer 50 mM NAD-Lösung dazugegeben und sofort die Extinktion bei 340 nm über die Zeit aufgezeichnet. Bei 340 nm hat NADH, das bei Verbrauch von NAD entsteht, sein Absorptionsmaximum, die Bildung von NADH konnte auf diese Weise photometrisch verfolgt werden.

3.16 Substratpattern

Um festzustellen, mit welchen Substraten die BOE-Stämme wuchsen, wurde flüssiges Minimalmedium mit dem jeweiligen Stamm angeimpft, so dass die Anfangs-OD₅₄₆ bei mindestens 0,1 lag, und 3 mM eines Substrates hinzugefügt. Nach einer Woche Inkubation auf dem Schüttler bei 30 °C wurde die OD₅₄₆ erneut gemessen, um Wachstum zu ermitteln.

3.17 DNA-Isolierung

Genomische DNA wurde mit nachfolgenden Kits isoliert:

GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas bzw. Thermo Scientific, USA)

DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Niederlande)

Für die Plasmidisolierung kamen zur Anwendung:

GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas bzw. Thermo Scientific, USA)

Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, USA)

Roti-Prep Plasmid MINI (Carl Roth, Karlsruhe)

Aufgereinigt wurde DNA mit:

GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, USA)

DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research, USA)

Cycle-Pure Kit (VWR Peqlab, Darmstadt/Erlangen)

Die Durchführung erfolgte jeweils nach Vorgabe des Herstellers. Für manche downstream-Applikationen (z. B. nachfolgende Sequenzierung oder Restriktionsverdau) wurde die DNA nicht in Puffer eluiert, sondern in PCR-Wasser.

Oftmals war es ausreichend, die DNA durch mechanischen Aufschluss der Zellen mit anschließender Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation zu gewinnen.

Gram-negative Stämme wurden hierfür thermisch behandelt. Dazu wurde eine Zellsuspension für 10 Minuten bei 103 °C gekocht, im Anschluss 2 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert und der Überstand verwendet.

Der gram-positive Stamm BOE5 wurde mit dem BeadBug Homogenizier aufgeschlossen. Hierfür wurde Zellmaterial in etwa 700 µL PCR-Wasser suspendiert, Glas-Beads (Durchmesser 0,1 mm, Carl Roth, Karlsruhe) hinzugegeben und die Suspension mit dem BeadBug 3 Minuten gebeatet. Die Lösung wurde anschließend 2 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert und der Überstand verwendet.

3.18 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen wurden photometrisch mit Hilfe der TrayCell von Hellma Analytics, Müllheim, bestimmt. Es wurden jeweils 3,5 µL Probevolumen eingesetzt und die Extinktion bei 230, 260 und 280 nm gemessen. Wurde der 1 mm-Deckel der TrayCell eingesetzt, wurde die Extinktion bei 260 nm mit dem Faktor 500 multipliziert, um die DNA-Konzentration in der Einheit ng/µL zu erhalten. Wurde hingegen der 0,2 mm-Deckel verwendet, wurde mit dem Faktor 2500 multipliziert.

3.19 PCR

Für die PCR-Versuche wurden nachfolgende Reagenzien verwendet:

Taq-Polymerase, 5 U/µL (biomaster GmbH, Windeck)

Taq-Polymerase, 5 U/µL (Bio&SELL GmbH, Feucht)

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 2 U/µL (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 2 U/µL (New England Biolabs, Frankfurt a. M.)

10X PCR-Puffer, inkl. MgCl₂ (25 mM) (biomaster GmbH, Windeck)

10X PCR-Puffer, ohne MgCl₂ (biomaster GmbH, Windeck)

5X Phusion HF Buffer, inkl. MgCl₂ (7,5 mM) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

5X Phusion GC Buffer, inkl. MgCl₂ (7,5 mM) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

MgCl₂, 50 mM (biomaster GmbH, Windeck)

dNTP-Mix, 10 mM each (biomaster GmbH, Windeck)

Primer, 100 µM (biomers.net GmbH, Ulm)

- Primer, 100 μM (metabion GmbH, Planegg)
- DMSO (New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- PCR- H_2O (steriles Wasser aus der Reinstwasseranlage)

Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist Tabelle 3-3 zu entnehmen. Ein Ansatz, bei der die Taq-Polymerase verwendet wurde, unterschied sich von einem, bei dem die Phusion-Polymerase zum Einsatz kam, hinsichtlich der MgCl_2 -Konzentration, der Primerkonzentration und der Konzentration an Polymerase.

Tabelle 3-3 PCR-Standardansätze

Komponente	Taq-Polymerase	Phusion-Polymerase
Puffer	1X	1X
MgCl_2	2,5 mM	1,5 mM
DMSO	5 %	5 %
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
Primer je	0,2 μM	0,5 μM
Polymerase	1,25 U/50 μL	1 U/50 μL
DNA	10–100 ng/50 μL	10–100 ng/50 μL

Auch die PCR-Programme beider verwendeter Polymerasen unterschieden sich. Sie sind in Tabelle 3-4 dargestellt. Die Annealing-Temperatur A war dabei abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Bei der Taq-Polymerase lag die Annealing-Temperatur in der Regel etwa 3 $^\circ\text{C}$ unterhalb der Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur. Bei der Phusion Polymerase hingegen wurde als Annealingtemperatur direkt die Schmelztemperatur oder sogar eine um bis zu 3 $^\circ\text{C}$ höhere Temperatur verwendet. In manchen Fällen wurde die optimale Annealingtemperatur experimentell mit Hilfe einer Gradienten-PCR ermittelt. Die Elongationszeit t war abhängig von der Länge des Amplifikates. Für die PCR mit der Taq-Polymerase wurde 1 Minute Elongationszeit pro 1 kbp veranschlagt, für die mit der Phusion-Polymerase 20 Sekunden pro 1 kbp.

Tabelle 3-4 Standard-PCR-Programme

Schritt	Taq-Polymerase		Phusion-Polymerase	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
1. initiale Denaturierung	94 $^\circ\text{C}$	2–4 min	98 $^\circ\text{C}$	2–4 min
2. Denaturierung	94 $^\circ\text{C}$	30 sek	98 $^\circ\text{C}$	15 sek
3. Annealing	A	30 sek	A	15 sek
4. Elongation	72 $^\circ\text{C}$	1 min/kbp	72 $^\circ\text{C}$	20 s/kbp
5. finale Elongation	72 $^\circ\text{C}$	8–10 min	72 $^\circ\text{C}$	8–10 min
6. Kühlen	4 $^\circ\text{C}$	hold	4 $^\circ\text{C}$	hold

Die Annealing-Temperatur A war abhängig von der Schmelztemperatur der Primer (Taq-Polymerase: $A \approx T_m - 3^\circ\text{C}$, Phusion-Polymerase: $T_m \leq A \leq T_m + 3^\circ\text{C}$).

In Tabelle 3-5 finden sich alle in dieser Arbeit für eine PCR verwendeten Primer. Neben dem Name und der Sequenz ist auch die Verwendung aufgelistet.

Tabelle 3-5 PCR-Primer

Primer	Sequenz	Verwendung
27F-CM 1492R	agagtttgatcmtggctcag tacggytacctgttacgact	16S rRNA- Gensequenzanalyse
BOXA1R	ctacggcaaggcgacgctgacg	BOX-DNA-Fingerprinting
pCom-F pCom-R	agagtgggaggcctaac tatcagaccgctctgc	MCS bei pCom10
3Ox2-F 3Ox2-R	aaa <u>accggg</u> gttccggcaacccttgt aaa <u>ggatcc</u> ccggaaatcaggcttg	egeA(B3)-Nachweis
FAH_Ex_EcoRI-F FAH_Ex_BamHI-R FAH_PDeI_B-R	aaaa <u>gaattc</u> cgcgcccttacaagcacg aaaa <u>ggatcc</u> gcccgcataaaatcttccatt aaaa <u>ggatcc</u> gcccgtgaagcagtatc	Überexpression/ egeA(P)-Nachweis/ egeABC(P)-Nachweis

MCS: multiple cloning site; Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen (SmaI: cccggg; BamHI: ggatcc; EcoRI: gaattc)

In den Stämmen BOE3 und BOE200 wurden die Sequenzen für die Gene *egeA*, *egeB* und *egeC* identifiziert. Mittels PCR wurde überprüft, ob diese Gene auch in den anderen isolierten BOE-Stämmen zu finden sind. Verwendet wurde die Taq-Polymerase. Von jedem BOE-Stamm wurde zunächst die DNA isoliert (s. Kapitel 3.17). Es wurden drei unterschiedliche Primerpaar-Kombinationen eingesetzt, um zum einen das Gen *egeA* aus BOE3 (*egeA*(B3)), zum zweiten das Gen *egeA* aus BOE200 (*egeA*(P)) und zum dritten das Gencluster *egeABC* aus BOE200 (*egeABC*(P)) zu detektieren. Die dafür verwendeten Primer finden sich in Tabelle 3-6. Die drei PCRs wurden zeitgleich durchgeführt bei einer Annealing-Temperatur von 58 °C und einer Elongationszeit von 1 min 20 s. Die Amplifikate wurden anschließend im Agarosegel aufgetrennt.

Tabelle 3-6 Ege-PCR

Amplifikat	Primer 1	Primer 2
egeA(P)	FAH_Ex_EcoRI	FAH_Ex_BamHI-R
egeA(B3)	3Ox2-F	3Ox2-R
egeABC(P)	FAH_Ex_EcoRI	FAH_PDeI_B-R

3.20 Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Agarose wurde in TAE-Puffer, 1fach, durch Kochen in einer Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit ca. 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Für die Elektrophorese wurde TAE-Puffer, 1fach, mit einem Zusatz von 0,2 µg/mL Ethidiumbromid verwen-

det. Es wurde eine Spannung von 5–8 V/cm Gel angelegt. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht betrachtet.

3.21 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Methode zum Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle, die sowohl bei eukaryontischen als auch bei prokaryontischen Zellen funktioniert (Neumann et al., 1982; Fiedler & Wirth, 1988). Je nachdem, um welchen Bakterienstamm es sich handelt, haben sich unterschiedliche Protokolle als effizient erwiesen. Nachfolgend werden diese erläutert.

3.21.1 Elektroporation *E. coli*

100 mL LB wurden mit Zellmaterial einer Übernachtplatte oder einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,4–0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden 20–30 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 6–10 Minuten bei 4 000–6 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit ca. 50 mL eiskaltem, sterilem dH₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem das Pellet in 8–10 mL kaltem, sterilem 10 %igen Glycerin resuspendiert worden war, wurde die Lösung bei 2 °C und 6 000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen final in 100–200 µL 10 %igem Glycerin aufgenommen. Je 30–40 µL dieser Suspension wurden für die Elektroporation verwendet.

Die derart vorbereiteten elektrokompetenten Zellen wurden mit 2 µL Ligationsansatz bzw. 5–50 ng Plasmid versetzt und in eine kalte Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite, von Carl Roth, Karlsruhe, oder VWR, USA) überführt. Die Küvette wurde in den MicroPulser (Bio-rad, USA) gestellt und das vorprogrammierte Programm Ec1 eingestellt. Nach dem Drücken des „puls“-Knopfes wurden so schnell wie möglich 600 µL SOC-Medium in die Küvette gegeben und die Lösung mit der Pipette durchmischt. Die Suspension wurde in ein steriles 2 mL-Reaktionsgefäß überführt, die Küvette mit erneuten 600 µL SOC gespült und diese dann ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt.

Das Reaktionsgefäß wurde anschließend bei 37 °C und 220–250 rpm 1–2 h inkubiert, bevor ein definiertes Volumen der Zellsuspension, gewöhnlich 100 µL, auf LB mit entsprechendem Antibiotikum und ggf. X-Gal und IPTG ausplattiert wurde.

3.21.2 Elektroporation *Pseudomonas* sp.

Eine 100 mL-Übernachtskultur (LB-Medium) des benötigten *Pseudomonas*-Stammes wurde 10 Minuten bei 4 300 rpm und 20 °C zentrifugiert, mit 50 mL sterilem dH₂O gewaschen, erneut zentrifugiert, mit 10–15 mL 300 mM Saccharose gewaschen, 1–2 Minuten bei 13 000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und in ca. 1 mL 300 mM Saccharose resuspendiert. Jeweils 100 µL dieser Suspension wurden in Reaktionsgefäße pipettiert, mit Plasmid-DNA versetzt, in Elektroporationsküvetten überführt (2 mm Spaltbreite, von VWR, USA) und mittels MicroPulser (Biorad, USA) (Programm Ec2) elektroporiert. Im Anschluss erfolgte sofort die Zugabe von 500 µL LB, das Überführen dieser Zellsuspension in ein 2 mL-Reaktionsgefäß und das erneute Spülen der Küvette mit weiteren 500 µL LB, die ebenfalls in das 2 mL-Reaktionsgefäß pipettiert wurden. Die Zellsuspension wurde bei 30 °C und 220–250 rpm 2–3 Stunden inkubiert, dann ein definiertes Volumen (zumeist 100 µL) auf LB mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

3.22 Colony-PCR

Nach der Transformation war es notwendig, einen Klon mit dem Zielplasmid zu identifizieren, da es gelegentlich zu falsch-positiven Ergebnissen kam und somit nicht jeder Klon das gewünschte Plasmid aufgenommen hatte. Zu diesem Zweck wurden einzelne Kolonien in 20 µL PCR-Wasser suspendiert und diese Suspensionen 5 Minuten bei 100 °C gekocht, um die Zellen aufzuschließen. Nach Zentrifugation wurden jeweils 5 µL des Überstands als Template in einem 25 µL-Colony-PCR-Ansatz verwendet. Primer waren diejenigen, die die MCS von pCom10 amplifizierten: pCom-F und pCom-R (s. Tabelle 3-5). Bei erfolgreicher Ligation des Inserts wurde anschließend im Agarosegel die entsprechend lange Bande detektiert.

3.23 Genom-Sequenzierungen

3.23.1 Genom-Sequenzierung von *P. putida* BOE100

Zunächst wurde mit dem GeneJET Genomic DNA Purification Kit der Firma Fermentas (USA) nach Anleitung des Herstellers genomische DNA des Stammes BOE100 isoliert. Nach erfolgter Qualitätskontrolle mittels TrayCell und Analyse im Agarosegel wurde diese an die Firma GATC Biotech AG, Konstanz, verschickt, die die Sequenzierung vornahm.

Sie erfolgte mit einem Illumina HiSeq 2000 in 100 Basen paired end Modus (Metzker, 2010). Die Fragmentgröße der Library betrug im Mittel etwa 400 nt, abzüglich der Adapter etwa 280 nt, der innere Abstand zwischen den beiden Reads demnach ungefähr 80 nt. Im ersten Sequenzierdurchgang wurden 9 Mio. reads erzeugt. Da die beauftragte Firma mit der Quali-

tät nicht sonderlich zufrieden war, wurde ein zweiter Sequenzierdurchgang mit 3,75 Mio. reads durchgeführt. Die Rohdaten beider Sequenzierdurchgänge wurden unserer Abteilung zur Verfügung gestellt.

Das Assembly wurde von Dr. Niko Strunk (ALR) mit dem Programm Geneious, Version 6.0.3 der Firma Biomatters, Neuseeland, durchgeführt.

Die entstandenen Contigs wurden bei IMG (<https://img.jgi.doe.gov/>) hochgeladen und automatisch annotiert (Markowitz et al., 2012). Die IMG submission ID lautet 11454. Als locus tag wurde „PputBOE100“ gewählt.

3.23.2 Genom-Sequenzierung von *P. vancouverensis* BOE200

Die Genomsequenzierung von BOE200 wurde vom Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Abteilung Molekulare Biotechnologie, Gruppe Funktionelle Genomanalysen (Stuttgart) verrichtet. Dem IGB wurde hierfür Zellmaterial in Form von gefrorenen Zellperlen (-80 °C) zur Verfügung gestellt, d.h. die DNA-Isolierung wurde extern durchgeführt.

Der Auftrag umfasste die Erstellung einer mate pair DNA-Bibliothek nach dem „Nextera mate Pair Sample Preparation“-Protokoll mit Fragmentlängen von 300 bp, eine 2 x 150 bp paired-end Sequenzierung mit einem Illumina HiSeq 2500, Basecalling und Demultiplexing mittels CASAVA (Bauer, 2011), Assembly mittels SOAPdenovo2 (Luo et al., 2012) und in silico Annotation mittels Blast2GO (Götz et al., 2008).

Zur Vereinfachung der Genom-Analyse wurden die erhaltenen Scaffolds, wie zuvor bei BOE100, bei IMG hochgeladen (IMG submission ID: 52926, locus tag: PsBOE200).

3.24 Proteinanalyse

Es wurden 2D-Gelelektrophorese-Versuche mit dem Stamm BOE100 durchgeführt. Hierfür wurde das Proteinmuster der löslichen Proteine mit einem *pl* zwischen 4 und 7 von einer Glucose-induzierten Kultur mit dem einer Butoxyethanol-induzierten Kultur verglichen. Außerdem wurden die Membranfraktionen beider Kulturen in einem Gradientengel aufgetragen.

All diese Versuche wurden an der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe von Dr. David Schleheck mit Unterstützung von David Schleheck und Ann-Katrin Felux durchgeführt.

3.24.1 Separieren der löslichen von der Membranfraktion und Proteinfällung

Zwei Schikanekolben mit je einem Liter Minimalmedium wurden mit BOE100 von der Platte inokuliert. Der eine Kolben wurde mit 10 mM Butoxyethanol versetzt, der andere mit 10 mM

Glucose. Die Kulturen wurden auf dem Schüttler bei 30 °C inkubiert, bis eine OD₅₄₆ von 1 bis 1,5 erreicht wurde. Anschließend wurden die Kulturen bei 4 °C und 7000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die Pellets wurden in ca. 10 mL 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8, resuspendiert, in 15 mL-Falcontubes überführt und bei 2 °C und 4300 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 3–4 mL Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 8) resuspendiert. Jede Probe wurde vier Mal mit der French Press bei einem Druck von 20 000 psi aufgeschlossen. Zum Entfernen der Zelltrümmer folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 17 000 g für 15 Minuten. Der Überstand wurde in Röhrchen für die Ultrazentrifuge überführt und in jener bei 4 °C und 70 000 g eine Stunde zentrifugiert. Im Überstand nach der Ultrazentrifugation befand sich die lösliche Proteinfraction, die Membranfraction war im gebildeten Pellet. Die Membranpellets wurden eingefroren und später auf einem Gradientengel aufgetragen (s. Kapitel 3.24.5). Die Proteinkonzentration der löslichen Fraction wurde mit einem Bradfordtest bestimmt (Bradford, 1976). Hierfür wurden 1 mL Bradfordlösung mit 100 µL Probe bzw. Wasser (als Referenz) gemischt und nach 10 Minuten Inkubationszeit die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen (s. Kapitel 3.1). Mit Rinderserumalbumin wurde vorab eine Kalibriergerade erstellt.

Für die Protein-Fällung wurde 1 mg Protein je Probe in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt, das Gefäß mit mindestens dem vierfachen Volumen -20 °C kaltem Aceton aufgefüllt und anschließend über Nacht bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.24.2 Beladen der IPG-Strips und isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Reaktionsgefäße mit den Acetonfällungen wurden bei 4 °C und 17 000 g für 12 Minuten zentrifugiert und der Acetonüberstand vorsichtig abpipettiert. Die Zellpellets wurden zum Trocknen für drei bis vier Stunden unter eine Clean-bench gestellt. Anschließend wurden sie in 350 µL Rehydrierungspuffer resuspendiert, indem die Reaktionsgefäße auf einem Thermomixer bei Raumtemperatur geschüttelt wurden. Nach rund 2 Stunden wurden die Proben in eine Kammer des Rehydrierungs/Equilibrierungs-Trays pipettiert. Je ein IPG-Strip wurde mit der Gelseite nach unten auf der Probe platziert. Verwendet wurden die ReadyStrip IPG Strips, 17 cm, pH 4–7, von Bio-Rad Laboratories, USA. Sie wurden mit Mineralöl überschichtet und über Nacht inkubiert.

Um das Mineralöl zu entfernen, wurden die Strips vorsichtig auf einem Papiertuch abgetropft. Auf die Elektroden des Fokussierungstrays wurden Wicks gelegt und diese mit einem Tropfen deionisierten Wasser befeuchtet. Die IPG-Strips wurden in das Fokussierungstray gelegt und mit Mineralöl überschichtet. Das IEF-Programm DAVID RAPID wurde gestartet (s. Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7 IEF-Programm DAVID RAPID

Zeit		Volt
bis 15 min		250 V
15 bis 30 min	hoch bis	500 V
30 min bis 3 h 30 min	hoch bis	10 000 V
bis 30 kWh		10 000 V
bis Ende		1000 V

3.24.3 Herstellung der Proteingele für die 2D-PAGE

Der Gelgießstand für zwei Proteingele wurde aufgebaut. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 3-8 zu finden. Die vorgekühlten Lösungen wurden auf Eis in einem Erlenmeyerkolben unter Rühren vermengt und das Gel anschließend in die beiden Gelgießstände gegossen. Die Kämme wurden in das Gel gedrückt. Die Polymerisationszeit betrug mindestens zwei Stunden.

Tabelle 3-8 Acrylamidgel 12 %ig für 2 2D-Gele

Stoff	Volumen
PCR-grade Wasser	39 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, inkl. 0,4 % SDS	31 mL
30 % Acrylamid-/Bisacrylamid (37,5:1)	48 mL
TEMED	0,2 mL
10 %iges Ammoniumpersulfat (APS)	0,5 mL

3.24.4 Equilibrierung der IPG-Strips und Start der 2D-Gelelektrophorese

Die IPG-Strips wurden nach der IEF vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Tray geholt und die Nicht-Gelseite an einem Papiertuch abgetupft, um das Mineralöl zu entfernen. Das Rehydrierungs/Equilibrierungstray wurde mit je 6 mL Equilibrierungspuffer I befüllt, die Strips mit der Gelseite nach oben hineingelegt und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Strips in je 6 mL Equilibrierungspuffer II gelegt und erneut 10 Minuten inkubiert.

Die Kämme der Gele wurden gezogen und überschüssige Flüssigkeit mit einem Blotting-Papier entfernt. Die Strips wurden nach der Equilibrierung kurz in TGS-Puffer, 1fach getaucht, um restlichen Equilibrierungspuffer zu entfernen. Die Enden der Strips wurden mit einer Schere abgeschnitten, die verkürzten Strips auf die Gele platziert und mit 0,5 %iger Agaroselösung inklusive Bromphenolblau überschichtet. Nach dem Festwerden der Agarose wurden die Gele in der Elektrophoresekammer positioniert und diese mit TGS-Puffer, 1fach befüllt. Je 10 µL Proteinmarker wurden in die dafür vorgesehenen Tasche pipettiert und die Elektrophorese mit 25 mA bei 8 °C über Nacht durchgeführt.

3.24.5 Gradientengel für die Membranfraktion

Für das Gradientengel wurde auf Eis ein 19%iges und ein 4,9%iges Gel hergestellt (s. Tabelle 3-9). Der Gradientengelmischer wurde derart befüllt, dass sich im vorderen Zylinder das 19%ige, im hinteren das 4,9%ige Gel befand, damit die Acrylamidkonzentration im Gradientengel von oben nach unten zunimmt. Nachdem das Gradientengel gegossen worden war, wurde es mit Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern.

Nach der Polymerisation von etwa zwei Stunden wurde das Isopropanol vorsichtig abgegossen und Reste mit einem Papiertuch entfernt. Das Sammelgel (s. Tabelle 3-9) wurde auf Eis vorbereitet, auf das Gradientengel gegossen und der Kamm hineingedrückt.

Die eingefrorenen Membranfraktionen (s. Kapitel 3.24.1) wurde aufgetaut und in etwa 2 mL 50 mM Tris-HCl, pH 8, resuspendiert, erneut in der Ultrazentrifuge bei 4 °C und 70 000 g 40 Minuten zentrifugiert, 3 x mit Puffer gewaschen und unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Die Waschfraktionen wurden dabei aufbewahrt, um sie auf das Gel aufzutragen. Die Membranpellets wurden anschließend in ca. 1 mL Puffer resuspendiert.

Mit den Membran- und den Waschfraktionen wurde ein Bradfordtest durchgeführt, um die Proteinkonzentration zu bestimmen (s. Kapitel 3.24.1). Etwa 600 µg Protein wurden anschließend mit einem Drittel Volumen SDS-haltigem Auftragspuffer (4 x RotiLoad 1, Carl Roth, Karlsruhe) versetzt und bei 98 °C im Heizblock für mindestens 10 Minuten gekocht.

Das Gradientengel wurde mit den Membran- und Waschfraktionsproben sowie einem Proteinmarker beladen. Die Elektrophorese erfolgte mit 12 mA und Kühlung auf 8 °C über Nacht und wurde gestoppt, sobald die Lauffront das Gelende erreicht hatte.

Tabelle 3-9 Gelzusammensetzung Gradientengel

Stoff	19%iges Gel	4,9%iges Gel	4%iges Sammelgel
PCR-grade Wasser	-	13,14 mL	9,1 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5,75 mL	5,75 mL	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	3,73 mL
30 % Acrylamid-/Bisacrylamid (37,5:1)	14,6 mL	3,75 mL	1,94 mL
Glycerin	2,3 mL	-	-
10 %iges SDS	230 µL	230 µL	150 µL
TEMED	11 µL	11 µL	10 µL
10 %iges APS	110 µL	115 µL	70 µL
Bromphenolblau	Spatelspitze	-	-

3.24.6 Färben und Entfärben der Gele

Nachdem die Bromphenolblaufront die Gelenen erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Die Gele wurden in eine Wanne mit Färbelösung gelegt und in der Mikrowelle kurz leicht aufgekocht. Anschließend wurden sie auf einem Schüttler mit mäßiger Umdrehungszahl noch etwa 5 Minuten weitergefärbt. Die Gele wurden in Entfärbelösung gelegt und weiter geschüttelt. Die Entfärbelösung wurde regelmäßig gewechselt, um das Entfärben zu beschleunigen. Nach ausreichender Entfärbung wurden die Gele ausgewertet.

3.25 Transposonmutagenese

Die Transposonmutagenese-Versuche wurden mit den Stämmen BOE3 und BOE100 durchgeführt. Das Transposon-Plasmid war pCro2a, das von dem *E. coli*-Stamm S17-1 übertragen wurde (Onaca et al., 2007).

Die Versuche zur Transposonmutagenese erstreckten sich über mehrere Arbeitstage:

Arbeitstag 1

Eine 6 Tage alte Flüssigkultur von BOE3, die in MM + BET gewachsen war, wurde erneut mit Substrat versetzt, damit sie sich am Folgetag in der exponentiellen Phase befand, und über Nacht bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Flüssiges MM + 0,1 % BET wurde mit BOE100 angeimpft und über Nacht bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Flüssiges LB wurde mit Kanamycin (Km) und Ampicillin (Amp) versetzt, mit *E. coli* S17-1 pCro2a inokuliert und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Arbeitstag 2

Die Kulturen wurden bei 4 °C und 6 000 g 10 Minuten zentrifugiert, 2 Mal mit steriler Saline gewaschen und in wenigen Millilitern Saline resuspendiert. Die OD₅₄₆ wurde bestimmt. Bei BOE3 wurden pro Mating-Ansatz etwa $3 \cdot 10^9$ Zellen BOE3 zusammen mit etwa $2 \cdot 10^9$ Zellen *E. coli* pCro2a gemeinsam in ein Reaktionsgefäß pipettiert, bei BOE100 wurden etwa 10^9 BOE100-Zellen verwendet. In jeweils zwei Reaktionsgefäße wurde zu Kontrollzwecken ausschließlich BOE3 bzw. BOE100, in zwei weitere ausschließlich *E. coli* pCro2a pipettiert.

Die Reaktionsgefäße wurden 2 Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in je 50 µL Saline resuspendiert. Sterile Filterpapiere wurden auf MM- und, im Falle von BOE3, auch auf LB-Platten platziert. Die Ansätze wurden auf die Filter pipettiert. Die Platten wurden bei 30 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Arbeitstag 3

Die Filter wurden steril in 1,5 mL-Reaktionsgefäße gegeben und 500 µL Saline dazu pipetiert. Um die Zellen von den Filtern zu lösen, wurden die Reaktionsgefäße gevortext.

Die Suspensionen und Verdünnungen davon wurden auf MM + Km + Acetat (Ac)- oder auf MM + Km + Glc-Platten ausplattiert.

Je 100 µL der *E. coli*-Suspensionen wurden auf MM + Km + Ac/Glc (Negativkontrolle) sowie LB + Km + Amp (Positivkontrolle) ausplattiert und je 100 µL der BOE3- und der BOE100-Suspensionen auf MM + Km + Ac/Glc (Negativkontrolle) sowie MM + BET (Positivkontrolle). Die Platten wurden bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

Screening der Mutanten

Einzelkolonien der Mutanten wurden mit sterilen Zahnstochern sowohl auf gerasterte MM + Km + Ac/Glc- als auch auf gerasterte MM + Km + BES/BET-Platten überimpft. Nach Inkubation bei 30 °C im Brutschrank wurden die BES/BET-Platten nach wachstumsgehemmten bzw. wachstumsdefiziten Mutanten gescreent. Die zugehörige Mutante wurde anschließend für weitere Untersuchungen auf eine frische MM + Km + Ac/Glc-Platte überimpft.

3.26 Identifizierung der inaktivierten Gene

Die Identifizierung der Gene, die durch die Insertion von Transposons inaktiviert worden sind, erfolgte durch zwei unterschiedliche Methoden, die in den nachfolgenden Unterkapiteln beschrieben werden: zum einen die Restriktion, Selbstligation und Klonierung betroffener DNA-Abschnitte (Kapitel 3.26.1), zum anderen die inverse PCR (Kapitel 3.26.2).

3.26.1 Restriktion, Selbstligation und Klonierung

Zur Identifizierung der in den knock-out Mutanten inaktivierten Gene wurde die DNA isoliert und mit einem Restriktionsenzym, das nicht in die Transposon-Sequenz schneidet, für 60–90 Minuten bei 37 °C verdaut. Nach Aufreinigung mit einem Kit (s. Kapitel 3.17) wurde die verdaute DNA mittels T4 DNA Ligase im Kühlschrank über Nacht zirkularisiert, die Ligase am Folgetag bei 65 °C 5 Minuten inaktiviert. Die Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes ist in Tabelle 3-10 dargestellt, die eines Ligationsansatzes in Tabelle 3-11. Die verwendeten Enzyme stammten von Fermentas (USA) bzw. Thermo Scientific (USA).

Tabelle 3-10 Restriktionsansatz

DNA	Puffer 10x	Enzym	dH ₂ O
0,5–1 µg	2 µL	10–20 U	ad. 20 µL

Tabelle 3-11 Ligationsansatz Selbstligation

DNA	Puffer 10x	Ligase	dH ₂ O
50–100 ng	5 µL	5 U	ad. 50 µL

Der Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation (s. Kapitel 3.21.1) in *E. coli* JM109 transformiert. Zur Selektion wurden die Transformationsansätze auf LB + Km ausplattiert. Da das Insert von pCro2a, das bei der Transposonmutagenese übertragen worden ist, einen Replikationsursprung sowie ein Kanamycin-Resistenzgen aufwies, konnte das durch die Selbstligation erhaltene Plasmid, das das Transposon sowie die Sequenzbereiche up- und downstream beinhaltet, in *E. coli* replizieren und der Klon somit auf Kanamycin-haltigen Platten aufwachsen.

Das Plasmid wurde im Anschluss isoliert und durch GATC Biotech AG (Konstanz) mit den Primern s4052 und s4037 sequenziert. Bei größeren Plasmiden wurden zur Sequenzierung des gesamten Plasmids anhand der bereits erhaltenen DNA-Sequenzen weitere Sequenzierungsprimer designt (Primerwalking). Tabelle 3-12 gibt Aufschluss über die Primer, die hierfür verwendet wurden.

Tabelle 3-12 Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz	Verwendung
s4052	catcattcacaagcgaagt	outside Tn5-Insert pCro2a
s4037	gttccgcttccttagcag	
1316-F	agcaatggcttgcaactatcc	Primerwalking Mutante P13 F16
1316-R	tggagtaatccaccgaaggt	
1316-F2	agtgctcgaagaaggcag	
1316-R2	gctcaagcgcttctactgct	
pM305-PW1	tgaccatcagacgaatg	Primerwalking Mutante M305
pM305-PW2	tggcacaggaaatgcag	
pM305-PW3	ctacaacgcctccaagg	
pM305-PW4	tctccgggtgaagatg	
pM305-PW5	tattcctggccgatgtt	
pM305-PW6	tcagcttgatgtagcc	
pM305-PW7	agcaactgatcgctctg	
pM305-PW8	tgaatgtcccattgtcg	
pM305-PW9	agttccggtggaatgac	
pM305-PW10	gcatgaattccagcaca	

3.26.2 Inverse PCR

In manchen Fällen erwies sich die Transformation der zirkularisierten DNA als schwierig, weswegen inverse PCR (iPCR) angewendet wurde, um herauszufinden, welches Gen bei der Transposonmutagenese inaktiviert worden war. Dazu wurde die DNA der Mutanten isoliert und anschließend mit einem Restriktionsenzym verdaut. Die verdaute DNA wurde mit T4 DNA Ligase zirkularisiert. Die Zusammensetzungen der Restriktions- und Ligationsansätze entsprachen denen der Selbstligation und sind in Tabelle 3-10 bzw. Tabelle 3-11 zu finden.

Mit den Primern s4052 und s4037, die von der Transposon-Sequenz nach außen zeigen, wurde eine PCR durchgeführt, um den Bereich der unbekannt Sequenzen neben dem Insert zu amplifizieren. Diese PCR-Proben wurden im Agarosegel analysiert, mit dem DNA Clean & Concentrator-Kit (Zymo Research, USA) aufgereinigt und das Amplifikat zusammen mit dem Primer s4052 oder s4037 zur Sequenzierung zu GATC Biotech AG (Konstanz) geschickt.

Diese Technik wurde bei BOE3 auch mit der DNA des Wildtyps angewendet, um zusätzliche DNA-Bereiche zu sequenzieren. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 3-13 dargestellt.

Tabelle 3-13 iPCR-Primer BOE3

Primer	Sequenz
B3PW1_Eco-F	aagacgccggtcgaaac
B3PW1-R	ttggccaccccaaattc
B3PW2-F	tgatcccaggcgctgt
B3PW2-R	cgatgaagcggggttg
B3PW3-F	catcctcaagctgctggtg
B3PW3-R	cgccgcatcgatgttct

3.27 Genexpressionsanalyse BOE200

Um die Butoxyethanol-Abbaugene in BOE200 zu identifizieren, wurde durch das Fraunhofer IGB eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Das Transkriptom von BOE200 im BET-induzierten Zustand wurde mit dem Transkriptom von BOE200 im Glc-induzierten Zustand verglichen, um festzustellen, welche Gene in BOE200 beim Abbau von Butoxyethanol hochreguliert wurden.

Gefrorene Zellpellperlen (-80 °C) von je 3 BET- und 3 Glc-induzierten BOE200-Kulturen wurden dem IGB zur Verfügung gestellt. Daraus wurde die mRNA isoliert und insgesamt 6 cDNA-Bibliotheken zur Sequenzierung der Transkriptome nach einem modifizierten "Tru-

Seq RNA Sample Preparation"-Protokoll erstellt. Es folgte eine 1 x 50 bp single-end Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken mit einem Illumina HiSeq 2500, das Mapping der RNA-Seq Reads auf das Referenzgenom von BOE200, die Quantifizierung gemappter Reads und eine differenzielle Genexpressionsanalyse.

3.28 Überexpression in *P. putida* KT2440

Die Ergebnisse der Transposonmutagenese-Versuche bei BOE3 (s. Kapitel 3.254.15) sowie der Genexpressionsanalyse bei BOE200 (s. Kapitel 4.16) ließen den Schluss zu, dass das Gen *egeA* bzw. die Gene *egeA*, *egeB* und *egeC* für die Etherspaltung verantwortlich waren. Zur Verifizierung wurden besagte Gene in *Pseudomonas putida* KT2440 überexprimiert. KT2440 wurde als Expressions-Host gewählt, da dieser und der Stamm *P. Vancouverensis* BOE200 nahe verwandt sind. Diese Verwandtschaft erleichtert die Expression von Fremdgenen, da davon auszugehen war, dass sich Codon-Usage und Promotor-Strukturen ähneln innerhalb beider Stämme. Ein alternativer Expressions-Host wäre ein *E. coli*-Stamm, beispielsweise *E. coli* BL21. Allerdings hat sich gezeigt, dass eine Expression von *Pseudomonas*-Genen in *E. coli* zu Schwierigkeiten führen kann, was ein weiterer Grund war, *P. putida* KT2440 einzusetzen (Brunschwig & Darzins, 1992; Watson et al., 1996).

Das Plasmid pCom10 wurde als Expressionsplasmid verwendet, da es sowohl in *E. coli* als auch in *Pseudomonas* sp. funktional ist (Smits et al., 2001). Die Überexpression der inserierten Gene untersteht dem *PalkB*-Promotor und lässt sich (u. a.) durch Dicyclopropylketon (DCPK) induzieren (Staijen et al., 1999).

3.28.1 Die Konstruktion der Expressionsplasmide

Es wurden zwei unterschiedliche Expressions-Vektoren konstruiert. Zum einen das Plasmid pCom10.egeA(P), bei dem ausschließlich das Gen *egeA*(P) in pCom10 kloniert wurde, zum anderen das Plasmid pCom10.egeABC(P), bei dem auch die nachfolgenden beiden Gene *egeB*(P) und *egeC*(P) integriert wurden (s. Abbildung 3.1).

Die Inserts der Expressionsplasmide wurden mittels PCR generiert. Verwendet wurden die Primer FAH_Ex_EcoRI-F und FAH_Ex_BamHI-R (pCom10.egeA(P)) bzw. FAH_Ex_EcoRI-F und FAH_PDeI_B-R (pCom10.egeABC(P)). Die Sequenzen der Primer stehen in Kapitel 3.19, Tabelle 3-5. Bei der PCR kam die Phusion high fidelity polymerase zum Einsatz (s. Kapitel 3.19, Tabelle 3-4). Für beide Inserts wurden zwei 40 µL-Ansätze hergestellt, um bei der PCR zwei unterschiedliche Annealing-Temperaturen (66 °C und 68 °C) zu testen. Die Elongationszeit betrug 1 Minute.

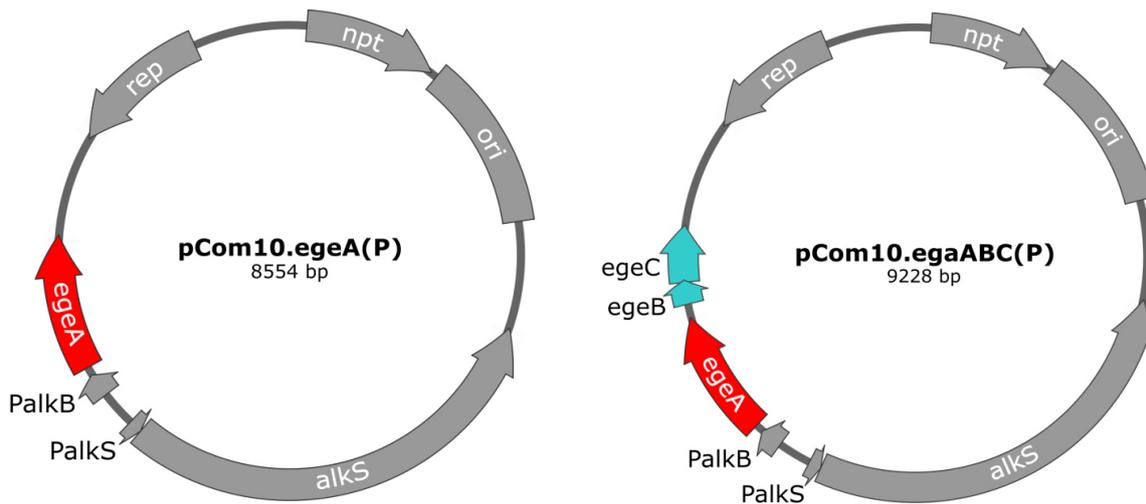


Abbildung 3.1 Plasmidkarten der Expressionsplasmide

Links: Das Plasmid pCom10.egeA(P). Das Gen *egeA* aus dem Stamm BOE200 wurde in den Vektor pCom10 kloniert. Rechts: Das Plasmid pCom10.egeABC(P). Der DNA-Bereich, der die Gene *egeA*, *egeB* und *egeC* aus dem Stamm BOE200 umfasst, wurden in den Vektor pCom10 kloniert.

Da bei beiden Annealing-Temperaturen im Agarosegel ein Amplifikat zu sehen war (s. Kapitel 4.19.1, Abbildung 4.34), wurden die Ansätze vereinigt und mit dem DNA Clean & Concentrator-5-Kit (Zymo Research, USA) aufgereinigt. Im Anschluss erfolgte die Restriktion sowohl der aufgereinigten Amplifikate als auch des Plasmids pCom10. Ein Restriktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen: 30 μL DNA, 8 μL Tango-Puffer, 1 μL BamHI, 1 μL EcoRI (je 10 U/ μL ; Thermo Scientific, USA). Diese Ansätze wurden 90 Minuten bei 37 °C inkubiert, dann mit dem DNA Clean & Concentrator-5-Kit (Zymo Research, USA) aufgereinigt.

Die Ligationsansätze beinhalteten 58 ng Vektor-DNA, einen etwa 3-fachen molaren Überschuss Insert-DNA (bei pCom10.egeA(P) 22 ng, bei pCom10.egeABC(P) 36 ng), 2 μL Ligase-Puffer und 1 U Ligase (Thermo Scientific, USA) bei einem Gesamtvolumen von 20 μL . Die Ansätze wurden über Nacht im Kühlschrank inkubiert, die Ligase anschließend bei 65 °C 5 Minuten inaktiviert.

Der Stamm *E. coli* NEB5- α wurde mittels Elektroporation mit den Ligationsansätzen transformiert (s. Kapitel 3.21.1). Die Selektion erfolgte auf LB + Km-Platten. Klone mit dem gesuchten Plasmid wurden durch Colony-PCR (s. Kapitel 3.22) identifiziert. Die Plasmide wurden aus Übernachtskulturen der Klone mit dem Kit Roti-Prep Plasmid MINI (Carl Roth, Karlsruhe) isoliert (Elution in PCR-Wasser). Zur Verifizierung der korrekten Sequenz wurde die Insert-Region durch die Firma Seqlab GmbH (Göttingen) sequenziert. Im letzten Schritt wurden die Plasmide pCom10.egeA(P) und pCom10.egeABC(P) mittels Elektroporation in *P. putida* KT2440 transformiert (s. Kapitel 3.21.2).

3.28.2 Überexpression der Gene *egeA* bzw. *egeABC*

Der (vermutete) Abbau von Butoxyethanol verläuft über die Oxidation der Hydroxylgruppe zur Carboxylgruppe, wobei Butoxyessigsäure entsteht, mit anschließender Spaltung des Ethers. Bei diesem Schritt entsteht der Metabolit *n*-Butanol (BOH) (s. Kapitel 4.8). Der Stamm *P. putida* KT2440 kann weder mit BET noch mit BES wachsen, wohl aber mit BOH (Simon et al., 2015).

Wird das für die Etherspaltung verantwortliche Gen (bzw. werden die für die Etherspaltung verantwortlichen Gene) in *P. putida* KT2440 transformiert und exprimiert, wird dieser Stamm in der Lage sein mit BES zu wachsen. Wachstum von KT2440 mit BES ist demnach gleichbedeutend mit Aktivität des (oder der) Etherspaltungsenzyme(s).

Bei den Überexpressionsversuchen wurden folgende Stämme verwendet:

- P. putida* KT2440 WT (Wildtyp, ohne Plasmid) (Negativkontrolle)
- P. putida* KT2440 pCom10.*egeA*(P)
- P. putida* KT2440 pCom10.*egeABC*(P)

Von jedem Stamm wurde eine Vorkultur in LB (+ ggf. Km) hergestellt. Der eigentliche Versuch fand eine Woche später statt. Diese relativ lange Periode zwischen Ansetzen der Vorkultur und Versuchsdurchführung wurde gewählt, da verhindert werden sollte, dass die Stämme Speicherstoffe akkumulieren, die bei Energieerzeugung (z. B. bei der Umsetzung von Butoxyethanol zu Butoxyessigsäure) verstoffwechselt werden und somit ein falsch-positives Ergebnis liefern würden (geschehen in einem Vorversuch, Ergebnisse nicht dargestellt).

Insgesamt 6 Kolben à 50 mL MM (+ ggf. Km) wurden verwendet. Pro Stamm wurden zwei unterschiedliche Kulturen angesetzt:

- A) MM + 0,05 % v/v BES + 0,05 % v/v DCPK + ggf. Km
- B) MM + 0,05 % v/v BET + 0,05 % v/v DCPK + ggf. Km

Es wurde jeweils mit 5 mL der Vorkultur angeimpft und auf diese Weise eine Start-OD₅₄₆ von etwa 0,1 eingestellt. Eine Etherverbindung, entweder Butoxyessigsäure oder Butoxyethanol, war die einzige Kohlenstoffquelle in diesem Versuch. Nur bei erfolgreicher Spaltung des Ethers konnte Wachstum erfolgen. Der Verlauf der Überexpression wurde durch regelmäßiges Messen der OD₅₄₆ überwacht. Nach Beendigung des Versuches wurden die Kulturüberstände mit Dichlormethan extrahiert und im GC-MS analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Butoxyethanol abbauende Reinstämme

Es konnten 13 Reinstämme isoliert werden, die Butoxyethanol abbauen. Ein BOX-PCR-Fingerprinting wurde durchgeführt, um die Verschiedenheit der Stämme zu überprüfen (s. Kapitel 3.4). Hierbei wird ein für jeden Stamm charakteristisches Bandenmuster erzeugt. Haben mehrere Stämme dasselbe Muster, handelt es sich um denselben Stamm.

Das Agarosebild der BOX-PCR ist in Abbildung 4.1 zu sehen. Es war klar zu erkennen, dass sowohl die Bandenmuster von BOE4 und BOE8 als auch die von BOE7 und BOE11 übereinstimmen. Folgerichtig wurden 11 unterschiedliche Bakterienstämme erhalten: BOE1, BOE2, BOE3, BOE4 (= BOE8), BOE5, BOE6, BOE7 (= BOE11), BOE10, BOE100, BOE200 und BOE300.

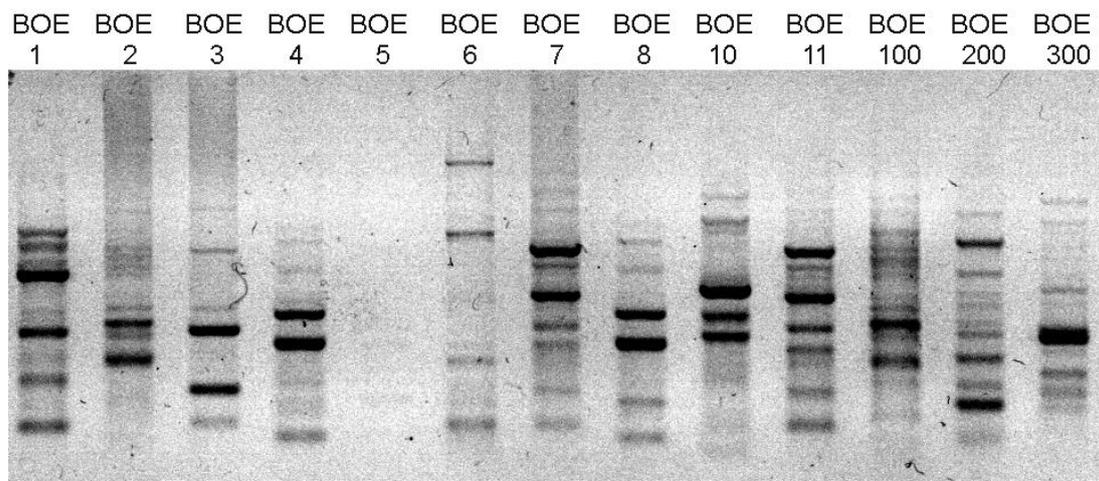


Abbildung 4.1 Gelbild BOX-PCR-Fingerprinting

Mit den isolierten Butoxyethanol abbauenden Stämmen wurde ein BOX-PCR-Fingerprinting durchgeführt und die Amplifikate in einem Agarosegel aufgetrennt. Das Bandenmuster von BOE4 ist dasselbe wie das von BOE8, das von BOE7 ist dasselbe wie das von BOE11. Es wurden demnach 11 verschiedene Reinstämme erhalten: BOE1, BOE2, BOE3, BOE4, BOE5, BOE6, BOE7, BOE10, BOE100, BOE200 und BOE300.

Die Identifizierung der Butoxyethanol-Abbauer erfolgte über die Analyse der 16S rRNA-Sequenz (s. Kapitel 3.4). Diese Sequenzen sind zum einen in Anhang 7.1 zu finden, zum anderen wurden sie bei GenBank hinterlegt. Die GenBank accession numbers lauten MH580159 für die 16S rRNA-Gensequenz von BOE1 sowie MH580208–MH580217 für die der Stämme BOE2, BOE3, BOE4, BOE5, BOE6, BOE7, BOE10, BOE100, BOE200 und BOE300.

Ergebnisse

Bei der 16S-rRNA-Gensequenz von BOE10 stimmten 1384 von 1403 Basen mit der Nukleotidsequenz von *Pseudomonas japonica* strain NBRC 103040 überein, was einem Prozentsatz von nur 98,6 % entspricht. Wegen dieser verhältnismäßig geringen Ähnlichkeit wurde auf die genaue Bestimmung der Spezies verzichtet und der Stamm als *Pseudomonas* sp. BOE10 angegeben.

Tabelle 4-1 zeigt eine Übersicht über die isolierten Butoxyethanol verwertenden Stämme und das jeweilige für die Anreicherung eingesetzte Inokulum.

Tabelle 4-1 BOE-Stämme

Stamm	Inokulum
<i>Pseudomonas knackmussii</i> BOE1	Waldboden, Stuttgart-Büsnau
<i>Pseudomonas putida</i> BOE2	Waldboden, Stuttgart-Büsnau
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> BOE3	Waldboden, Stuttgart-Büsnau
<i>Pseudomonas umsongensis</i> BOE4	Waldboden, Stuttgart-Büsnau
<i>Gordonia terrae</i> BOE5	Technikumsreaktor ISWA, Stuttgart
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> BOE6	Technikumsreaktor ISWA, Stuttgart
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> BOE7	Belebtschlamm Raffinerie-Kläranlage, Karlsruhe
<i>Pseudomonas</i> sp. BOE10	Belebtschlamm Raffinerie-Kläranlage, Karlsruhe
<i>Pseudomonas putida</i> BOE100	Biowäscher, Rastatt
<i>Pseudomonas vancouverensis</i> BOE200	Biowäscher, Rastatt
<i>Cupriavidus oxalaticus</i> BOE300	Belebtschlamm LFKW, Stuttgart

Abbildung 4.2 zeigt den phylogenetischen Baum, der unter Verwendung der ermittelten 16S rRNA-Gensequenzen der BOE-Stämme sowie den öffentlich zugänglichen Sequenzen der verwandten Type-strains *P. putida* DSM 291^T (Z76667), *P. plecoglossicida* FPC951^T (AB009457), *P. alkylphenolica* KL28^T (AY324319), *P. japonica* WL^T (AB126621), *P. knackmussii* B13^T (HM007154), *P. vancouverensis* DhA-51^T (AJ011507), *P. umsongensis* Ps 3-10^T (AF468450), *P. extremaustralis* CT14-3^T (AJ583501), *Hydrogenophaga pseudoflava* GA3^T (AF078770), *Cupriavidus oxalaticus* NBRC 13593^T (AB680453) und *Gordonia terrae* DSM 43249^T (X79286) mit dem Programm MEGA7 erstellt wurde (s. Kapitel 3.4) (GenBank accession number in Klammern).

Die Identifizierung der am Abbau von Butoxyethanol beteiligten Enzyme beschränkte sich in dieser Arbeit auf die Stämme BOE3, BOE100 und BOE200.

Ergebnisse

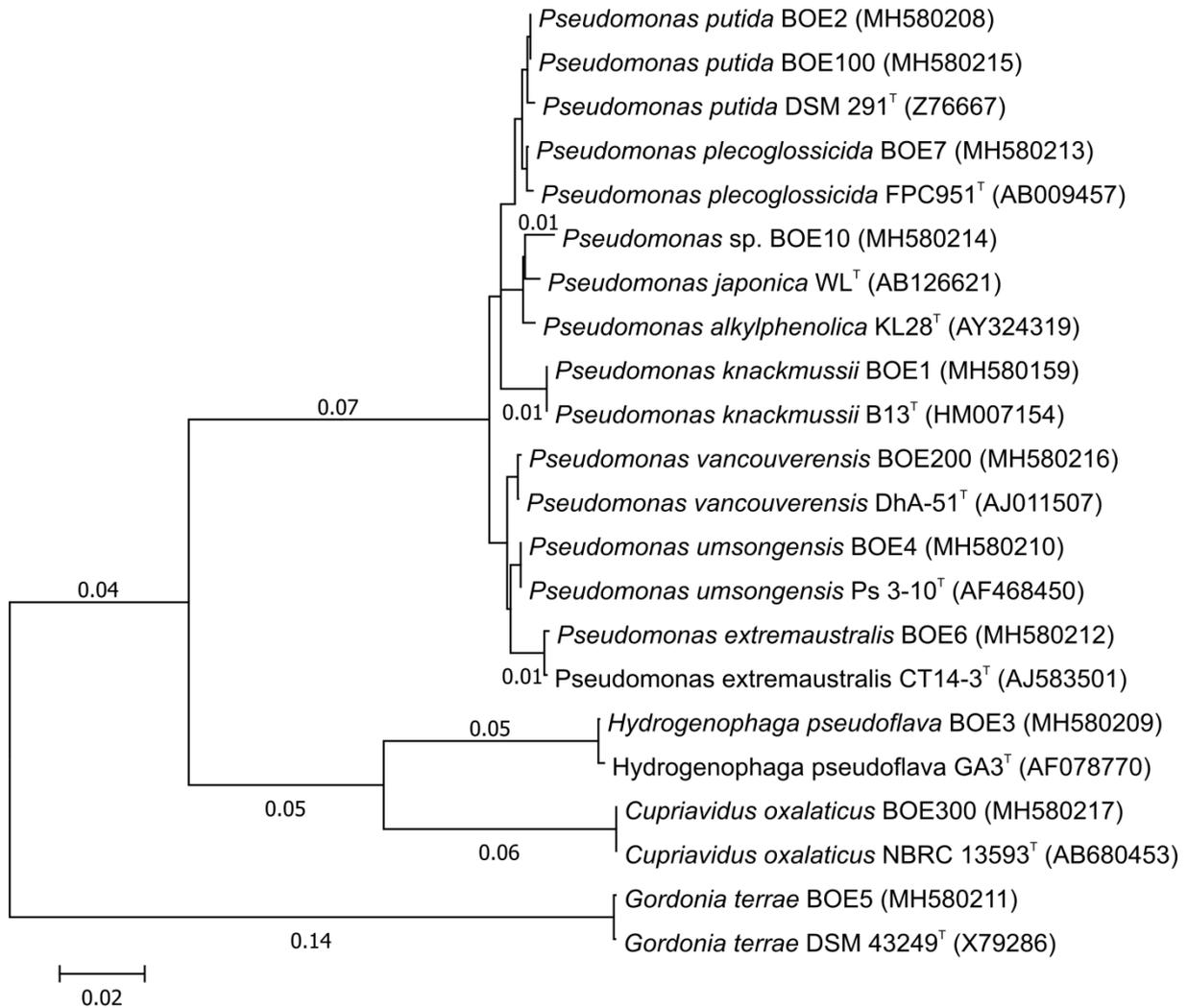


Abbildung 4.2 Phylogenetischer Baum

Der phylogenetische Baum zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse unter den isolierten BOE-Stämmen und verwandten Type-strains (T) auf Grundlage der 16S rRNA-Gensequenzen. In Klammern stehen die GenBank accession numbers der verwendeten Sequenzen. Der Baum wurde mit dem Programm MEGA7 mittels der Neighbor-Joining-Methode erstellt (Saitou & Nei, 1987; Kumar et al., 2016). Die evolutionären Abstände wurden mit der Maximum Composite Likelihood-Methode berechnet (Tamura et al., 2004). Der finale Datensatz umfasste 1265 Positionen.

4.2 Untersuchungen der klassischen Mikrobiologie

Die Koloniemorphologien der isolierten BOE-Stämme sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst. Die *Pseudomonas*-Stämme unter den Butoxyethanol-Abbauern ähnelten sich stark im Aussehen der Kolonien (BOE1, BOE2, BOE4, BOE6, BOE7, BOE10, BOE100 und BOE200). In Abbildung 4.3 sieht man Fotografien der BOE-Stämme auf Minimalmediumplatten, gewachsen mit dem Substrat Butoxyethanol.

Mit der TCA-3.0C Mikroskopkamera von Tuscon wurden die Zellen bei 1000facher Vergrößerung fotografiert. Die Bilder sind in Abbildung 4.4 zu sehen.

Ergebnisse

Tabelle 4-2 Koloniemorphologie BOE-Stämme

Stamm	Farbe	Form	Rand	Glanz	Profil
BOE1	beige	kreisförmig	wellig	glänzend	flach
BOE2	beige	kreisförmig	wellig	glänzend	flach
BOE3	gelb	unregelmäßig	gesägt	glänzend	flach
BOE4	beige	kreisförmig	wellig	glänzend	flach
BOE5	rosa	unregelmäßig	glatt	glänzend	erhaben
BOE6	beige	kreisförmig	wellig	glänzend	flach
BOE7	beige	kreisförmig	wellig	glänzend	flach
BOE10	beige	kreisförmig	wellig	glänzend	flach
BOE100	beige	kreisförmig	wellig	glänzend	flach
BOE200	beige	kreisförmig	wellig	glänzend	flach
BOE300	weiß/beige	kreisförmig	wellig	glänzend	flach

Bei allen Pseudomonaden handelt es sich um stäbchenförmige Zellen. Auch *Hydrogenophaga pseudoflava* BOE3 ist stäbchenförmig, die Zellen sind jedoch etwas kleiner als die der *Pseudomonas*-Stämme. Die Zellen von *Cupriavidus oxalaticus* sind kokkoide Stäbchen. *Gordonia terrae* BOE5 bildet kurze Stäbchen aus und es hängen immer mindestens zwei Zellen aneinander.

Zur Stamm-Charakterisierung wurden diverse Schnelltests durchgeführt (s. Kapitel 3.6). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-3 dargestellt. Alle 11 Stämme waren sowohl Oxidase- als auch Katalase-positiv. Mit Ausnahme von BOE5 zeigten alle eine positive Reaktion bei den gram-Tests mit Aminopeptidase bzw. KOH, was bedeutet, dass es sich um gram-negative Stämme handelt.

Tabelle 4-3 Ergebnisse Schnelltests

Stamm	Oxidase	Katalase	Aminopeptidase	KOH
BOE1	+	+	+	+
BOE2	+	+	+	+
BOE3	+	+	+	+
BOE4	+	+	+	+
BOE5	+	+	-	-
BOE6	+	+	+	+
BOE7	+	+	+	+
BOE10	+	+	+	+
BOE100	+	+	+	+
BOE200	+	+	+	+
BOE300	+	+	+	+

Ergebnisse

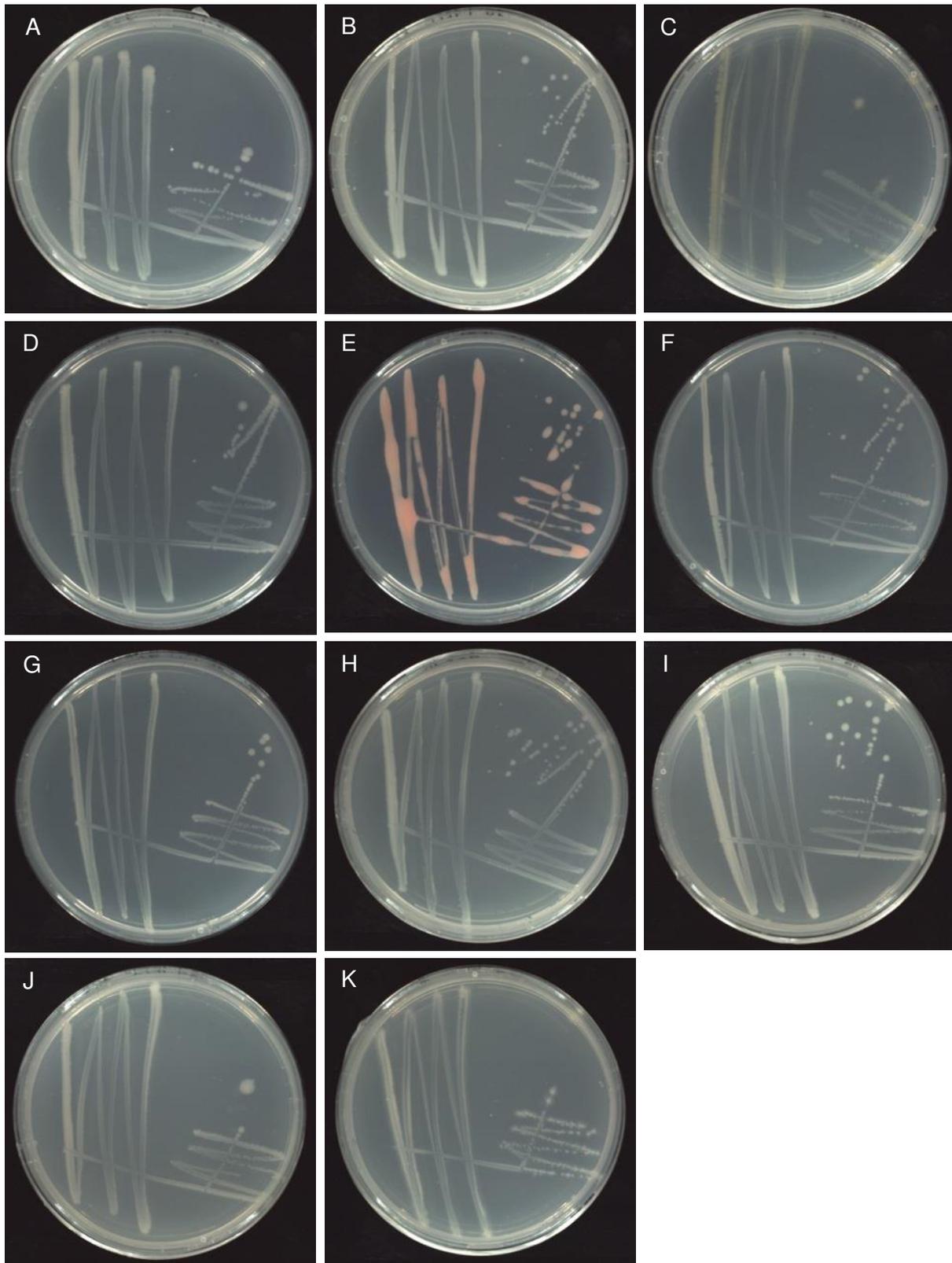


Abbildung 4.3 BOE-Stämme

Zu sehen sind die BOE-Stämme auf MM + BET-Platten. A: *Pseudomonas knackmussii* BOE1, B: *Pseudomonas putida* BOE2, C: *Hydrogenophaga pseudoflava* BOE3, D: *Pseudomonas umsongensis* BOE4, E: *Gordonia terrae* BOE5, F: *Pseudomonas extremaustralis* BOE6, G: *Pseudomonas plecoglossicida* BOE7, H: *Pseudomonas* sp. BOE10, I: *Pseudomonas putida* BOE100, J: *Pseudomonas vancouverensis* BOE 200, K: *Cupriavidus oxalaticus* BOE300

Ergebnisse

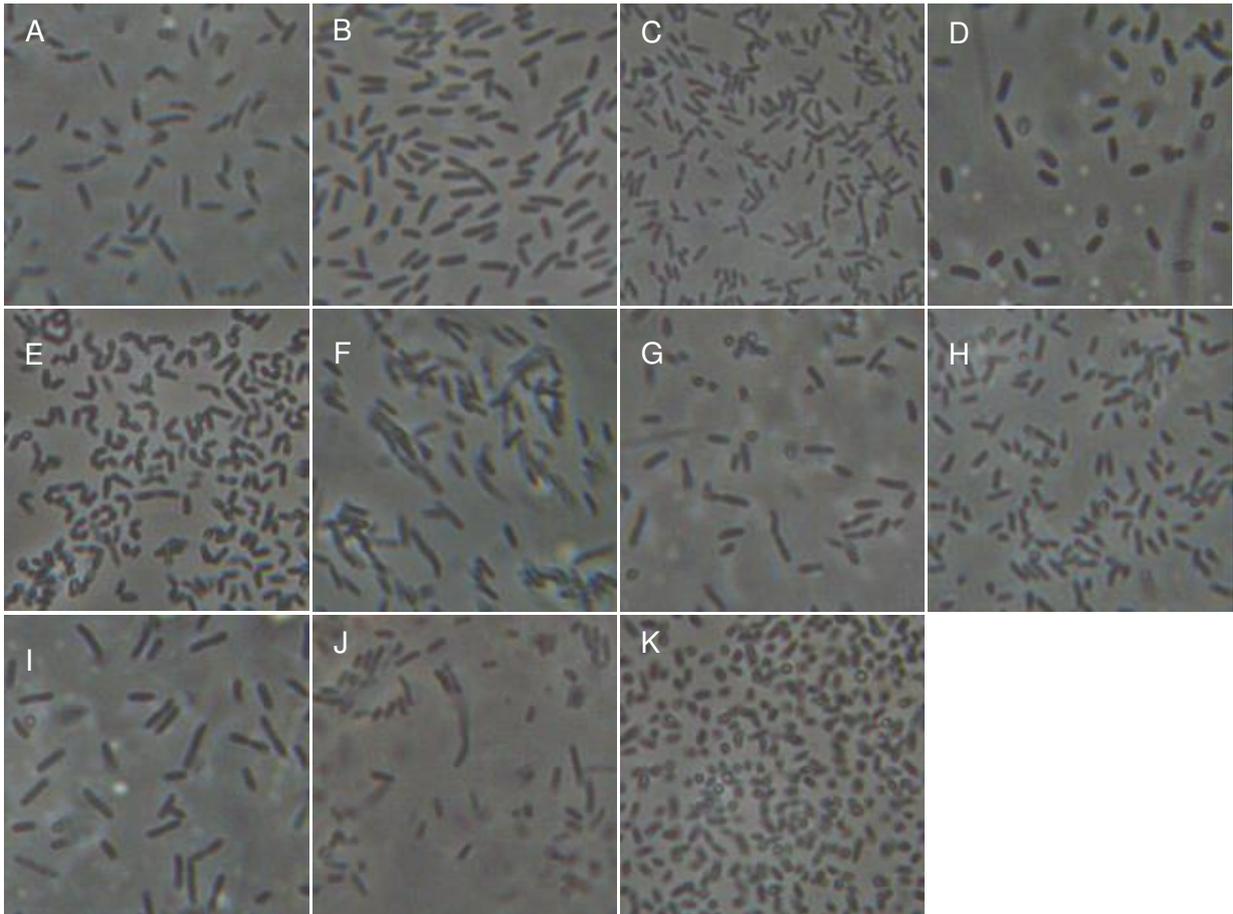


Abbildung 4.4 Zellmorphologie BOE-Stämme

Die BOE-Stämme wurden in 1000-facher Vergrößerung im Phasenkontrast mikroskopiert. A: *P. knackmussii* BOE1, B: *P. putida* BOE2, C: *H. pseudoflava* BOE3, D: *P. umsongensis* BOE4, E: *Gordonia terrae* BOE5, F: *P. extremaustralis* BOE6, G: *P. plecoglossicida* BOE7, H: *Pseudomonas* sp. BOE10, I: *P. putida* BOE100, J: *P. vancouverensis* BOE200, K: *Cupriavidus oxalaticus* BOE300

4.3 OD₅₄₆-KBE-Verhältnis

Für die Transposonmutagenese-Experimente war es wichtig zu wissen, in welchem Verhältnis OD₅₄₆ und KBE zueinander stehen, damit man definierte Zellkonzentrationen einstellen konnte (s. Kapitel 3.25). Um die Korrelation zwischen optischer Dichte und koloniebildenden Einheiten zu ermitteln, wurde die OD₅₄₆ einer Flüssigkultur, die sich in der exponentiellen Phase befand, gemessen, Verdünnungsreihen davon ausplattiert und nach Inkubation bei 30 °C für 2–5 Tage die Kolonien ausgezählt. Für die Berechnung wurden ausschließlich Platten verwendet, bei denen die Anzahl der Kolonien zwischen 20 und 200 lag. Die Ermittlung erfolgte stets in Mehrfachbestimmung.

Für BOE100 ergab sich ein Mittelwert von $0,6 \cdot 10^9$ KBE/mL bei einer OD₅₄₆ von 1, bei BOE3 waren es $1,4 \cdot 10^9$ KBE/mL.

4.4 Salztoleranz

Es wurde untersucht, ob die Stämme BOE3, BOE100 und BOE200 in MM mit einer Salzkonzentration von 3,5 % wachsen können, was der Salinität von Meerwasser entspricht. Hierfür wurde deren Wachstum in flüssigem Minimalmedium mit 5 mM Butoxyethanol und Zugabe von 3,5 % NaCl verfolgt. Die OD_{546} wurde regelmäßig gemessen, um das Wachstum beurteilen zu können. Die Wachstumsverläufe sind in Abbildung 4.5 dargestellt, die gemessenen OD-Werte sind im Anhang in Tabelle 7-1 zu finden. Die Durchführung erfolgte in Dreifachbestimmung.

Es stellte sich heraus, dass sowohl BOE3 als auch BOE200 nicht bei 3,5 % NaCl mit BET wachsen konnten, Wachstum erfolgte ausschließlich in MM + BET ohne Zugabe von Salz. Diese beiden Stämme tolerieren demnach keine marine Salzkonzentration im Medium. BOE100 hingegen war in der Lage sich bei einer Salzkonzentration von 3,5 % zu vermehren. Die Adaptionsphase belief sich allerdings auf ca. 1,5 Tage, erst dann konnte eine deutliche OD-Steigerung wahrgenommen werden.

Im Anschluss wurde mit BOE100 ein weiterer Versuch durchgeführt mit 4 % und 5 % NaCl im Medium. Hierbei zeigte sich, dass BOE100 bei Zugabe von 4 % Salz wachsen konnte, die OD_{546} stieg von 0,22 zu Beginn auf 0,82 nach 7 Tagen. Bei 5 % NaCl fand hingegen kein Wachstum mehr statt.

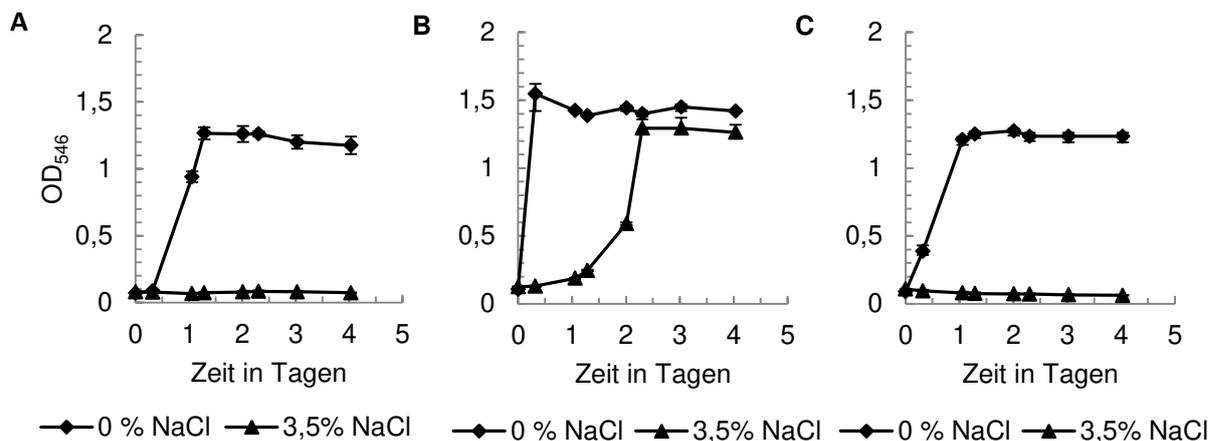


Abbildung 4.5 Salztoleranz BOE-Stämme

Das Wachstum von **A**: BOE3, **B**: BOE100 und **C**: BOE200 mit 5 mM BET in MM mit Zusatz von 0 % bzw. 3,5 % NaCl wurde in Dreifachbestimmung untersucht. BOE3 und BOE200 wuchsen ausschließlich in dem salzfreien Medium. BOE100 hingegen zeigte bei 3,5 % NaCl Wachstum, wenn auch um ca. 1,5 Tage verzögert im Vergleich zum Wachstum im salzfreien MM.

4.5 Antibiotikaresistenz

Je 100 µL der Stämme BOE100, BOE200 und *E. coli* S17-1 wurden auf LB-Platten und dasselbe Volumen von BOE3 auf MM + BET-Platten ausplattiert, die Platten in Sektoren geteilt, in jeden Sektor ein steriles Filterpapier platziert und auf den Filter eine definierte Menge Antibiotikallösung pipettiert. Die Platten wurden bei 30 °C für 1–5 Tage inkubiert und im Anschluss der Durchmesser der Hemmhöfe inklusive Filterpapier gemessen (s. Tabelle 4-4).

Tetracyclin war gelöst in 70 %igem Ethanol, Chloramphenicol in Methanol. Um auszuschließen, dass diese Alkohole einen hemmenden Effekt auf das Bakterienwachstum haben, wurde der Test auch mit diesen Alkoholen durchgeführt. Dabei wurde dasselbe Volumen verwendet wie bei den entsprechenden Antibiotika-Lösungen (2 µL; s. Tabelle 4-4).

Die Stämme BOE100 und BOE200 zeigten Resistenzen gegen Ampicillin und Penicillin, der Stamm S17-1 gegen Streptomycin. BOE3 war gegen keines der getesteten Antibiotika resistent und es bildeten sich größere Hemmhöfe als bei den anderen Stämmen. Die Alkohole hatten keinen hemmenden Einfluss auf das Bakterienwachstum, die Hemmung durch Chloramphenicol bzw. Tetracyclin erfolgte ausschließlich durch die Antibiotika.

Tabelle 4-4 Antibiotika-Resistenztest

Antibiotikum/ Alkohol	c(Lsg)	V(Lsg)	Masse	Durchmesser des Hemmhofs			
				BOE100	BOE200	BOE3	S17-1
Chloramphenicol	34 g/L	2 µL	64 µg	12 mm	17 mm	32 mm	23 mm
Tetracyclin	6 g/L	2 µL	12 µg	19 mm	25 mm	38 mm	20 mm
Kanamycin	20 g/L	2,5 µL	50 µg	22 mm	24 mm	60 mm	16 mm
Ampicillin	10 g/L	5 µL	50 µg	-	-	38 mm	13 mm
Penicillin	10 g/L	5 µL	50 µg	-	-	40 mm	11 mm
Streptomycin	10 g/L	5 µL	50 µg	16 mm	20 mm	58 mm	-
Nalidixinsäure	10 g/L	5 µL	50 µg	14 mm	22 mm	60 mm	13 mm
Ethanol	70 %	2 µL	-	-	-	-	-
Methanol	100 %	2 µL	-	-	-	-	-

Die Stämme BOE100, BOE200 und S17-1 wurden auf LB-Platten, der Stamm BOE3 auf MM + BET-Platten ausplattiert. Die Platten wurden in Sektoren eingeteilt, ein Filterpapier in jeden Sektor platziert und das in Spalte „V(Lsg)“ angegebene Volumen einer Antibiotikumlösung auf den jeweiligen Filter pipettiert. Die Antibiotikum-Konzentrationen der Lösungen sind in Spalte „c(Lsg)“ wiedergegeben, die daraus resultierende Masse des jeweils verwendeten Antibiotikums ist in der Spalte „Masse“ angegeben. Nach erfolgtem Wachstum (1–5 Tage) wurden die Durchmesser der Hemmhöfe inklusive Filterpapier gemessen. Hier zeigte sich, dass BOE100 und BOE200 resistent waren gegen Ampicillin und Penicillin, S17-1 gegen Streptomycin. Die Alkohole Ethanol und Methanol wurden ebenfalls getestet, da die Antibiotika Chloramphenicol und Tetracyclin in ihnen gelöst waren. Sie hatten keinen wachstumshemmenden Einfluss.

4.6 Wachstumskurven und Induktionstests

4.6.1 Wachstum von BOE3

Zur Bestimmung der Wachstumsparameter von BOE3 wurden Wachstumskurven bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen in dreifacher Ausführung aufgezeichnet. Die Vorkultur wurde zwei Tage vorher angesetzt (4 mM BET) und am Vortag mit 3 mM Substrat versetzt. Zur Herstellung der eigentlichen Versuchs-Kulturen wurden jeweils 50 mL MM mit 2 mL der Vorkultur inokuliert. Die Start-ODs lagen bei 0,08–0,1. BET in den Konzentrationen 2, 4, 6, 8 oder 10 mM wurde hinzugefügt, die Kolben bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert und die OD₅₄₆ regelmäßig photometrisch bestimmt (OD-Werte siehe Anhang, Tabelle 7-2). Die Wachstumskurven sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

Die Wachstumskonstante μ wurde für jede Konzentration aus den Mittelwerten der drei Kulturen mittels einer Trendlinie in Excel bestimmt. Die zur Berechnung von μ verwendeten Werte sind in Tabelle 7-2 (Anhang) gekennzeichnet. Die Verdopplungszeit t_d wurde anhand von μ berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-5 zu finden.

Es ist zu erkennen, dass sich die Wachstumsparameter innerhalb des getesteten Konzentrationsspektrums kaum unterschieden. Die Wachstumsrate war bei 4 mM mit $0,204 \text{ h}^{-1}$ am größten, betrug bei 10 mM $0,193 \text{ h}^{-1}$ und war damit nicht wesentlich geringer. Die Verdopplungszeiten beliefen sich auf 204 Minuten bei 4 mM BET und 216 Minuten bei 10 mM BET.

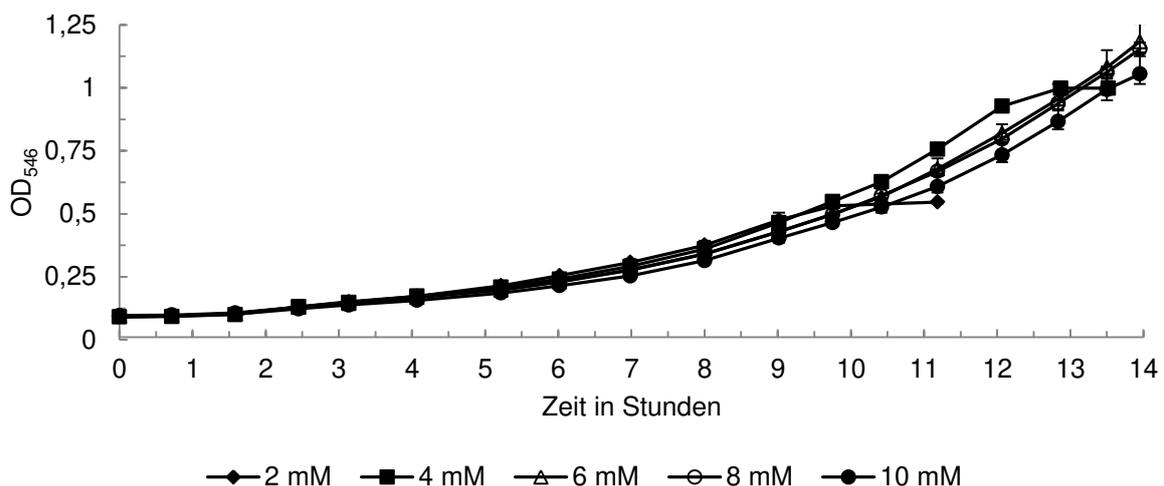


Abbildung 4.6 Wachstumskurven BOE3

Aufgetragen sind die OD₅₄₆-Werte von BOE3 beim Abbau von BET bei Substratkonzentrationen von 2, 4, 6, 8 und 10 mM. Inokuliert wurden die Kolben mit einer BET-induzierten Vorkultur. Die Start-ODs lagen bei etwa 0,1. Für jede BET-Konzentration wurden 3 Kolben angesetzt. Die Mittelwerte aus den drei Versuchen sind aufgetragen, die Fehlerbalken zeigen die Abweichungen an.

Tabelle 4-5 Wachstumsparameter BOE3

	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM	10 mM
μ in h^{-1}	0,194	0,204	0,198	0,194	0,193
t_d in min	214	204	211	214	216

4.6.2 Wachstum von BOE100

Die Wachstumsparameter von BOE100 bei 5 unterschiedlichen BET-Konzentrationen wurden in Dreifachbestimmung in Batch-Ansätzen ermittelt. Dazu wurden je 2 mL einer Übernachtskultur zu 50 mL MM hinzugefügt. Hieraus ergaben sich Anfangs- OD_{546} zwischen 0,08 und 0,09. Die Kolben wurden mit 5, 7,5, 10, 12,5 bzw. 15 mM BET versetzt, auf dem Schüttler bei 30 °C inkubiert und die OD_{546} regelmäßig bestimmt. Der Wachstumsverlauf ist in Abbildung 4.7 anschaulich gemacht.

Die Wachstumsparameter μ und t_d sind in Tabelle 4-6 dargestellt. Die gemessenen OD -Werte und die für die Bestimmung von μ verwendeten Werte finden sich in Tabelle 7-3 (Anhang). Der höchste Wert für μ wurde bei einer BET-Konzentration von 5 mM gemessen und lag bei $0,645 h^{-1}$ mit einer Verdopplungszeit von 60 Minuten. Mit zunehmender BET-Konzentration sank μ und war bei 15 mM mit $0,514 h^{-1}$ am geringsten.

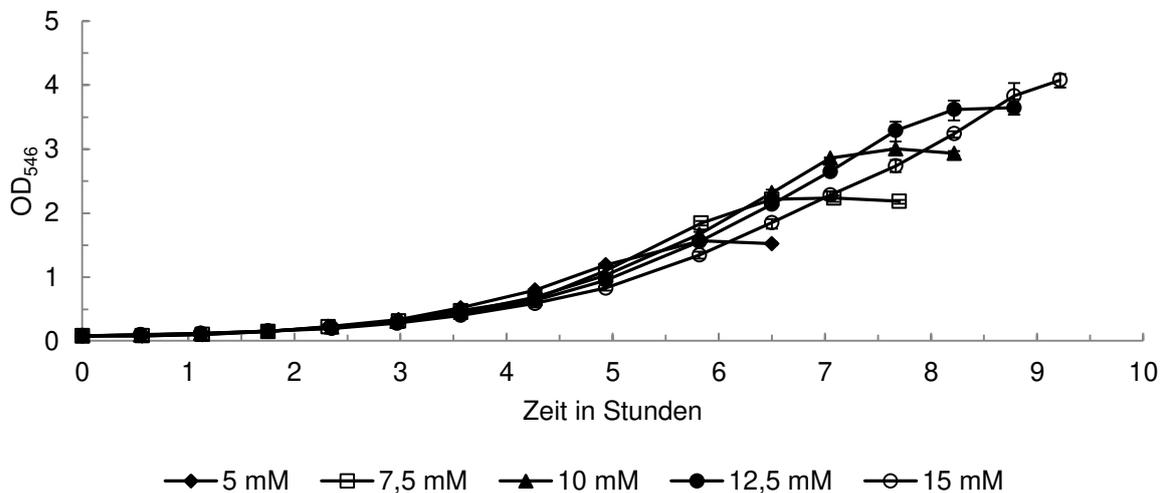


Abbildung 4.7 Wachstumskurven BOE100

Aufgetragen sind die OD_{546} -Mittelwerte von je 3 BOE100-Kulturen beim Abbau von BET bei Substratkonzentrationen von 5, 7,5, 10, 12,5 und 15 mM. Inokuliert wurden die Kolben mit einer Übernachtskultur von BOE100. Die Anfangs- OD s betragen 0,08–0,09.

Tabelle 4-6 Wachstumsparameter BOE100

	5 mM	7,5 mM	10 mM	12,5 mM	15 mM
μ in h^{-1}	0,645	0,602	0,565	0,538	0,514
t_d in min	64	69	74	77	81

4.6.3 Induktionstest BOE100

Um die Frage zu beantworten, ob die Enzyme für den Abbau von BET in BOE100 konstitutiv vorliegen oder induziert werden, wurden Induktionstests durchgeführt. Hierfür wurden von BOE100 unter Zugabe von jeweils 4 mM Substrat zunächst eine Glucose- und eine Butoxyethanol-Vorkultur in MM hergestellt. Die Kulturen wurden am Folgetag mit MM verdünnt, so dass sich eine Anfangs- OD_{546} von 0,08–0,09 einstellte. Mit jeder derart verdünnten Vorkultur wurden zwei 100 mL-Versuchskulturen angesetzt. Eine dieser Kulturen wurde anschließend mit 2 mM Glucose, die andere mit 2 mM Butoxyethanol versetzt, so dass während des Versuchs die OD_{546} von insgesamt 4 Kolben gemessen wurde:

Kultur 1: Vorkultur Glucose, Substrat Glucose (Glc-Glc)

Kultur 2: Vorkultur Glucose, Substrat Butoxyethanol (Glc-BET)

Kultur 3: Vorkultur Butoxyethanol, Substrat Glucose (BET-Glc)

Kultur 4: Vorkultur Butoxyethanol, Substrat Butoxyethanol (BET-BET)

Die Kolben wurden bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert und die OD_{546} in regelmäßigen Abständen gemessen. Die Werte sind im Anhang in Tabelle 7-4 zu finden. Die Wachstumsverläufe sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Anhand der gemessenen Werte wurden die Wachstumsparameter bestimmt. Sie sind in Tabelle 4-7 zusammengefasst.

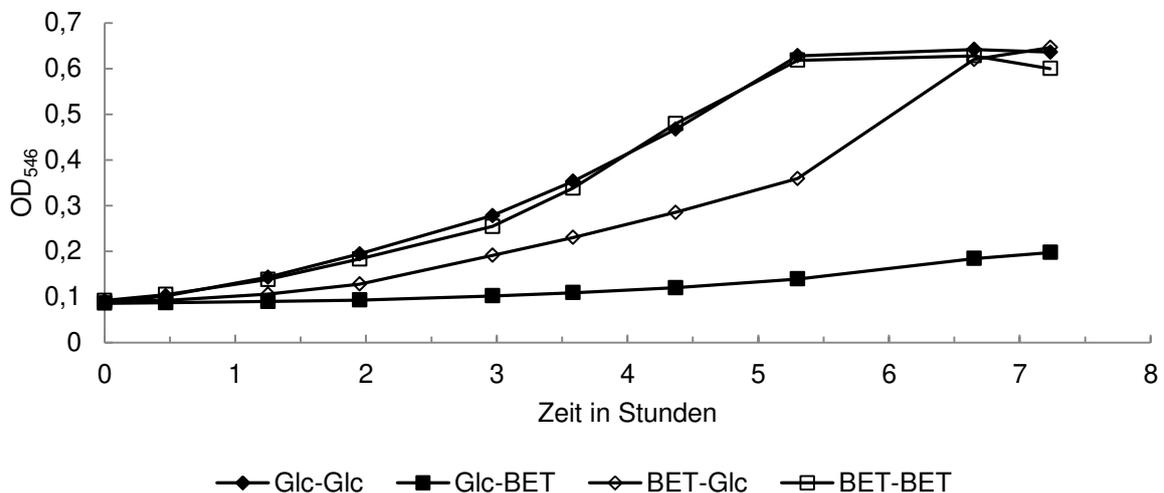


Abbildung 4.8 Induktionstest BOE100

Gemessen wurde die OD_{546} von BOE100. Am Vortag wurden 2 Vorkulturen (VK) angesetzt, die eine in MM + Glc, die andere in MM + BET. Von jeder Vorkultur wurden jeweils 2 Ansätze hergestellt und der eine mit Glc, der andere mit BET (jeweils 2 mM) versetzt. Glc-Glc: VK Glc, Substrat Glc, Glc-BET: VK Glc, Substrat BET; BET-Glc: VK BET, Substrat Glc; BET-BET: VK BET, Substrat BET

Tabelle 4-7 Wachstumsparameter Induktionstest BOE100

Kultur (VK-Substrat)	μ in h^{-1}	t_d in min	lag-Phase
1 Glc-Glc	0,379	110	-
2 Glc-BET	0,180	232	ca. 4,5 h
3 BET-Glc	0,328	127	ca. 60 min
4 BET-BET	0,370	112	-

jeweils 2 mM Substrat

Es war klar zu erkennen, dass erwartungsgemäß sowohl Kultur 1 (VK Glc, Substrat Glc) als auch Kultur 4 (VK BET, Substrat BET), also diejenigen, die mit dem Vorkultursubstrat versetzt worden und damit induziert waren, keine lag-Phase aufwiesen, die Abbauenzyme jeweils vorlagen. Die Verdopplungszeiten t_d waren mit 110 Minuten für Glc-Glc und 112 Minuten für BET-BET nahezu identisch (s. Tabelle 7-4).

Für die Umstellung von Glucose auf Butoxyethanol (Kultur 2) benötigte BOE100 etwa 4,5 Stunden. Im Anschluss begann allmählich das exponentielle Wachstum, die OD_{546} erreichte allerdings während des Versuchszeitraumes von knapp 7,5 Stunden nur einen Wert von etwa 0,2. Die Verdopplungszeit, die aus den wenigen Daten des gerade begonnenen exponentiellen Wachstums berechnet wurde, betrug 232 Minuten und war damit mehr als doppelt so hoch wie t_d bei Kultur 4 (BET-BET).

Umgekehrt dauerte die Adaption von BET-induzierten BOE100-Zellen an Glucose nur etwa eine Stunde (Kultur 3). Die Verdopplungszeit betrug 127 Minuten und war im Vergleich zu Kultur 1 (Glc-Glc), deren t_d bei 110 Minuten lag, nur geringfügig höher.

Die BET-Abbauenzyme liegen demnach nicht konstitutiv vor sondern sind induzierbar. Ferner wurden die Enzyme für den Glucose-Abbau von der BET-induzierten Kultur sowohl schneller als auch effektiver synthetisiert als umgekehrt die BET-Abbauenzyme bei der Glucose-induzierten Kultur.

4.6.4 Wachstum von BOE200

Je 2 mL einer BET-Übernachtskultur von BOE200 wurden in 50 mL MM gegeben und auf diese Weise eine Start- OD_{546} von etwa 0,08 erhalten. Unterschiedliche BET-Konzentrationen (2, 4, 6, 8 und 10 mM) wurden eingestellt, die Kolben bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert und die OD_{546} regelmäßig photometrisch bestimmt. Die Versuche erfolgten in dreifacher Ausführung. Die OD_{546} -Werte sind Tabelle 7-5 (Anhang) zu entnehmen. Der Wachstumsverlauf ist in Abbildung 4.9 dargestellt

Die Wachstumskonstanten μ wurden für jede Konzentration in Excel durch eine exponentielle Trendlinie bestimmt und sind in Tabelle 4-8 dargestellt. Die hierfür verwendeten OD -Werte

Ergebnisse

sind in Tabelle 7-5 (Anhang) gekennzeichnet. Mit $0,395 \text{ h}^{-1}$ ist μ bei 6 mM BET am höchsten bei einer Verdopplungszeit von 105 Minuten.

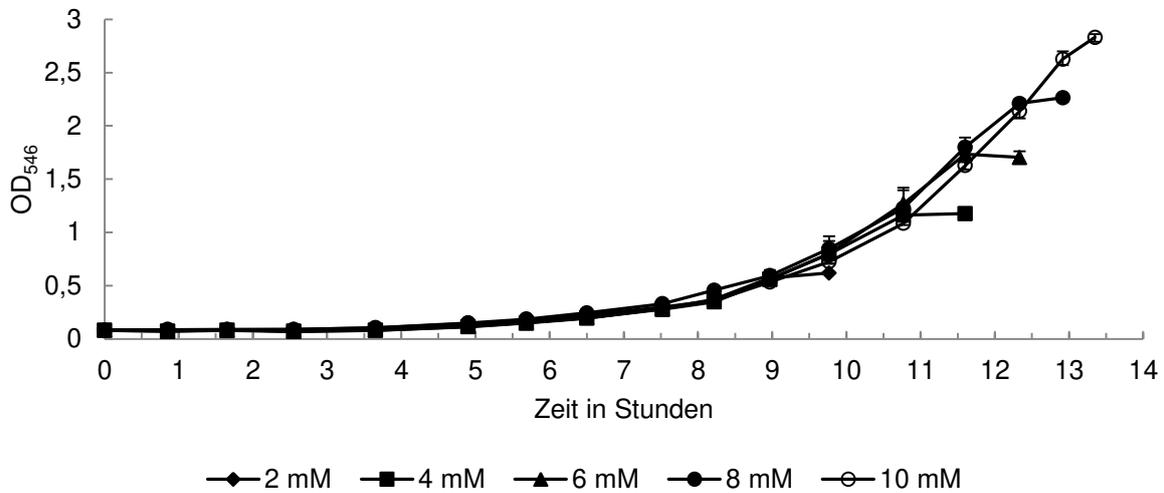


Abbildung 4.9 Wachstumskurven BOE200

Das Wachstum von BOE200 mit BET bei verschiedenen Substratkonzentrationen (2, 4, 6, 8 und 10 mM) wurde verfolgt, indem die OD_{546} regelmäßig gemessen wurde. Inokuliert wurden die Kolben mit einer Übernachtskultur von BOE200. Die Start-ODs lagen ca. 0,08. Die Durchführung erfolgte in dreifacher Ausfertigung.

Tabelle 4-8 Wachstumsparameter BOE200

	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM	10 mM
μ in h^{-1}	0,344	0,383	0,395	0,363	0,362
t_d in min	121	108	105	115	115

4.6.5 Wachstum der BOE-Stämme

Die Wachstumsparameter der Stämme *P. knackmussii* BOE1, *P. putida* BOE2, *P. umsongensis* BOE4, *Gordonia terrae* BOE5, *P. extremaustralis* BOE6, *P. plecoglossicida* BOE7, *Pseudomonas* sp. BOE10 und *Cupriavidus oxalaticus* BOE300 in MM bei einer BET-Konzentration von 10 mM wurden mittels Messung der OD_{546} in Batch-Ansätzen bestimmt. Vorkulturen der Stämme, die auf BET gewachsen waren, wurden mit MM auf eine Start- OD_{546} von 0,04–0,12 verdünnt, je 100 mL in sterile 250 mL-Schikanekolben überführt und mit jeweils 10 mM BET versetzt. Die Stämme wurden bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert und die OD_{546} in regelmäßigen Abständen bestimmt.

Die OD_{546} -Werte sind Tabelle 7-6 (Anhang) zu entnehmen. In Abbildung 4.10 sind die Wachstumskurven dargestellt.

Ergebnisse

Die Wachstumskonstanten μ wurden graphisch mittels einer exponentiellen Trendlinie während des exponentiellen Wachstums ermittelt und die Verdopplungszeit t_d anhand von μ berechnet. Die Wachstumsparameter sind in Tabelle 4-9 zusammengefasst.

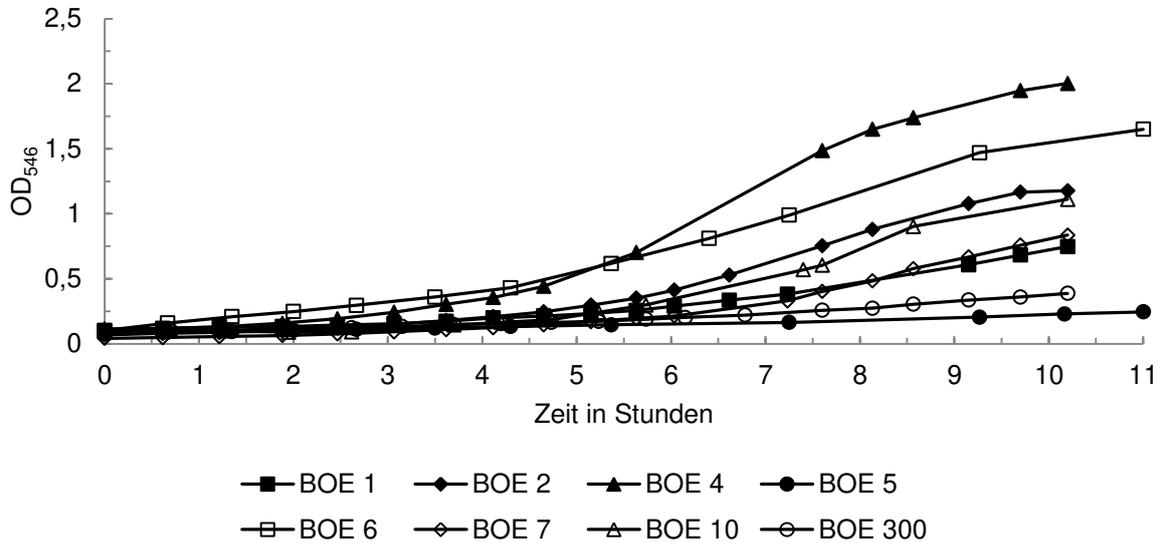


Abbildung 4.10 Wachstumskurven BOE-Stämme

100 mL MM in 250 mL Schikanekolben wurden mit der jeweiligen Vorkultur angeimpft, mit 10 mM BET versehen und bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die OD_{546} betrug zu Beginn 0,04–0,12 und wurde in regelmäßigen Abständen gemessen.

Tabelle 4-9 Wachstumsparameter BOE-Stämme

	BOE1	BOE2	BOE4	BOE5	BOE6	BOE7	BOE10	BOE300
μ in h^{-1}	0,225	0,353	0,388	0,098	0,272	0,326	0,384	0,148
t_d in min	185	118	107	426	153	128	108	281

4.7 Butoxyethanol-Sensitivitätstest

In flüssigem Minimalmedium wurde die Butoxyethanol-Sensitivität untersucht. Jeweils 50 mL MM wurden mit Vorkulturen der Stämme BOE3, BOE100 bzw. BOE200 angeimpft, so dass sich Start-ODs von 0,06–0,1 einstellten. Die Kolben wurden mit verschiedenen BET-Konzentrationen versetzt und die OD_{546} über einen Zeitraum von bis zu 18 Tagen regelmäßig bestimmt. Die Durchführung erfolgte in Dreifachbestimmung. Die Wachstumsverläufe für BET-Konzentrationen von 20, 30 und 40 mM für die Stämme BOE3 und BOE200 (A, B, C, G, H, I) bzw. 30, 40 und 50 mM für den Stamm BOE100 (D, E und F) sind in Abbildung 4.11 dargestellt.

Ergebnisse

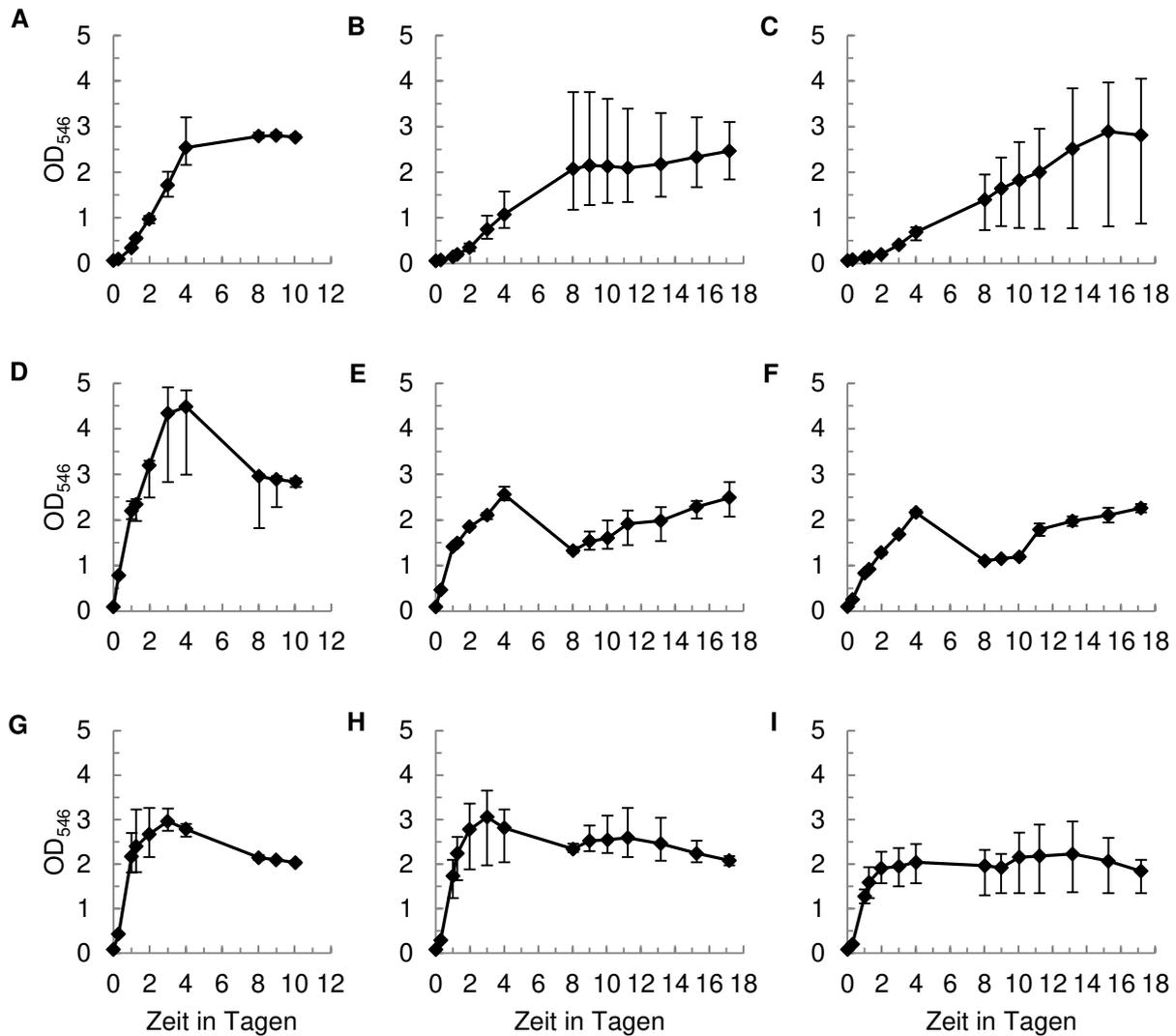


Abbildung 4.11 BET-Sensitivitätstest

Minimalmedium wurde mit Vorkulturen des jeweiligen BOE-Stammes angeimpft und unterschiedliche BET-Konzentrationen eingestellt: **A:** BOE3, 20 mM BET; **B:** BOE3, 30 mM BET; **C:** BOE3, 40 mM BET; **D:** BOE100, 30 mM BET; **E:** BOE100, 40 mM BET; **F:** BOE100, 50 mM BET; **G:** BOE200, 20 mM BET; **H:** BOE200, 30 mM BET; **I:** BOE200, 40 mM BET. Das Wachstum wurde mittels Messung der OD₅₄₆ verfolgt. Die Durchführung erfolgte in Dreifachbestimmung. Dargestellt ist der Mittelwert inklusive Fehlerbalken.

Die drei BOE3-Kulturen, die mit 20 mM BET versetzt worden waren (Abbildung 4.11, A), wuchsen mit sehr ähnlicher Geschwindigkeit und BET war nach ca. 4 Tagen vollständig abgebaut. Mit 30 und 40 mM BET erfolgte das Wachstum deutlich langsamer und es gab große Unterschiede zwischen den untersuchten Kulturen gleicher Konzentration (B bzw. C). BET-Abbau unter diesen Bedingungen bedeutete demnach Stress für die Zellen und die Wachstumsraten waren nicht reproduzierbar nachstellbar. Die maximale OD₅₄₆, die in diesem Experiment erreicht wurde, lag bei etwa 3 für alle drei Konzentrationen.

Bei zwei der drei BOE100-Kulturen mit einer BET-Startkonzentration von 30 mM erfolgte der vollständige Substratabbau innerhalb von 3–4 Tagen und eine maximale OD₅₄₆ von ca. 4,5

wurde erreicht (D). Die dritte Kultur wuchs langsamer und benötigte 10 Tage für den vollständigen Abbau. Mit 40 und 50 mM BET wuchs BOE100 deutlich langsamer und es konnte keine OD_{546} größer als 3 erreicht werden (E bzw. F). Im Medium akkumulierte BES, was mittels GC-MS detektiert wurde (s. Kapitel 3.3) und zu einem pH-Wert-Abfall auf ca. 6 an Tag 8 führte. Nach 18 Tagen war BES vollständig abgebaut und der pH-Wert hatte sich auf 7 reguliert, das Wachstum in diesem Zeitraum war allerdings gering und es gab nur niedrige OD_{546} -Zunahmen von 1,3 auf 2,5 mit 40 mM bzw. von 1,1 auf 2,3 mit 50 mM BET-Ausgangskonzentrationen.

BOE200 hatte 20 mM BET nach 3 Tagen vollständig abgebaut und die maximale OD_{546} von etwa 3 erreicht (G). Bei BOE200 konnte sowohl bei 40 als auch bei 50 mM BET ein pH-Wert-Abfall auf 6 bereits nach 3 Tagen festgestellt werden. Wie bei BOE100 akkumulierte auch hier BES im Medium, was zu einer Hemmung des weiteren Abbaus führte. BES war zwar nach 18 Tagen vollständig abgebaut, die OD_{546} nahm aber nach Tag 4 nicht mehr zu und hatte ihr Maximum bei ca. 3 mit 40 mM bzw. 2,3 mit 50 mM BET-Startkonzentration.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass 20 mM BET durch die Stämme BOE3 und BOE200 und 30 mM durch den Stamm BOE100, zumindest in zwei von drei Fällen, in einem Zeitraum von 3–4 Tagen vollständig abgebaut wurden und höhere BET-Konzentrationen zu deutlich verringertem Wachstum führten. Außerdem akkumulierte beim BET-Abbau durch BOE100 und BOE200 bei erhöhten Konzentrationen BES im Medium, was zu einem Abfall des pH-Wertes geführt und das Wachstum gehemmt hat.

4.8 Metabolitdetektion

In Flüssigkulturen des Stammes BOE100 wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen versucht, Metabolite des Butoxyethanol-Abbaus zu akkumulieren und nachzuweisen.

Zum einen wurde einer BET-Kultur Chloramphenicol hinzugefügt, was die Proteinsynthese unterbindet, am Folgetag der Kulturüberstand mit Dichlormethan extrahiert und dieser im GC-MS analysiert. Das Chromatogramm ist in Abbildung 4.12 zu sehen. Detektiert wurden neben dem Substrat Butoxyethanol auch die Intermediate Butoxyessigsäure, Butanol und Buttersäure.

Eine weitere BOE100-Kultur wurde angesetzt und 10 mM BET sowie 10 mM 2-(2-Chlor-ethoxy)ethanol hinzugegeben mit dem Ziel, dass die Butoxyethanol-induzierten Enzyme das Chlorethoxyethanol angreifen und Metabolite im Medium akkumulieren. Hier wurde nach 5 Tagen Inkubation der Kulturüberstand extrahiert und im GC-MS analysiert. Das Chromatogramm ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass das Chlorethoxyethanol abgebaut wurde und der Alkohol Chlorethanol im Medium akkumulierte. Auch zu erkennen ist Butoxyessigsäure als Metabolit des Butoxyethanol-Abbaus.

Ergebnisse

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass BET zunächst zu BES oxidiert wird und nach der Spaltung des Ethers Butanol als Zwischenprodukt entsteht.

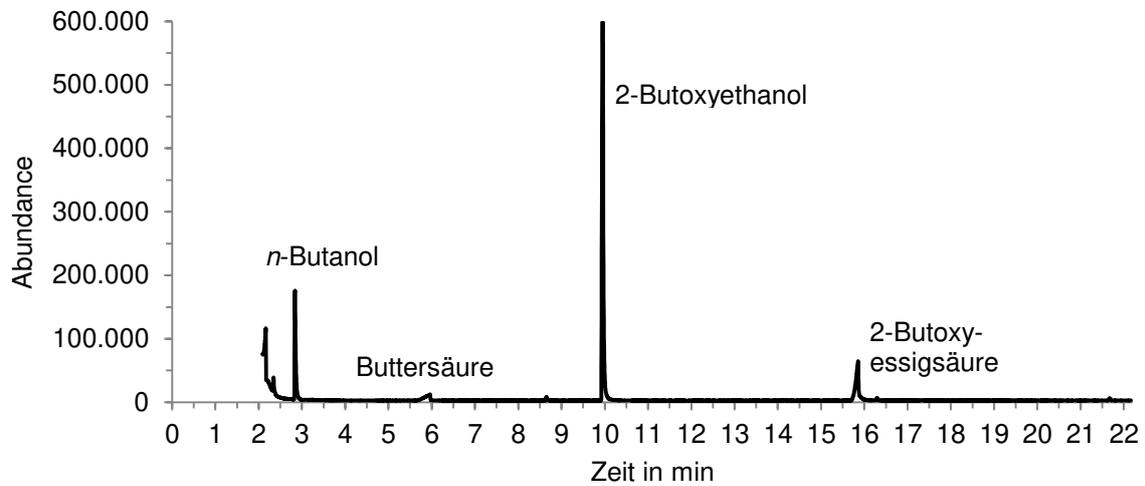


Abbildung 4.12 GC-Chromatogramm BOE100 mit BET und Chloramphenicol

Einer BOE100-Kultur, die mit BET versetzt worden war, wurde während des exponentiellen Wachstums Chloramphenicol zugefügt, um die Proteinsynthese zu unterbinden. Der Kulturüberstand wurde am Folgetag mit Dichlormethan extrahiert und im GC-MS analysiert. Zu sehen sind neben dem Substrat Butoxyethanol die Metabolite 2-Butoxyessigsäure, *n*-Butanol und Buttersäure.

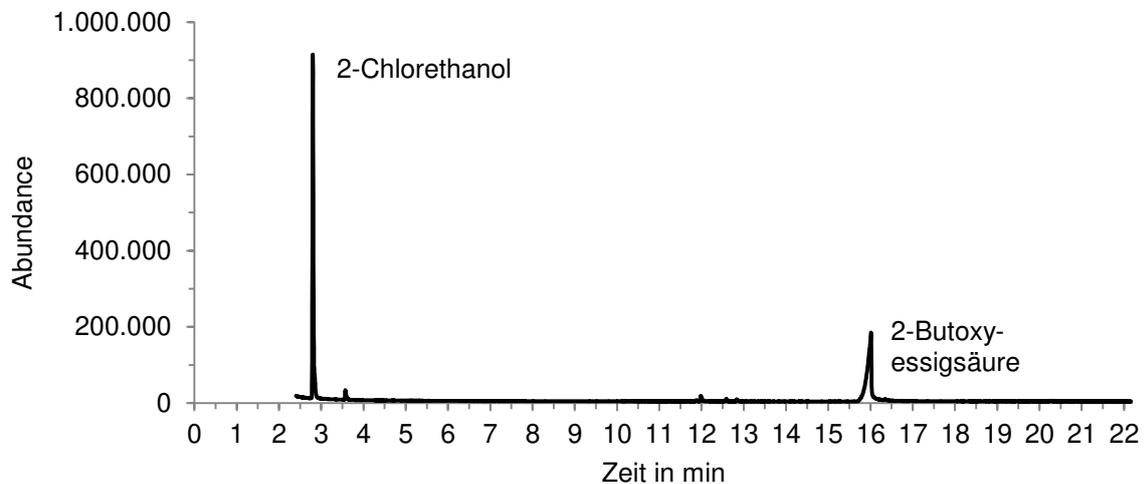


Abbildung 4.13 GC-Chromatogramm BOE100 mit BET und Chlorethoxyethanol

Der Kulturüberstand von BOE100 nach Wachstum mit BET unter Zugabe von 2-(2-Chlorethoxy)ethanol wurde mit Dichlormethan extrahiert, der Extrakt im GC-MS analysiert. Zu sehen sind neben dem BET-Abbaumetabolit Butoxyessigsäure der Chlorethoxyethanol-Abbaumetabolit 2-Chlorethanol.

4.9 Sauerstoffelektrode

Bei einer Butoxyethanol-induzierten (B^i) und bei einer Glucose-induzierten (G^i) Kultur von BOE100 wurde die Sauerstoffzehrung nach Zugabe von Butoxyethanol, Butoxyessigsäure und Glucose sowie MTBE und Diethylether aufgezeichnet. Die ausführliche Versuchsdurchführung ist in Kapitel 3.14 beschrieben. Dieser Versuch wurde an der Universität Konstanz unter Anleitung von Dr. David Schleheck durchgeführt.

Die 500 mL-Übernachtskulturen hatten eine OD von $OD_{546}(B^i) = 0,318$ und $OD_{546}(G^i) = 0,284$. Nach Zugabe von weiteren 9 mM Substrat wuchsen die Stämme innerhalb von 3 Stunden und 15 Minuten bis auf eine OD von $OD_{546}(B^i) = 0,784$ und $OD_{546}(G^i) = 0,872$. Die Zellen wurden gewaschen, in etwa 2 mL PP 1 resuspendiert und zunächst auf Eis gelagert.

Ein Ansatz in der Messzelle der Sauerstoffelektrode setzte sich folgendermaßen zusammen: 700 μ L PP 1 + 10 μ L Zellen (Ruheatmung) + 35 μ L 10 mM Substratlösung (Substratverwertungsatmung). Die ODs eines solchen Ansatzes (10 μ L Zellen/745 μ L Gesamtvolumen) betrugen $OD_{546}(B^i) = 1,89$ und $OD_{546}(G^i) = 1,21$.

Die Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt. Bei dieser Temperatur hat Wasser eine Sauerstoffsättigung von 7,53 mg O_2 /L, was einer Konzentration von 235,3 μ M entspricht. Die Sauerstoffelektrode wurde derart kalibriert, dass bei sauerstofffreiem Medium (0 %) der Schreiber an der Stelle 0 skt (skt = Sektoren), bei gesättigtem Medium (100 %) an der Stelle 100 skt war. Es wurde eine Papiergeschwindigkeit von 6 cm/min eingestellt. Die Ruheatmungsrate wurde vor Zugabe von Substrat aufgezeichnet, die Substratatemungsrate danach. Die Atmungsraten ließen sich anhand der Steigungen der Sauerstoffabnahmekurven berechnen. Sie wurden auf eine OD_{546} von 1 bezogen und sind in Tabelle 4-10 dargestellt.

Beim Abbau von Butoxyethanol durch B^i Zellen betrug die effektive Atmungsrate im Mittel $0,62 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot OD_{546}^{-1}$. Die Atmungsrate der B^i Zellen beim Umsatz von Butoxyessigsäure lag bei $0,25 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot OD_{546}^{-1}$ im Mittel. Butoxyethanol-induzierte Zellen konnten demnach Butoxyessigsäure direkt verstoffwechseln, was ein weiteres Indiz dafür war, dass Butoxyessigsäure ein Intermediat im Butoxyethanol-Abbau ist.

B^i Zellen zeigten keine Veränderung in der Sauerstoffzehrung nach Zugabe von Glucose. Demzufolge sind die Abbaugene für Glucose nicht konstitutiv.

Außerdem gab es keine erhöhte Sauerstoffzehrung bei Zugabe von MTBE und Diethylether. Diese Ether wurden nicht durch Butoxyethanol-induzierte Enzyme umgesetzt.

Umgekehrt ließ sich genauso gut erkennen, dass die Gene für den Abbau von Butoxyethanol induzierbar waren. Weder Butoxyethanol noch Butoxyessigsäure wurden von G^i Zellen verwertet. Die effektive Atmungsrate beim Abbau von Glucose durch die G^i Zellen betrug durchschnittlich $0,38 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot OD_{546}^{-1}$.

Ergebnisse

Tabelle 4-10 Atmungsraten von BOE100

Zellen	Substrat	Ruherate	Rate mit Substrat	effektive Rate	ø effektive Rate
B ⁱ	Butoxyethanol	0,28	0,96	0,69	
B ⁱ	Butoxyethanol	0,31	0,79	0,48	0,62
B ⁱ	Butoxyethanol	0,31	0,92	0,61	
B ⁱ	Butoxyethanol	0,42	1,11	0,69	
B ⁱ	Butoxyessigsäure	0,30	0,58	0,28	0,25
B ⁱ	Butoxyessigsäure	0,34	0,56	0,21	
B ⁱ	Glucose	0,30	0,25	-0,05	-0,05
B ⁱ	Methyl- <i>tert</i> -butylether	0,49	0,39	-0,10	-0,10
B ⁱ	Diethylether	0,38	0,42	0,04	0,04
G ⁱ	Butoxyethanol	0,25	0,19	-0,06	-0,07
G ⁱ	Butoxyethanol	0,36	0,29	-0,08	
G ⁱ	Butoxyessigsäure	0,17	0,21	0,04	0,01
G ⁱ	Butoxyessigsäure	0,41	0,40	-0,01	
G ⁱ	Glucose	0,49	1,01	0,53	0,38
G ⁱ	Glucose	0,22	0,46	0,24	

Rate in $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}_{546}^{-1}$; Bⁱ: Butoxyethanol-induziert; Gⁱ: Glucose-induziert. Die Ruheatmungs- und die Substratatemungsraten von Bⁱ- und Gⁱ-Zellen nach Zugabe von unterschiedlichen Substraten wurden aufgezeichnet. Die effektive Atmungsrate ergab sich nach Subtraktion der Ruhe- von der Substratatemungsrate. Bⁱ-Zellen zeigten Sauerstoffzehrung bei Zugabe von BET und BES, nicht aber von Glc, MTBE und Diethylether. Umgekehrt zeigten Gⁱ-Zellen keine Sauerstoffzehrung bei Zugabe von BET und BES, wohl aber von Glc.

4.10 NAD-Umsatz im Rohextrakt

Es wurde überprüft, ob die am Abbau von Butoxyethanol beteiligten Enzyme im Stamm BOE100 NAD-abhängig sind. Dazu wurde im Rohextrakt einer 1 L-Kultur von BOE100, die mit MM + BET gewachsen war, der Verbrauch von NAD bzw. die Zunahme von NADH nach Zugabe unterschiedlicher Substrate photometrisch bestimmt (s. Kapitel 3.15).

Getestet wurden die Alkohole Methanol, Ethanol, *n*-Butanol und *n*-Hexanol zum einen und die Ether 2-Butoxyethanol, 2-Ethoxyethanol, 2-Propoxyethanol sowie das BET-Abbauprodukt 2-Butoxyessigsäure zum anderen (s. Abbildung 4.14).

Beim Abbau von Butoxyethanol durch BOE100 wurde (mindestens) eine NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase exprimiert, die die Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol umsetzen konnte, wie der Anstieg der NADH-Konzentration zeigt (A). Methanol hingegen wurde nicht metabolisiert. Diese Alkoholdehydrogenase ist aller Voraussicht nach verantwortlich für die Weiterreaktion von Butanol, das beim Abbau von Butoxyethanol als Intermediat auftritt.

Die Oxidation von Butoxyethanol zu Butoxyessigsäure ist im Gegensatz dazu nicht NAD-abhängig, hier konnte keine NADH-Zunahme detektiert werden (B). Sie wird von einer ande-

Ergebnisse

ren Alkoholdehydrogenase katalysiert. Auch bei allen anderen getesteten Etherverbindungen fand kein NAD-Umsatz statt.

Der Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm beträgt $6220 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Horecker & Kornberg, 1948). Laut Lambert-Beer'schen Gesetz ergeben sich bei einer Küvettenbreite von 1 cm folgende Werte: Bei einer NAD-Ausgangskonzentration von $248 \text{ } \mu\text{mol/L}$ wurden nach Zugabe von Ethanol 449, von Butanol 417 und von Hexanol 420 $\mu\text{mol/h}$ NADH erzeugt.

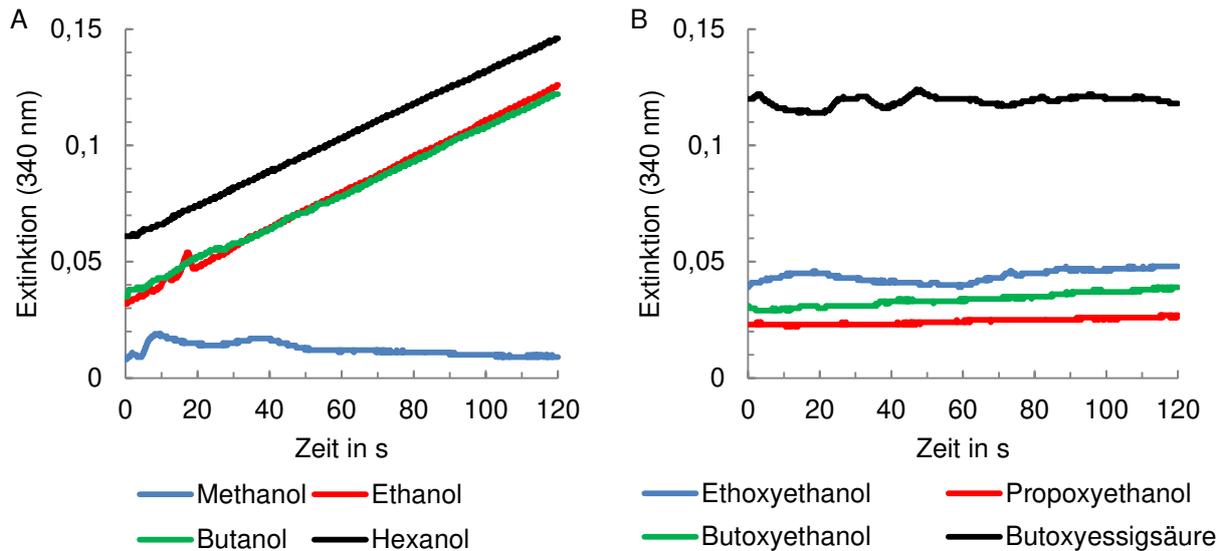


Abbildung 4.14 Enzymaktivität BOE100

Dargestellt ist die Detektion der NADH-Produktion im Rohextrakt von BOE100 nach Zugabe verschiedener Substrate. **A:** Nach Zugabe der Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol erfolgte eine Zunahme der NADH-Konzentration, d. h. beim Wachstum von BOE100 mit Butoxyethanol wird (mindestens) eine Alkoholdehydrogenase hochreguliert, die zwar Ethanol, Butanol und Hexanol, nicht aber Methanol oxidiert. **B:** Bei Zugabe von Butoxyethanol, Ethoxyethanol, Propoxyethanol oder Butoxyessigsäure wurde kein NADH erzeugt.

4.11 Substratpattern

In flüssigem MM wurde untersucht, welche BOE-Stämme Wachstum auf welchen Substraten zeigten. Die Kulturen mit einer Start-OD₅₄₆ von mindestens 0,1 wurden für eine Woche bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert, dann wurde erneut die OD₅₄₆ gemessen. Tabelle 4-11 zeigt die Ergebnisse. Dabei steht das + für Wachstum, das - für kein Wachstum und das +- für geringes Wachstum (OD-Erhöhung ≤ 0,2).

Tabelle 4-11 Substratpattern BOE-Stämme

Substrat	BOE1	BOE2	BOE3	BOE4	BOE5	BOE6	BOE7	BOE10	BOE100	BOE200	BOE300
2-Butoxyethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Butoxyessigsäure	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glyoxylsäure	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Butanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Hexanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethylacetat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Propanol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Aceton	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Methylethylketon	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Ethylether	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Butylether	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Isopentylether	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diethylenglycoldibutylether	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butylvinylether	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Dibenzylether	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2-Ethoxyethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PEG 200	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
2-Propoxyethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-Butoxy-2-propanol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4-Methoxy-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	+	+
2-Phenoxyethanol	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Hexan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyclohexan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoessäure	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
2-Phenylethanol	-	-	+-	-	+	-	-	+	+	+	+-
Styrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toluol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Flüssiges MM wurde mit dem jeweiligen Stamm inokuliert (Start-OD₅₄₆ ≥ 0,1), bei 30 °C für eine Woche auf dem Schüttler inkubiert und die OD erneut gemessen. + bedeutet Wachstum, - kein Wachstum und +- geringes Wachstum (OD-Erhöhung ≤ 0,2).

4.12 Genom-Sequenzierungen

Die Genome der Stämme *P. putida* BOE100 und *P. Vancouverensis* BOE200 wurden mit der Illumina-Technologie sequenziert und im Anschluss annotiert. Die Ergebnisse sind hier zusammengefasst.

4.12.1 Genom-Sequenz von *P. putida* BOE100

Bei der Gesamtsequenzierung von BOE100 mittels Illumina HiSeq 2000 durch die GATC Biotech AG (Konstanz) wurden beim ersten Durchgang 9 Mio. 100 bp-read-Paare, beim zweiten Durchgang 3,75 Mio. erzeugt (s. Kapitel 3.23.1). Das Assembly wurde mit dem Programm Geneious durchgeführt und die Annotation erfolgte online durch den IMG-Server.

Das Gesamtgenom von BOE100 umfasst 7,5 MB, gegliedert in 2 955 Scaffolds. Der GC-Gehalt liegt bei 60,8 %. Es wurden insgesamt 8 683 Gene identifiziert, davon 179 RNA-Gene und 8 504 Protein-codierende Gene. Bei 5 194 Genen konnte dem jeweiligen Protein eine Funktion zugewiesen werden, bei 3 310 nicht. In Tabelle 4-12 sind die Genom-Statistiken von BOE100 aufgelistet.

4.12.2 Genom-Sequenz von *P. Vancouverensis* BOE200

Die Genomsequenzierung von BOE200 vom Fraunhofer IGB mit einem Illumina HiSeq 2500 ergab 22,26 Mio. reads à 150 bp. Das Gesamtgenom hat eine Größe von 7,1 MB, aufgeteilt auf 268 Scaffolds. Der GC-Gehalt liegt bei 59,2 %. Die Anzahl der identifizierten Gene beträgt 7 273, davon waren 162 RNA-Gene und 7 111 Protein-codierende Gene. Bei 5 427 dieser Gene wurde eine Proteinfunktion vorhergesagt, bei den übrigen 1 684 hingegen nicht. Die gesamten Statistiken sind in Tabelle 4-13 zu finden.

Ergebnisse

Tabelle 4-12 Statistiken Genom BOE100

	Number	% of Total
DNA, total number of bases	7 502 261	100 %
DNA coding number of bases	6 487 673	86.48 %
DNA G+C number of bases	4 562 050	60.81 %
DNA scaffolds	2 955	100 %
Genes total number	8 683	100 %
Protein coding genes	8 504	97.94 %
RNA genes	179	2.06 %
rRNA genes	40	0.46 %
5S rRNA	10	0.12 %
16S rRNA	14	0.16 %
23S rRNA	16	0.18 %
tRNA genes	74	0.85 %
Other RNA genes	65	0.75 %
Protein coding genes with function prediction	5 194	59.82 %
without function prediction	3 310	38.12 %
Protein coding genes with enzymes	1 552	17.87 %
w/o enzymes but with candidate KO based enzymes	65	0.75 %
Protein coding genes connected to KEGG pathways ³	1 799	20.72 %
not connected to KEGG pathways	6 705	77.22 %
Protein coding genes connected to KEGG Orthology (KO)	3 381	38.94 %
not connected to KEGG Orthology (KO)	5 123	59.00 %
Protein coding genes connected to MetaCyc pathways	1 311	15.10 %
not connected to MetaCyc pathways	7 193	82.84 %
Protein coding genes with COGs ³	4 353	50.13 %
with KOGs ³	1 153	13.28 %
with Pfam ³	5 318	61.25 %
with TIGRfam ³	1 943	22.38 %
with InterPro	5 450	62.77 %
with IMG Terms	1 439	16.57 %
with IMG Pathways	451	5.19 %
with IMG Parts List	5 84	6.73 %
in internal clusters	3 304	38.05 %
in Chromosomal Cassette	6 705	77.22 %
Chromosomal Cassettes	587	-
Biosynthetic Clusters	37	-
Genes in Biosynthetic Clusters	304	3.5 %
Fused Protein coding genes	62	0.71 %
Protein coding genes coding signal peptides	684	7.88 %
Protein coding genes coding transmembrane proteins	1 494	17.21 %
COG clusters	2 041	46.89 %
KOG clusters	566	13.00 %
Pfam clusters	2 651	49.85 %
TIGRfam clusters	1 409	72.52 %

analysiert mit IMG, IMG submission ID: 11454; locus tag: PputBOE100

Ergebnisse

Tabelle 4-13 Statistiken Genom BOE200

	Number	% of Total
DNA, total number of bases	7 107 293	100 %
DNA coding number of bases	6 170 790	86.82 %
DNA G+C number of bases	4 206 008	59.18 %
DNA scaffolds	268	100 %
Genes total number	7 273	100 %
Protein coding genes	7 111	97.77 %
RNA genes	162	2.23 %
rRNA genes	17	0.23 %
5S rRNA	7	0.10 %
16S rRNA	1	0.01 %
23S rRNA	9	0.12 %
tRNA genes	58	0.80 %
Other RNA genes	87	1.20 %
Protein coding genes with function prediction	5 427	74.62 %
without function prediction	1 684	23.15 %
Protein coding genes with enzymes	1 704	23.43 %
w/o enzymes but with candidate KO based enzymes	19	0.26 %
Protein coding genes connected to KEGG pathways ³	2 025	27.84 %
not connected to KEGG pathways	5 086	69.93 %
Protein coding genes connected to KEGG Orthology (KO)	3 573	49.13 %
not connected to KEGG Orthology (KO)	3 538	48.65 %
Protein coding genes connected to MetaCyc pathways	1 433	19.70 %
not connected to MetaCyc pathways	5 678	78.07 %
Protein coding genes with COGs ³	4 060	55.82 %
with KOGs ³	1 068	14.68 %
with Pfam ³	5 651	77.70 %
with TIGRfam ³	1 909	26.25 %
with InterPro	3 596	49.44 %
with IMG Terms	1 065	14.64 %
with IMG Pathways	372	5.11 %
with IMG Parts List	420	5.77 %
in internal clusters	1 593	21.90 %
in Chromosomal Cassette	7 093	97.53 %
Chromosomal Cassettes	845	-
Biosynthetic Clusters	28	-
Genes in Biosynthetic Clusters	308	4.23 %
Fused Protein coding genes	132	1.81 %
Protein coding genes coding signal peptides	619	8.51 %
Protein coding genes coding transmembrane proteins	1 298	17.85 %
COG clusters	2 003	49.33 %
KOG clusters	552	13.60 %
Pfam clusters	2 715	48.04 %
TIGRfam clusters	1 398	73.23 %

analysiert mit IMG; IMG submission ID: 52926, locus tag: PsBOE200

4.13 Proteinanalyse

Eine Glucose- und eine Butoxyethanol-induzierte Kultur des Stammes BOE100 wurden wie in Kapitel 3.24 beschrieben behandelt, um die lösliche Proteinfractionen zu erhalten. Nach der isoelektrischen Fokussierung, pH-Bereich 4 bis 7, wurden die Proben auf je einem Acrylamidgel aufgetragen, um die Proteine zusätzlich nach Größe aufzutrennen. Die beiden Gele sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Wie deutlich zu erkennen ist, wurden bei der BET-induzierten Kultur mindestens 23 Gene hochreguliert, die bei der Glucose-induzierten Kultur nicht zu finden waren.

Wie in Kapitel 3.24.5 beschrieben wurden zusätzlich die Membranfraktionen sowie die Waschfraktionen der Membranpellets in einem Gradientengel aufgetragen (s. Abbildung 4.16). Bei der BET-induzierten Kultur war eine Bande zu sehen, die bei der Glucose-induzierten Kultur nicht auftrat (Bande „M1“).

Alle erwähnten Spots, 23 aus dem 2D-Gel („2D_1“ bis „2D_23“) und eine aus dem Gradientengel („M_1“), wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt und die Proteinsequenz mittels MALDI-TOF analysiert (Peptidmassenfingerprint, PMF). Diese Analyse wurde an der Universität Konstanz durch das Proteomics Core Facility vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden auf die Gesamtsequenz von BOE100 angewendet, um die Proteine zu identifizieren. Zu finden sind sie in Tabelle 4-14.

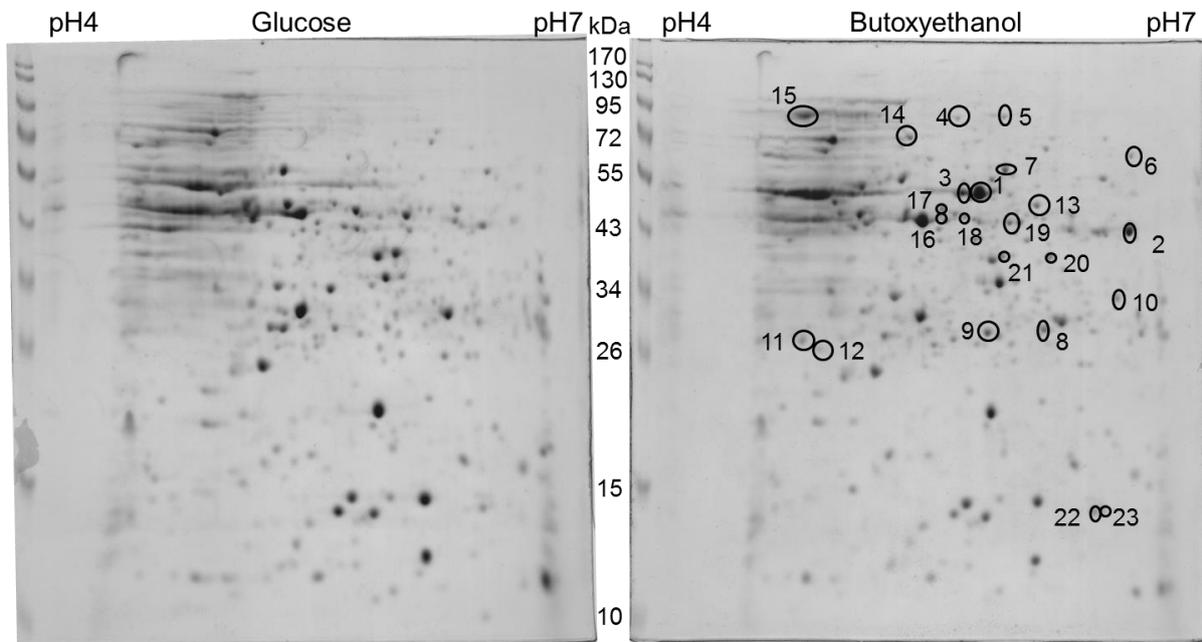


Abbildung 4.15 2D-Proteingele BOE100

Links ist die lösliche Proteinfraction der Glc-induzierten BOE100-Kultur abgebildet, rechts die der BET-induzierten. Bei der IEF wurde ein Strip mit dem pH-Bereich 4–7 verwendet. Insgesamt wurden 23 Spots detektiert, die bei der BET-Kultur auftraten, bei der Glc-Kultur jedoch nicht. In der Abbildung sind diese eingekreist und nummeriert. Die Spots wurden ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF analysiert.

Ergebnisse

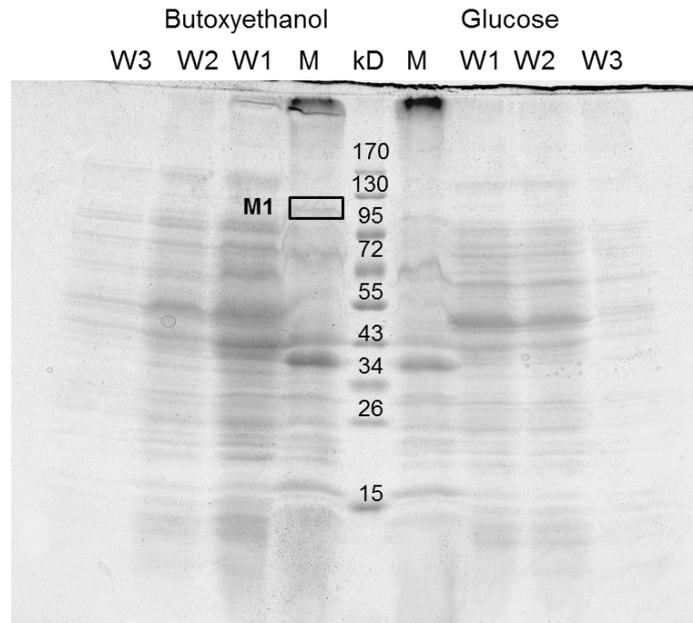


Abbildung 4.16 Gradientengel der Membranfraktion

Die Membranfraktionen der BET- und der Glc-induzierten Kulturen von BOE100 wurden jeweils 3 Mal gewaschen. Dabei wurden die Waschflüssigkeiten aufgehoben und diese ebenso wie die eigentlichen Membranfraktionen im Gel aufgetragen (Bezeichnungen W1 bis W3 für die Waschfraktionen, M für die Membranfraktionen). Links des Proteinmarkers sind die Proben der BET-Kultur aufgetragen, rechts die der Glc-Kultur. Bei etwa 110 kDa ist bei der BET-Membranprobe eine Bande zu finden, die es bei der Glc-Kultur nicht gibt. Diese wurde ausgeschnitten und analysiert.

Die Enzyme Isocitratlyase (PputBOE100_00898), Malatsynthase (PputBOE100_03343), 2-Hydroxy-3-oxopropionatreduktase (PputBOE100_06127), Hydroxypyruvatisomerase (PputBOE100_00179) und Malatdehydrogenase (PputBOE100_04561) gehören dem Glyoxylat-Metabolismus an. In Abbildung 4.17 ist ein Ausschnitt eines Schaubilds des Glyoxylat- und Dicarboxylat-Metabolismus zu finden. Es stammt von der KEGG-Datenbank (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>). In dieser Abbildung sind die bei BOE100 identifizierten Enzyme markiert.

Die Enzyme Acetyl-CoA-Acetyltransferase (PputBOE100_04072), Acyl-CoA-Dehydrogenase (PputBOE100_03947), Pyruvatformatlyase (PputBOE100_03760), 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (PputBOE100_04073), 3-Oxoacid-CoA-transferase (PputBOE100_02410 und PputBOE100_02411) und Acetolactatsynthase (PputBOE100_03936) sind beteiligt am Butanoat-Metabolismus, der in Abbildung 4.18 dargestellt ist. Auch hier wurden die beim Abbau von Butoxyethanol durch BOE100 hochregulierten Gene markiert

Die Acyl-CoA-Hydrolase (PputBOE100_00655) ist involviert in den Fettsäuremetabolismus.

Die PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenase PedE (PputBOE100_04059) katalysiert in *P. putida* U die Reaktion von Phenylethanol zum -aldehyd (Arias et al., 2008). Welche Rolle PedE beim Abbau von Butoxyethanol übernimmt, wird an anderer Stelle geklärt (s. Kapitel 4.14).

Ergebnisse

Die Flavin-abhängige Oxidoreduktase PputBOE100_06638 zählt zur Luciferase-Familie, zu der beispielsweise auch Alkanal-Monooxygenasen gehören, und könnte demnach an der Oxidation eines Aldehydes beteiligt sein.

Die Chaperone ClpB (PputBOE100_05917) und HtpG (PputBOE100_00957) sind bei der korrekten (Rück-)Faltung von Proteinen und Proteinaggregaten vonnöten und werden oftmals unter Stressbedingungen exprimiert (Lee et al., 2004; Thomas & Baneyx, 2000).

Die Mureintripeptidamidase MpaA (PputBOE100_02351) wird beim Recycling von Murein-Bausteinen benötigt (Uehara & Park, 2003).

Das im Gradientengel detektierte LPS assembly outer membrane protein LptD (PputBOE100_04745) ist nötig für die Bildung der äußeren Membran in gram-negativen Bakterienstämmen (Chimalakonda et al., 2011).

Die Arginindeiminase (PputBOE100_03035) und die Argininosuccinatsynthase (PputBOE100_04655) sind beteiligt am Arginin-Metabolismus.

Die Fructose-bisphosphat-aldolase (PputBOE100_00670) katalysiert die Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat in Glyceraldehyd-3-phosphat und hat mit dem Abbau von Butoxyethanol nichts zu tun. Betrachtet man die Gelbilder, fällt auf, dass der zugehörige Spot Nr. 21 nicht wesentlich prominent ist im BET-Gel, weswegen hier ein Enzym detektiert wurde, das man dem BET-Abbau nicht zuordnen kann.

Tabelle 4-14 Ergebnisse des Peptidmassenfingerprints der BOE100-Gene

Spot Nr.	kDa Gel	kDa pred.	pI Gel (pH)	pI pred. (pH)	Gene locus tag	PMF identification / Annotation	Score	Seq. cov. (%)
M_1	110	105,9			PputBOE100_04745	LPS assembly outer membrane protein LptID	36	10
2D_1	50	48,7	5,8	5,5	PputBOE100_00898	Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)	156	39
2D_2	42	41,2	6,5	6,5	PputBOE100_04072	Acetyl-CoA-acetyltransferase	293	59
2D_3	50	48,7	5,7	5,5	PputBOE100_00898	Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)	94	28
2D_4	85	94,8	5,5	5,1	PputBOE100_05917	ATP-dependent chaperone ClpB	118	22
2D_5	85	78,4	6	5,7	PputBOE100_03343	Malate synthase (EC 2.3.3.9)	70	19
2D_6	68	69,1	6,5	6,9	PputBOE100_04059	PedE PQQ-dependent alcohol dehydrogenase	82	30
2D_7	60	63,5	6	5,7	PputBOE100_03947	Acyl-CoA dehydrogenase	276	42
2D_8	28	30,0	6	5,8	PputBOE100_04073	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	160	34
2D_9	28	25,1	5,8	5,2	PputBOE100_02410	3-oxoacid CoA-transferase, A subunit	133	52
2D_10	31	30,9	6,5	6,4	PputBOE100_06127	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	96	33
2D_11	26	23,2	4,5	4,4	PputBOE100_02411	3-oxoacid CoA-transferase, B subunit	74	38
2D_12	26	28,7	4,8	4,5	PputBOE100_00179	Hydroxypyruvate isomerase	85	15
2D_13	48	46,6	6	6	PputBOE100_03035	Arginine deiminase (EC 3.5.3.6)	154	31
2D_14	72	71,6	5,5	5	PputBOE100_00957	Molecular chaperone, HptG family	65	32
2D_15	90	87,7	4,8	4,7	PputBOE100_03760	Pyruvate-formate lyase	294	30
2D_16	45	44,2	5,5	5,1	PputBOE100_04561	Malate dehydrogenase (NADP+) (EC 1.1.1.40)	201	31
2D_17	46	45,2	5,5	5	PputBOE100_04655	Argininosuccinate synthase (EC 6.3.4.5)	143	34
2D_18	45	42,3	5,5	5,5	PputBOE100_02351	Murein tripeptide amidase MpaA	44	18
2D_19	44	48,0	6	5,5	PputBOE100_06638	Flavin-dependent oxidoreductase, luciferase family	109	26
2D_20	37	35,5	6,3	6	PputBOE100_00725	Zn-dependent alcohol dehydrogenases (NAD)	201	34
2D_21	37	38,4	6	5,6	PputBOE100_00670	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	34	24
2D_22	13	17,8	6,4	6,3	PputBOE100_03936	Acetolactate synthase, small subunit (EC 2.2.1.6)	75	32
2D_23	13	14,9	6,5	6,5	PputBOE100_00655	Acyl-CoA hydrolase	197	57

Aufgelistet ist der jeweils beste Hit jeder Probe. M_1 ist das Membranprotein aus dem Gradientengel, die 2D_n-Proben sind lösliche Enzyme aus dem 2D-Gel (s. Abbildung 4.15 und Abbildung 4.16). Die Ergebnisse der Größen (kDa) und pIs (pH) der Proben aus dem Gel wurden mit den vorhergesagten (predicted, pred.) verglichen und entsprachen immer in etwa den erwarteten Werten. Seq. cov. bedeutet sequence coverage.

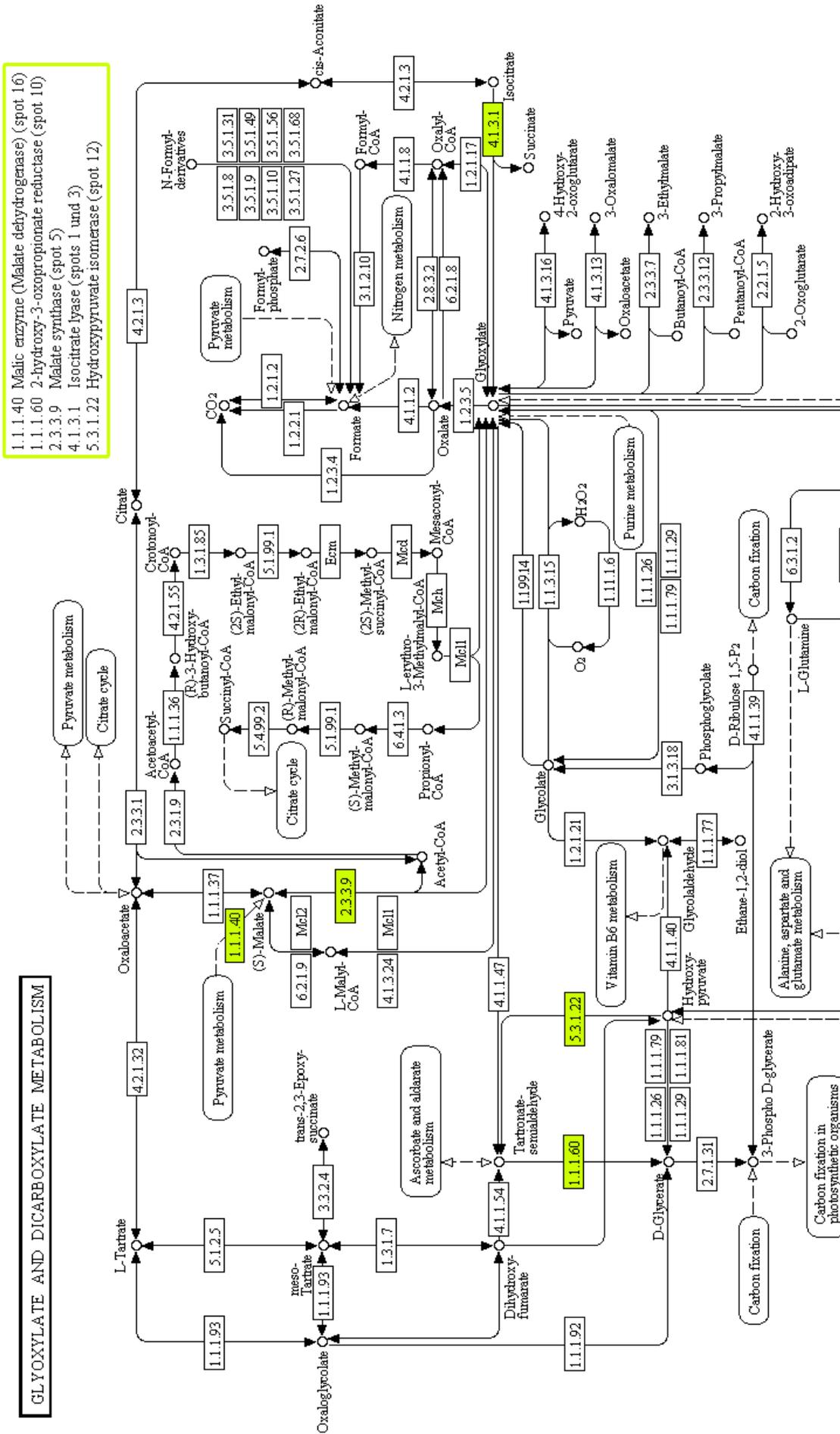


Abbildung 4.17 Ausschnitt Glyoxylat- und Dicarboxylat-Metabolismus (KEGG)

Markiert sind dem Glyoxylat-Metabolismus zugehörige Enzyme, die in BOE100 beim Wachstum mit Butoxyethanol detektiert wurden (s. Tabelle 4-14).

4.14 Transposonmutagenese BOE100

Insgesamt wurden ca. 22 000 Mutanten bei Transposonmutagenese-Versuchen mit BOE100 und dem Donor *E. coli* S17-1 mit dem Plasmid pCro2a erhalten und auf Wachstum mit Butoxyethanol gescreent. Das Screening erfolgte, indem einzelne Mutanten sowohl auf MM + Km + Glc- als auch auf MM + Km + BET-Platten ausgestrichen und inkubiert wurden und diejenigen ausgewählt worden sind, die kein Wachstum mit BET aufwiesen. In Abbildung 4.19 sind beispielhaft die Screening-Platten abgebildet, die zur Identifikation der knock-out Mutante P81 F22 führte.

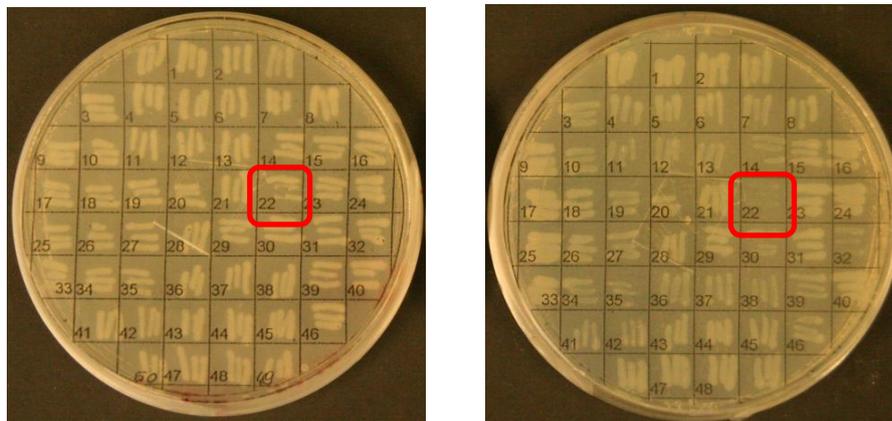


Abbildung 4.19 Screening von knock-out Mutanten

Abgebildet sind Screening-Platten für die Identifizierung von knock-out Mutanten. Bei den Platten handelte es sich um MM-Platten mit Kanamycin. Links diente Glucose als Substrat, rechts Butoxyethanol. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Mutante in Feld 22 mit Glc wachsen konnte, mit BET hingegen nicht, es handelte sich um eine knock-out Mutante. Diese Mutante (P81 F22) wurde daraufhin weiteren Untersuchungen unterzogen.

Es konnten insgesamt 24 knock-out Mutanten erhalten werden, die kein Wachstum mit BET aufweisen konnten (s. Tabelle 4-15). Die Mutanten erhielten die Bezeichnung „Px Fy“, wobei x für die Nummer der Screeningplatte steht (P für Platte) und y für die Feldnummer auf der Platte (F für Feld).

Tabelle 4-15 Knock-out Mutanten BOE100

Nr.	Mutante	Nr.	Mutante	Nr.	Mutante	Nr.	Mutante
1	P09 F11	7	P19 F28	13	P68 F23	19	P86 F38
2	P11 F15	8	P22 F29	14	P68 F50	20	P88 F37
3	P11 F47	9	P26 F04	15	P74 F28	21	P90 F29
4	P13 F16	10	P50 F27	16	P78 F44	22	P93 F25
5	P13 F44	11	P65 F48	17	P80 F29	23	P95 F5
6	P19 F04	12	P67 F25	18	P81 F22	24	P103 F44

Aufgelistet sind die durch Transposonmutagenese mit dem Plasmid pCro2a erhaltenen knock-out Mutanten von BOE100, die mit BET kein Wachstum aufweisen konnten.

Ergebnisse

Allen Mutanten außer der Mutante P13 F16 war gemein, dass BES weiterhin abgebaut wurde, das Etherspaltungsenzym demnach nicht inaktiviert worden war, sondern Gene im oberen Abbauweg. Das *n*-Butanol, Butoxyessigsäure und Butoxyethanol umfassende Substratpattern von 13 BOE100-knock-out Mutanten ist in Tabelle 4-16 zu finden.

Die inaktivierten Gene dieser 13 Mutanten wurden identifiziert, indem deren DNA isoliert, verdaut, zirkularisiert und in *E. coli* JM109 transformiert wurde (s. Kapitel 3.26). Da das Insert einen Replikationsursprung beinhaltet, konnten die durch die Zirkularisierung erhaltenen, das Insert tragenden Plasmide in *E. coli* replizieren. Das jeweilige Plasmid wurde isoliert und die Sequenz up- und downstream des Inserts mittels der Primer s4037 und s4052 sequenziert. Bei großen Plasmiden wurden ggf. weitere Genabschnitte mittels Primerwalking identifiziert. Tabelle 3-12 gibt Aufschluss über die Primer, die hierfür verwendet wurden (s. Kapitel 3.25 und 3.26)

Die erhaltenen Sequenzen wurden sowohl mit NCBI BLAST (Altschul et al., 1990) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysiert als auch gegen das Gesamtgenom von BOE100 gemappt. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 4-16 dargestellt.

Tabelle 4-16 Substratpattern der knock-out Mutanten von BOE100

Mutante	BOH	BES	BET	inaktiviertes Gen
P9 F11	+	+	-	Heme exporter protein CcmC
P11 F47	+	+	-	Heme exporter protein CcmA
P19 F28	+	+	-	Heme exporter protein CcmA
P50 F27	+	+	-	Heme exporter protein CcmB
P65 F48	+	+	-	Cytochrome c-type biogenesis protein CcmE
F67 F25	+	+	-	Cytochrome c-type biogenesis protein CcmF
P81 F22	+	+	-	Heme exporter protein CcmC
P95 F5	+	+	-	Cytochrome c-type biogenesis protein CcmF
P88 F37	+	+	-	Coenzyme PQQ biosynthesis protein pqqE
P13 F44	+	+	-	Phenylethanol degradative protein pedF
P22 F29	+	+	-	Phenylethanol degradative protein pedR2
P103 F44	+	+	-	Phenylethanol degradative protein pedS2
P13 F16	+	-	-	Disulphide bond formation protein DsbB

Die Tabelle zeigt, ob die BOE100-knock-out Mutanten, deren inaktivierten Gene identifiziert worden sind, mit Butoxyethanol (BET), Butanol (BOH) und Butoxyessigsäure (BES) wachsen konnten. Das + steht für Wachstum, das - für kein Wachstum. Getestet wurde sowohl in Flüssig- als auch auf Festmedium (MM + Km + Substrat).

Die Mutante P13 F16, die einzige, die mit BET nicht mehr wachsen konnte, mit BOH hingegen schon, wurde im Disulphide bond formation protein DsbB ausgeknockt. Dieses Enzym spielt keine direkte Rolle beim Abbau von Butoxyethanol. Es ist Bestandteil eines Enzymkomplexes, der in Proteinen Disulfidbrücken generiert (Collet & Bardwell, 2002). Die Inaktivierung dieses Genes hatte zur Folge, dass kein Wachstum mit BES stattfinden konnte. Es

ist daher sehr wahrscheinlich, dass (mindestens) ein für das Wachstum mit BET und BES nötiges Enzym Disulfidbrücken ausbildet.

In den übrigen Mutanten, die alle im oberen Abbauweg ausgeknockt worden waren, wurden insgesamt 9 unterschiedliche Gene inaktiviert. Die Gene konnten drei Genclustern zugeordnet werden: Dem Phenylethanol Dehydrogenase Gencluster *ped*, dem Cytochrom c Biogenese Gencluster *ccm* und dem Pyrrolochinolinchinon (PQQ) Biosynthese Gencluster *pqq*. Die Gene dieser Cluster wurden von Arias et al. (2008) im Zusammenhang mit dem Abbau von 2-Phenylethanol in *P. putida* U beschrieben. Die Oxidation von Phenylethanol zu Phenylethanal wurde von der PQQ- und Cytochrom c_{550} -abhängigen Alkoholdehydrogenase PedE katalysiert.

Abbildung 4.20 zeigt diese Gencluster aus dem Stamm BOE100 und die Tn5-Insertionsstellen der untersuchten Mutanten.

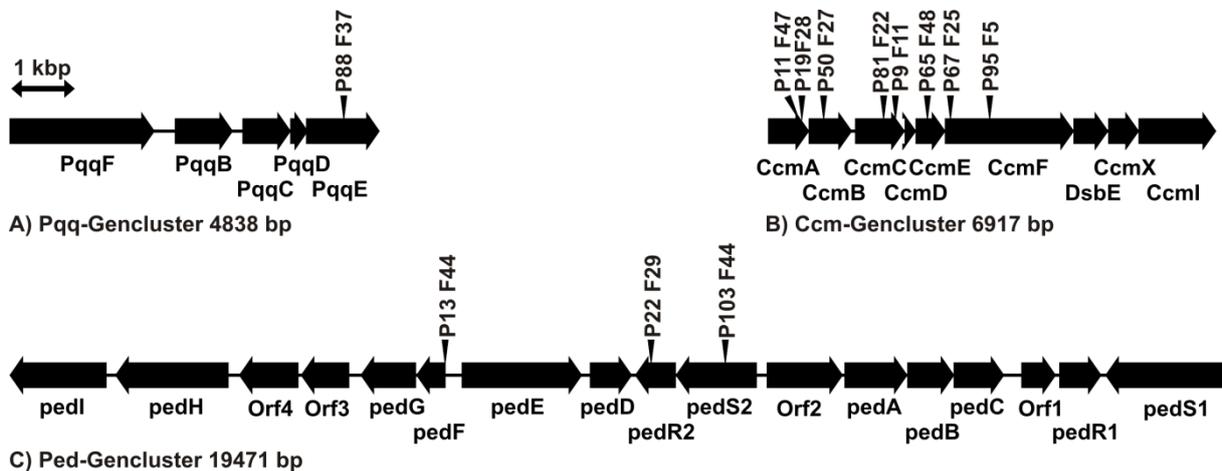


Abbildung 4.20 Gencluster der an der Oxidation von BET beteiligten Enzyme

Abgebildet sind die Gencluster, die für die BET-oxidierende Alkoholdehydrogenase und deren Cofaktoren codieren. Markiert sind die Tn5-Insertionsstellen in den einzelnen Mutanten. A) *Pqq*-Gencluster für die Synthese von PQQ; B) Gencluster *ccm* für die Biogenese von Coenzym c_{550} ; C) Gencluster *ped* der (Phenylethanol-)Alkoholdehydrogenase

Um zu überprüfen, ob die inaktivierten Gene *pedF* in der Mutante P13 F44 und *pedR2* in der Mutante P22 F29 neben ihrer entscheidenden Rolle beim Abbau von Butoxyethanol auch für den Abbau anderer Alkohole essentiell sind, wurden diese Mutanten sowie der Wildtyp in flüssigem Minimalmedium mit *n*-Pentanol, *n*-Hexanol und *n*-Octanol inkubiert und die OD_{546} zu Beginn, nach 5 und nach 7 Tagen gemessen. Abbildung 4.21 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Im Gegensatz zu dem Wildtyp waren die beiden untersuchten Mutanten nicht in der Lage mit Hexanol (B) und Octanol (C) zu wachsen. Die inaktivierten Gene waren demzufolge nicht ausschließlich für die Oxidation von Butoxyethanol nötig, sondern auch für die Oxidation der mittelkettigen Alkohole Hexanol und Octanol. Die OD_{546} -Werte sind im Anhang in Tabelle 7-8 zu finden.

Ergebnisse

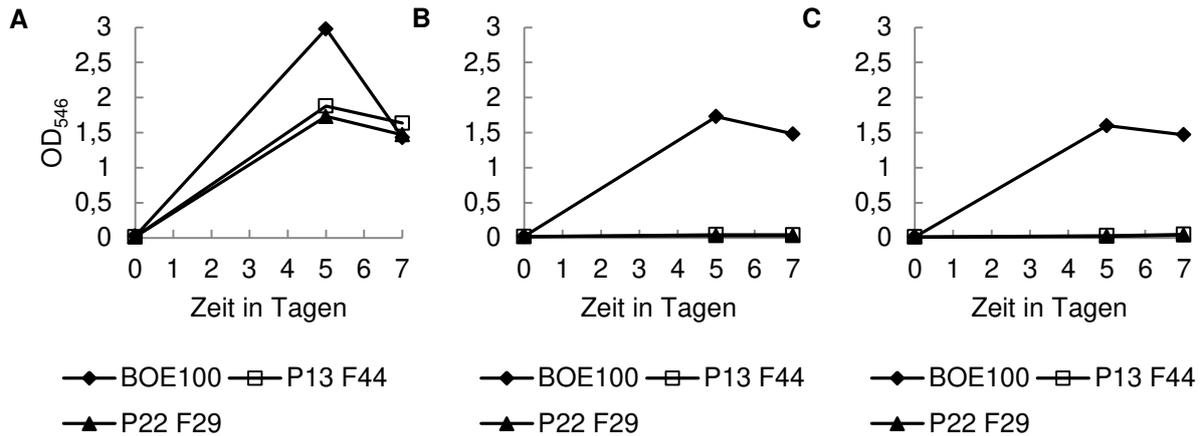


Abbildung 4.21 Wachstum von BOE100, P13 F44 und P22 F29 mit C5–C8-Alkoholen

BOE100 sowie dessen Mutanten P13 F44 ($\Delta pedF::Tn5$) und P22 F29 ($\Delta pedR_2::Tn5$) wurden 7 Tage lang daraufhin untersucht, ob sie in MM mit den Substraten **A**: *n*-Pentanol, **B**: *n*-Hexanol und **C**: *n*-Octanol wachsen können. Nur der Wildtyp BOE100 zeigte Wachstum mit allen genannten Alkoholen, die beiden Mutanten konnten nicht mehr mit Hexanol und Octanol wachsen. Die für den Abbau dieser Alkohole benötigten Gene *pedF* bzw. *pedR₂* waren ausgeknockt.

4.15 Transposonmutagenese BOE3

Die Transposonmutagenese-Versuche bei BOE3 mit dem Plasmid pCro2a lieferten etwa 4 500 Mutanten, von denen 30 kein oder zumindest vermindertes Wachstum mit Butoxyessigsäure zeigten. Es wurden demzufolge 30 BOE3-knock-out Mutanten erhalten, die M301 bis M330 benannt wurden. Die Mutanten M301–M316 stammten dabei von denjenigen Platten, bei denen der Filter beim Mating auf MM-Platten inkubiert worden war, die Mutanten M317–M330 von den Platten, bei denen der Filter auf LB inkubiert und die Suspension vor dem Plattieren zunächst 1:10 verdünnt worden war (s. Kapitel 3.25).

Die Mutanten wurden auf Wachstum mit den Substraten Butoxyethanol, Butoxyessigsäure und *n*-Butanol untersucht (s. Tabelle 4-17). Ziel war es, herauszufinden, in welchem Schritt der Abbau von BET bzw. BES unterbrochen worden war.

Alle Mutanten zeigten Wachstum mit BOH, weswegen eine Inaktivierung im unteren Abbauweg ausgeschlossen werden konnte. Des Weiteren zeigten alle Mutanten im Wesentlichen dasselbe Verhalten bei BET wie bei BES, nämlich entweder kein Wachstum, nur geringes Wachstum oder die Bildung von einzelnen Kolonien.

Die inaktivierten Gene von 12 Mutanten wurden durch iPCR oder durch Restriktion der DNA, Selbstligation und Klonierung in *E. coli* JM109 mit anschließender Sequenzierung des Plasmids identifiziert (s. Kapitel 3.26). Tabelle 4-18 zeigt die Ergebnisse.

Ergebnisse

Tabelle 4-17 Substratpattern BOE3-Mutanten

Mutante	BOH	BES	BET	Mutante	BOH	BES	BET	Mutante	BOH	BES	BET
M301	+	-	-	M311	+	-	-	M321	+	K	K
M302	+	-	-	M312	+	-	-	M322	+	K	K
M303	+	-	K	M313	+	-	-	M323	+	K	-
M304	+	-	-	M314	+	+-	+-	M324	+	-	K
M305	+	+-	+-	M315	+	-	-	M325	+	-	-
M306	+	-	-	M316	+	-	-	M326	+	-	-
M307	+	+-	+-	M317	+	K	K	M327	+	-	-
M308	+	+-	+-	M318	+	-	-	M328	+	-	-
M309	+	-	-	M319	+	-	-	M329	+	-	-
M310	+	-	-	M320	+	-	-	M330	+	-	-

Die Mutanten wurden auf Platte auf Wachstum mit Butanol (BOH), Butoxyessigsäure (BES) und Butoxyethanol (BET) untersucht. + bedeutet Wachstum, - bedeutet kein Wachstum, +- bedeutet deutlich vermindertes Wachstum und K steht für vereinzelte Kolonien.

Tabelle 4-18 Tn5-Insertionsstellen der BOE3-knock-out Mutanten

Mutante	Tn5-Insertionsstelle
M301	fatty acid hydroxylase EgeA
M302	fatty acid hydroxylase EgeA
M303	hypothetical protein EgeB
M304	fatty acid hydroxylase EgeA
M305	alpha/beta hydrolase
M306	fatty acid hydroxylase EgeA
M307	alpha/beta hydrolase
M308	alpha/beta hydrolase
M309	fatty acid hydroxylase EgeA
M310	fatty acid hydroxylase EgeA
M311	fatty acid hydroxylase EgeA
M318	fatty acid hydroxylase EgeA

Die Gene, in die das Transposon inseriert hatten, wurden in 12 BOE3-Mutanten durch inverse PCR oder durch Restriktion der genomischen DNA mit anschließender Selbstligation und Klonierung in *E. coli* JM109 identifiziert.

Durch Primerwalking konnten insgesamt 11 868 bp sequenziert werden. Die DNA-Sequenz ist im Anhang, Kapitel 7.3 zu finden. Die open reading frame-Detektion (ORF-Detektion) und Annotierung erfolgte sowohl durch den online Server RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) als auch durch NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Aziz et al., 2008; Overbeek et al., 2014; Brettin et al., 2015; Altschul et al., 1990). Abbildung 4.22 zeigt graphisch den in BOE3 insgesamt sequenzierten DNA-Abschnitt und die Positionen der Tn5-Inserts in den verschiedenen Mutanten. Die Ergebnisse der Annotierung sind in Tabelle 4-19 zu finden.

Ergebnisse

Bei 8 der untersuchten 12 BOE3-knock-out Mutanten, die kein Wachstum mit BET und BES aufweisen konnten, wurde das Gen „fatty acid hydroxylase“ inaktiviert (s. Tabelle 4-18), das im Folgenden mit *egeA* abgekürzt wird (Ethylen glycol ether). Die beiden nachfolgenden Gene, annotiert als „hypothetical proteins“, erhielten die Bezeichnungen *egeB* und *egeC*. Auch die Mutante M303, in der EgeB ausgeknockt worden war, konnte nicht mit BES wachsen.

Die Aminosäuresequenzen der Proteine Fettsäure-alpha-Hydroxylase EgeA, hypothetisches Protein EgeB und hypothetisches Protein EgeC sind im Anhang, Kapitel 7.5, zu finden.

Die Mutanten M305, M307 und M308, bei denen die alpha/beta Hydroxylase BOE3006 inaktiviert worden war, zeigten stark vermindertes, aber dennoch vorhandenes Wachstum mit BET und BES.

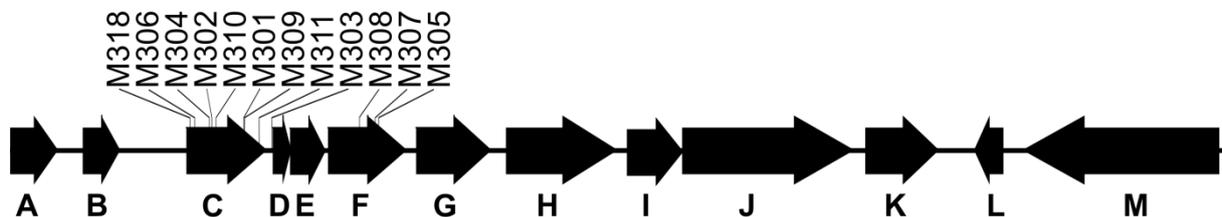


Abbildung 4.22 Sequenzierter DNA-Bereich in BOE3

Es wurden insgesamt 11 868 bp sequenziert. Die Annotation dieses DNA-Bereiches erfolgte sowohl durch den online Server RAST als auch durch NCBI BLAST. Die Bezeichnungen der 13 identifizierten Gene bzw. ORFs sind in Tabelle 4-19 zu finden. Die Tn5-Insertionsstellen der untersuchten Mutanten sind gekennzeichnet.

Tabelle 4-19 Annotierung BOE3

ORF	Gen-ID	start	stop	strand	function
A	BOE3001	1	465	+	transposase
B	BOE3002	715	1083	+	hypothetical protein
C	BOE3003	1729	2520	+	fatty acid hydroxylase (EgeA)
D	BOE3004	2565	2750	+	hypothetical protein (EgeB)
E	BOE3005	2747	3091	+	hypothetical protein (EgeC)
F	BOE3006	3116	3886	+	alpha/beta hydrolase
G	BOE3007	3976	4725	+	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase
H	BOE3008	4856	5944	+	TRAP transporter solute receptor
I	BOE3009	6028	6588	+	TRAP dicarboxylate transporter, DctQ subunit
J	BOE3010	6589	8269	+	TRAP dicarboxylate transporter, DctM subunit
K	BOE3011	8366	9091	+	transcriptional regulator, GntR family
L	BOE3012	9429	9716	-	transposase
M	BOE3013	9914	11836	-	mobile element protein

Die Annotierung des sequenzierten DNA-Bereiches von BOE3 erfolgte durch den online Server RAST und durch NCBI BLAST. Den einzelnen Genen wurden Gen-IDs zugewiesen (BOE3001–BOE3013). Die ORF-Nummerierung A–M nimmt Bezug auf Abbildung 4.22.

4.16 Genexpressionsanalyse BOE200

Die Genexpressionsanalyse, die vom Fraunhofer IGB durchgeführt wurde, hat ergeben dass im Stamm BOE200 beim Abbau von Butoxyethanol im Vergleich zum Abbau von Glucose insgesamt 806 Gene hoch- und 679 Gene herunterreguliert wurden (s. Abbildung 4.23). Betrachtet wurden die Gene, deren \log_2FC -Wert (Fold Change) größer war als 2 und deren FDR-Wert (False Discovery Rate) (Pawitan et al., 2005) kleiner war als 0,001, wodurch sich die Zahl der hochregulierten auf 154 und die der herunterregulierten auf 114 verringerte. Je-ne 154 BET-induzierten Gene sind in Abbildung 4.23 rot markiert und in Tabelle 4-20 aufgelistet.

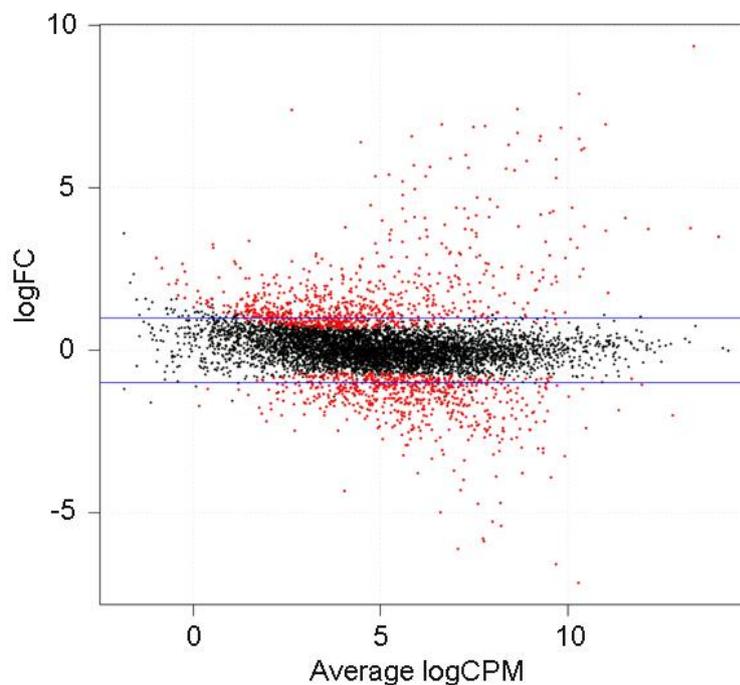


Abbildung 4.23 Genexpression BOE200

Dargestellt sind die von BOE200 exprimierten Gene beim BET-Abbau im Vergleich zum Glc-Abbau. Die x-Achse „average logCPM“ beschreibt das generelle Level der Expression eines Genes als Durchschnitt beider Induktionszustände (BET-induziert und Glucose-induziert), während die y-Achse „logFC“ anzeigt, in welchem Maß ein Gen beim Wachstum mit BET hoch- (> 0) bzw. herunterreguliert (< 0) wurde. Es handelt sich jeweils um den Logarithmus zur Basis 2. Die blauen Linien kennzeichnen eine zweifache Hoch- bzw. Herunterregulierung. Rot markiert wurden die Gene, deren FDR-Wert kleiner ist als 0,001.

Tabelle 4-20 Ergebnisse Genexpressionsanalyse BOE200

Gen-ID	Funktion	\log_2FC	\log_2CPM
BOE06968	taurine dioxygenase	9,36	13,35
BOE06969	2-keto-4-pentenoate hydratase	7,88	10,29
BOE07069	acyl-CoA dehydrogenase	7,41	8,65
BOE07071	acetyl-CoA dehydrogenase, C-terminal like	7,38	2,63
BOE07068	acetate permease	6,95	6,63
BOE07175	fatty-acyl-CoA synthase	6,94	11,00

Ergebnisse

Gen-ID	Funktion	log₂FC	log₂CPM
BOE03726	TetR family transcriptional regulator	6,89	7,78
BOE03134	nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	6,86	7,48
BOE06978	permease family protein	6,85	9,81
BOE05016	protein of unknown function (DUF2790)	6,69	8,66
BOE03725	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	6,58	9,26
BOE03617	hypothetical protein	6,57	5,82
BOE06979	fatty-acyl-CoA synthase	6,49	10,30
BOE05557	protein of unknown function (DUF2790)	6,44	9,25
BOE07070	acetyl-CoA dehydrogenase, C-terminal like	6,39	4,47
BOE02927	ATP-binding cassette, subfamily C	6,32	8,42
BOE06975	outer membrane porin, OprD family	6,20	10,43
BOE06977	acyl-CoA dehydrogenase	6,17	10,36
BOE07072	outer membrane porin, OprD family	5,99	7,27
BOE03133	acyl carrier protein	5,89	6,86
BOE01018	hypothetical protein	5,86	9,68
BOE06976	acetyl-CoA C-acetyltransferase	5,81	8,89
BOE02928	thymidylate kinase	5,70	5,89
BOE07174	membrane protein	5,63	6,32
BOE03136	DNA-binding protein	5,60	7,34
BOE03135	fatty-acyl-CoA synthase	5,59	8,35
BOE03837	enoyl-CoA hydratase	5,54	8,57
BOE02926	8-amino-7-oxononanoate synthase	5,41	5,23
BOE02929	thymidylate kinase	5,36	6,20
BOE07073	outer membrane porin, OprD family	5,35	4,86
BOE01689	porin	5,30	9,69
BOE05017	hypothetical protein	5,20	5,58
BOE03137	glycosyltransferase family A	4,96	5,91
BOE03140	diacylglycerol kinase family enzyme	4,77	5,59
BOE02931	LysR family transcriptional regulator	4,71	7,57
BOE03620	hypothetical protein	4,65	7,91
BOE03142	hypothetical protein	4,46	4,73
BOE02930	heptose-1-phosphate ethanolaminephosphotransferase	4,41	8,12
BOE03872	phenylacetaldehyde dehydrogenase	4,38	7,02
BOE02093	QbdB	4,38	10,11
BOE03138	lipopolysaccharide export system permease protein	4,36	5,58
BOE05030	transposase ISPs1	4,35	7,24
BOE01923	tartronate-semialdehyde synthase	4,27	9,60
BOE01922	hydroxypyruvate isomerase	4,22	9,52
BOE01921	2-Hydroxy-3-oxopropionate reductase	4,18	9,28
BOE01547	LysR family transcriptional regulator	4,14	7,55
BOE03141	hypothetical protein	4,10	5,90
BOE01024	RND transporter	4,09	7,90
BOE01025	fusaric acid resistance protein FusC	4,08	7,34
BOE02191	hypothetical protein	4,08	6,18
BOE02094	quinohemoprotein alcohol dehydrogenase ADH IIB	4,07	11,53
BOE03145	acyl-CoA thioesterase	3,99	5,04
BOE03139	lipopolysaccharide export system permease protein	3,96	5,67

Ergebnisse

Gen-ID	Funktion	log ₂ FC	log ₂ CPM
BOE03132	8-amino-7-oxononanoate synthase	3,87	6,71
BOE02092	phenylacetaldehyde dehydrogenase PeaE	3,82	10,43
BOE06858	choline dehydrogenase	3,80	8,68
BOE01026	protein of unknown function (DUF1656)	3,78	4,06
BOE02141	fatty acid hydroxylase superfamily protein EgeA	3,75	13,27
BOE02143	hypothetical protein EgeC	3,74	12,14
BOE02096	outer-membrane receptor for ferric coprogen and ferric-rhodotorulic acid	3,72	7,25
BOE04700	hypothetical protein	3,71	6,22
BOE07173	acetate permease	3,70	7,43
BOE02142	hypothetical protein EgeB	3,68	11,01
BOE01017	porin	3,60	7,55
BOE05130	protein of unknown function (DUF2790)	3,58	5,24
BOE03838	acetyl-CoA C-acetyltransferase	3,51	7,56
BOE06611	acyl-CoA dehydrogenase	3,50	6,24
BOE02144	GntR family transcriptional regulator	3,49	14,02
BOE01027	RND family efflux transporter	3,44	6,04
BOE02145	transposase, IS30 family	3,41	10,07
BOE03555	3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase	3,40	5,25
BOE03143	beta-hydroxylase	3,34	5,57
BOE01909	malate dehydrogenase	3,34	9,41
BOE06040	cyclic nucleotide-binding protein	3,28	6,63
BOE02097	siderophore-interacting protein	3,28	4,86
BOE06623	regulatory protein, luxR family	3,26	0,52
BOE06610	acyl-CoA dehydrogenase	3,16	7,38
BOE02095	fatty-acyl-CoA synthase	3,16	10,24
BOE01920	hydroxypyruvate reductase	3,14	6,75
BOE03556	acetyl-CoA synthetase	3,01	6,86
BOE06609	succinyl-CoA:acetate CoA-transferase	3,01	7,10
BOE03997	ABC-2 type transport system permease protein	3,00	4,91
BOE03871	quinoxemoprotein amine dehydrogenase, alpha subunit	2,96	6,83
BOE03870	quinoxemoprotein amine dehydrogenase	2,95	7,13
BOE03554	acetyl-CoA acetyltransferase	2,94	6,22
BOE03619	protein of unknown function (DUF2789)	2,91	7,65
BOE06024	acyl-CoA dehydrogenase	2,91	9,51
BOE00081	relaxase	2,88	3,27
BOE05408	bacteriophage replication gene A protein	2,87	7,56
BOE02590	ATPase	2,86	5,29
BOE03869	quinoxemoprotein amine dehydrogenase, gamma subunit	2,86	5,69
BOE07247	transposase	2,83	9,93
BOE06041	DNA polymerase III subunit epsilon	2,82	3,43
BOE02933	3-carboxymuconate cyclase	2,82	4,51
BOE02932	hypothetical protein	2,72	2,63
BOE07115	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	2,68	3,33
BOE01919	pyruvate kinase	2,68	7,80
BOE06970	transposase ISPs1	2,67	7,88
BOE07117	acyl-CoA thioesterase	2,67	1,13
BOE05771	gamma-glutamyl-gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	2,61	4,45

Ergebnisse

Gen-ID	Funktion	log₂FC	log₂CPM
BOE02147	hypothetical protein	2,60	7,02
BOE02457	hypothetical protein	2,60	3,67
BOE02098	RNA polymerase sigma factor	2,59	5,04
BOE06971	transposase IS5	2,58	8,76
BOE02456	hypothetical protein	2,58	5,08
BOE02011	Ser-tRNA(Ala) deacylase AlaX	2,54	4,45
BOE06624	hypothetical protein	2,54	1,26
BOE03146	multidrug DMT transporter permease	2,51	3,97
BOE03973	isocitrate lyase	2,49	10,40
BOE07118	3-oxoadipyl-CoA thiolase	2,49	2,94
BOE02409	hypothetical protein	2,46	7,82
BOE02452	hypothetical protein	2,43	3,10
BOE00166	MarR family transcriptional regulator	2,41	5,49
BOE02146	hypothetical protein	2,39	9,04
BOE04487	hypothetical protein	2,38	4,36
BOE00053	hypothetical protein	2,37	6,57
BOE00167	uncharacterized membrane protein YccC	2,35	5,93
BOE01915	glycolate oxidase subunit GlcD	2,35	7,77
BOE01916	glycolate oxidase	2,33	6,29
BOE02632	H+/gluconate symporter	2,31	3,97
BOE06857	reverse transcriptase	2,30	6,02
BOE01948	membrane protein	2,30	6,99
BOE01626	multifunctional fatty acid oxidation complex	2,26	10,32
BOE03615	hypothetical protein	2,26	5,37
BOE03732	cyanate hydratase	2,25	4,00
BOE07114	2-(1,2-epoxy-1,2-dihydrophenyl)acetyl-CoA isomerase	2,25	2,16
BOE03144	uncharacterized conserved protein	2,24	7,06
BOE01210	hypothetical protein	2,23	2,57
BOE03868	quinohemoprotein amine dehydrogenase, beta subunit	2,23	6,82
BOE01949	actetate permease	2,22	8,68
BOE05123	ATP-NAD kinase	2,22	1,39
BOE07116	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	2,21	1,49
BOE02398	3-oxoacid CoA-transferase	2,19	7,10
BOE00168	protein of unknown function (DUF1656)	2,18	4,21
BOE02010	2OG-Fe(II) oxygenase superfamily protein	2,18	4,00
BOE06986	transposase	2,16	4,45
BOE02586	flavin-binding monooxygenase-like	2,16	3,05
BOE06831	protein disulfide isomerase	2,14	4,99
BOE01910	L-lactate permease	2,13	9,24
BOE01908	LrgB family protein	2,12	6,87
BOE06824	hypothetical protein	2,11	5,58
BOE06835	sex pilus assembly protein	2,11	5,74
BOE04905	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	2,10	9,70
BOE01914	glycolate oxidase FAD binding subunit	2,09	7,65
BOE06379	high-affinity iron transporter	2,09	4,68
BOE06974	transposase	2,08	5,90
BOE02009	lysine transporter LysE	2,07	2,87

Ergebnisse

Gen-ID	Funktion	log ₂ FC	log ₂ CPM
BOE06852	hypothetical protein	2,06	3,99
BOE02183	hypothetical protein	2,06	2,20
BOE06313	hypothetical protein	2,06	1,89
BOE00602	hypothetical protein	2,04	7,10
BOE00813	phospholipid-binding protein	2,04	5,08
BOE00052	acetyl-CoA hydrolase	2,03	9,57
BOE05122	Pyruvate dehydrogenase E1 component	2,01	2,00

Aufgelistet sind die bei der Genexpressionsanalyse identifizierten BET-induzierten Gene im Stamm BOE200, deren log₂FC-Wert größer war als 2 und deren FDR-Wert kleiner war als 0,001. „log₂FC“ zeigt an, in welchem Maß ein Gen beim Wachstum mit BET im Vergleich zum Wachstum mit Glc hochreguliert wurde, während „log₂CPM“ das generelle Level der Expression eines Genes als Durchschnitt beider Induktionszustände beschreibt.

Der Abbau von BET verläuft voraussichtlich über die Oxidation der Hydroxyl- zur Carboxylgruppe. Anschließend erfolgt die Etherspaltung, bei der Butanol und Glyoxylat entstehen, die weiter abgebaut werden.

Exprimiert wurden unter anderem Gene zugehörig zum Glyoxylat-Metabolismus (Gen-ID BOE01914, BOE01915, BOE01916, BOE01920, BOE01921, BOE01922, BOE01923, BOE03973), zum Pyruvat-Metabolismus (BOE01909, BOE01919, BOE03556), zum Butanoat-Metabolismus (BOE06609, BOE03554), zum Fettsäuretransport und -metabolismus (BOE02095, BOE03133, BOE03135, BOE03137, BOE03140, BOE03145, BOE03555, BOE03725, BOE03837, BOE03838, BOE06610, BOE06611, BOE06976, BOE06977, BOE06979, BOE07069, BOE07070, BOE07071, BOE07115, BOE07116, BOE07175), zum Transport (BOE01017, BOE01024, BOE01025, BOE01689, BOE01910, BOE02096, BOE02097, BOE02927, BOE02933, BOE03146, BOE03997, BOE06975, BOE06978, BOE07068, BOE07072, BOE07073, BOE07173, BOE07174) und zur Zellwand und -membran Biogenese (BOE01908, BOE02930, BOE03134).

Das „fatty acid hydroxylase superfamily protein“ mit der Gen-ID BOE02141 wurde hochreguliert, genauso wie die beiden downstream gelegenen „hypothetical proteins“ BOE02142 und BOE02143.

Die Aminosäuresequenzen dieser drei Proteine sind im Anhang, Kapitel 7.5, zu finden. Sie wurden mit denen von EgeA, EgeB und EgeC aus BOE3 mittels BLAST alignt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dabei hat sich gezeigt, dass zwischen den Enzymen große Homologien bestehen. EgeA und BOE02141 stimmen in 73 % der Sequenz überein (83 % positives), EgeB und BOE02142 in 51 % (71 % positives) und EgeC und BOE02143 in 44 % (51 % positives). Daher erhielten diese Proteine aus BOE200 die Bezeichnungen EgeA(P), EgeB(P) und EgeC(P), wobei das „P“ für „*Pseudomonas*“ steht. Die Proteine aus BOE3 erhielten analog die Ergänzung „B3“ (für BOE3). Die Alignments sind zu finden in Abbildung 4.24 (EgeA), Abbildung 4.25 (EgeB) und Abbildung 4.26 (EgeC).

Ergebnisse

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
402 bits (1032)	5e ⁻¹⁴⁶	Compositional matrix adjust.	188/263(71 %)	219/263(83 %)	0/263(0 %)
BOE3	1	MELVHSPMGLRQRKYREIYRSRLSGFYNGYYHAFLIFGVGLYEIYFATRHSNVLWWEWL			60
		ME+ +SPM RQR+YRE+YRSR SG+YNGY HAFLIFG+GLY I+F T ++S VLWWEWL			
BOE200	1	MEIHNSPMNERQRRYREVYRSRTSGWYNGYVHAFLIFGIGLYAIFFFTMNLSEVLWWEWL			60
BOE3	61	FVPAVFLFAQWVEYLFHRFLAHRPSKSPFWRLAYVRHTLMHHQFFTAEEPRFASHKDWRV			120
		+P VFL QWVEY HRFL HRP KS RL YVRHTLMHHQFFTAEEPR+A+H+DWRV			
BOE200	61	TIPVVFLLGGQWVEYYTHRFLLRPKKSGMGRLLYVRHTLMHHQFFTAEEPRYANHRDWRV			120
BOE3	121	TIFPPFTLVFFTLTIPFAFLAGIIISVNVGWLILATAIGSYVfyELHFLCHVDDNWFL			180
		T+FPPFTL TL +P A +AG +IS NVGWL++A+ IG+Y+FYE+LHFLCHV DNWF+			
BOE200	121	TLFPPFTLTISTLMMLPSALVAGWVISGNVGLLMASTIGTYLFYEVHLHFLCHVGDNWFL			180
BOE3	181	RHCPIVNTARRHHTAHDSSVMMEYNMSIVFPFWDWVYGTSDLDRLGFLGHLFNGYSTKYV			240
		RHCPIVNTARRHHTAHH+ S+MME NMSIVFPFWDWVYGTSDLDRLGHLFNGYSTK++			
BOE200	181	RHCPIVNTARRHHTAHHNHSIMMETNMSIVFPFWDWVYGTSDLDRLGHLGHLFNGYSTKHI			240
BOE3	241	KKDLRKRKTPVETPIDTKPDR			263
		KKDLR+T KTP P +K +			
BOE200	241	KKDLRQTAKTPHLLPHVSKASSK			263

Abbildung 4.24 Sequenz-Alignment EgeA aus BOE3 und BOE200

Die Aminosäuresequenzen der Fettsäure-alpha-Hydroxylase EgeA aus BOE3 und BOE200 wurden mittels BLAST alignt. Sie stimmen zu 71 % überein (83 % Positives, 0 Gaps).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
59.7 bits (143)	2e ⁻¹⁹	Compositional matrix adjust.	29/57(51 %)	41/57(71 %)	0/57(0 %)
BOE3	1	MPVGKVKMFVLLLCAGVLGYWIEVAMGMERNIPYLIVLVVFLMLGLWSMSAVQKKD			57
		MP KK++FS LLL AGV+GY IE+ G E + +L LVV LM+GLW++S V +++			
BOE200	1	MPASKKLVFSALLLIAGVIGYLIEIKTGRELLGHLGALVLLMVGLWALSPVDREE			57

Abbildung 4.25 Sequenz-Alignment EgeB aus BOE3 und BOE200

Die Aminosäuresequenzen der hypothetischen Proteine EgeB aus BOE3 und BOE200 wurden mittels BLAST alignt. Sie stimmen zu 51 % überein (71 % Positives, 0 Gaps).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
79.7 bits (195)	2e ⁻²⁵	Compositional matrix adjust.	47/107(44 %)	55/107(51 %)	0/107(0 %)
BOE3	1	MIKIAQEQPSAGIYSGERTIDGLVVMYKGAPLTKLLALDETSNDDFEWGYEGDSPARLAH			60
		M A+ A Y+GERTIDGL V G L L S FEWGYEG P +LA			
BOE200	1	MNNPAKSNHPADHYAGERTIDGLCVTVNGKALPTFDDLVTYSKGGFEWGYEGAEPEVQLAF			60
BOE3	61	ALLLHRTGDPVADAFSIRLMVQFVAKLDNEWVREDQLDRLEIEIQ			107
		ALL R D A + LM + VA L NEW++ DQLD I +Q			
BOE200	61	ALLYSLRDVEAACELAPVLMKRIVANLANEWDISGDQLDETIAILQ			107

Abbildung 4.26 Sequenz-Alignment EgeC aus BOE3 und BOE200

Die Aminosäuresequenzen der hypothetischen Proteine EgeC aus BOE3 und BOE200 wurden mittels BLAST alignt. Sie stimmen zu 44 % überein (51 % Positives, 0 Gaps).

Die Anordnung dieser Gene in BOE200 ist illustriert in Abbildung 4.27. Upstream von *egeA* ist ein Transposase-Gen (DDE family) zu finden, downstream von *egeC* ein Gen für einen Transkriptionsregulator der GntR-Familie, dann ein weiteres Transposase-Gen (IS30 family).

Wie diese Gene in BOE3 organisiert sind, wurde bereits in Kapitel 4.15 (Abbildung 4.22) beschrieben.

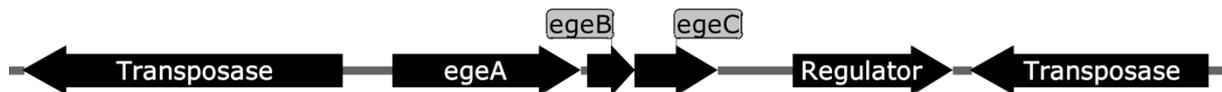


Abbildung 4.27 Gencluster *egeABC* in BOE200

Zu sehen ist ein Ausschnitt des Genoms von BOE200. Die Gene *egeA* (Fettsäure-alpha-Hydroxylase), *egeB* (hypothetical protein) und *egeC* (hypothetical protein) sind hintereinander angeordnet. Upstream findet sich ein Gen für eine Transposase der DDE-Familie, downstream ein Gen für einen Transkriptionsregulator der GntR-Familie und ein Gen für eine Transposase der IS30-Familie.

4.17 Die Etherspaltungsenzyme EgeA, EgeB und EgeC

In den Stämmen BOE3 und BOE200 wurden die Enzyme identifiziert, die an der Spaltung des Ethers beteiligt sind. Es handelt sich um die drei Gene *egeA*, *egeB* und *egeC*. Die Nukleotidsequenzen dieser Gene sind im Anhang in Kapitel 7.4 zu finden. Um zwischen den Proteinen aus BOE3 und BOE200 zu unterscheiden, erhielten sie die Erweiterung „(B3)“ für die Proteine aus BOE3 und „(P)“ für die aus *Pseudomonas vancouverensis* BOE200.

Die Aminosäuresequenzen der Proteine wurden mit Hilfe verschiedener Datenbanken und Analysetools untersucht, um mehr über die Verwandtschaft zu anderen Enzymen und mögliche Wirkmechanismen in Erfahrung zu bringen.

4.17.1 EgeA

EgeA(B3) besteht aus 263 aa, hat ein Molekulargewicht von 31,6 kDa und einen pI von 9,47 (berechnet mit ExPasy, https://web.expasy.org/compute_pi/). EgeA(P) ist 271 aa lang bei einem MW von 31,9 kDa und einem pI von 9,72.

Um Informationen über die Funktionsweise des Enzyms zu bekommen, wurden die Aminosäuresequenzen von EgeA(B3) und EgeA(P) mit Hilfe der NCBI BLAST Datenbank blastp (Altschul et al., 1990) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit bekannten Sequenzen verglichen und auf bekannte Motive hin analysiert. Die 5 besten Treffer sind für EgeA(B3) in Tabelle 4-21, für EgeA(P) in Tabelle 4-22 aufgelistet.

EgeA zählt zur „fatty acid hydroxylase family“. Konservierte Domänen zeigen Zugehörigkeiten zu pfam04116: FA_hydroxylase (Fatty acid hydroxylase superfamily) (Punta et al., 2012).

Ergebnisse

Zu dieser Superfamily zählen neben der Fettsäure-Hydroxylase auch die Beta-Carotin-Hydroxylase, die C-5-Sterol-Desaturase und die C-4-Sterol-methyl-Oxidase.

Tabelle 4-21 blastp-Ergebnisse EgeA(B3) aus BOE3

Description	Identities	Positives	Gaps	Accession number
fatty acid hydroxylase [<i>Alicyclophilus</i> sp. B1]	263/263 (100 %)	263/263 (100 %)	0/263 (0 %)	WP_059401909.1
fatty acid hydroxylase [<i>Ralstonia pickettii</i>]	260/263 (98,9 %)	260/263 (98,9 %)	0/263 (0 %)	WP_024972732.1
fatty acid hydroxylase [<i>Macromonas</i> sp. BK-30]	255/263 (97 %)	259/263 (98,5 %)	0/263 (0 %)	WP_101049612.1
fatty acid hydroxylase [<i>Halomonas</i> sp. KO11 plasmid]	188/263 (71,5 %)	218/263 (82,9 %)	0/263 (0 %)	WP_035564175.1
fatty acid hydroxylase [<i>Halomonas</i> sp. BC2]	188/263 (71,5 %)	218/263 (82,9 %)	0/263 (0 %)	WP_081139115.1

Tabelle 4-22 blastp-Ergebnisse EgeA(P) aus BOE200

Description	Identities	Positives	Gaps	Accession number
fatty acid hydroxylase [<i>Halomonas</i> sp. KO11 plasmid]	270/271 (99,6 %)	270/271 (99,6 %)	0/271 (0 %)	WP_035564175.1
fatty acid hydroxylase [<i>Halomonas</i> sp. BC2]	270/271 (99,6 %)	270/271 (99,6 %)	0/271 (0 %)	WP_081139115.1
fatty acid hydroxylase [<i>Alicyclophilus</i> sp. B1]	188/263 (71,5 %)	219/263 (83,3 %)	0/263 (0 %)	WP_059401909.1
fatty acid hydroxylase [<i>Macromonas</i> sp. BK-30]	186/263 (70,7 %)	219/263 (83,3 %)	0/263 (0 %)	WP_101049612.1
fatty acid hydroxylase [<i>Ralstonia pickettii</i>]	186/263 (70,7 %)	217/263 (82,5 %)	0/263 (0 %)	WP_024972732.1

Für eine genauere Bestimmung der Funktion dieses Enzyms wurden die Sequenz mit dem MPI Bioinformatics Toolkit „HHpred“ (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de>) analysiert (Söding, 2005; Hildebrand et al., 2009; Zimmermann et al., 2017). Hier werden neben dem reinen Sequenzvergleich zusätzlich profile Hidden Markov models (HMMs) paarweise miteinander verglichen (Yoon, 2009) und Sekundärstrukturen bei der Homologie-Analyse berücksichtigt (Kabsch & Sander, 1983). Die Suche mit der Datenbank PDB_mmCIF70_25_Jan ergab als Treffer mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für eine Verwandtschaft für beide Sequenzen die Ceramide very long chain fatty acid hydroxylase SCS7 aus *Saccharomyces cerevisiae* strain ATCC 204508/S288c (Protein Data Bank PDB 4ZR0 bzw. 4ZR1 für die Hydroxylase-Domäne). Die Wahrscheinlichkeiten waren mit 99,9 % (E-value: $2e^{-23}$) für die Sequenz aus BOE3 und 99,8 % (E-value: $4,9e^{-22}$) für die aus BOE200 sehr hoch. Ein weiterer Treffer mit nur noch 51,5 % Wahrscheinlichkeit für EgeA(B3) und immerhin noch 89 % für EgeA(P) war die Stearoyl-Coenzym A Desaturase 1Scd1 aus *Mus musculus* (PDB 4YMK). Die Ergebnisse der HHpred-Analyse sind in Tabelle 4-23 zu finden.

Tabelle 4-23 HHpred-Analyse von EgeA, EgeB und EgeC

PDB-Hit	Name	Probability	E-value	SS	Cols	Target Length	Literatur
EgeA(B3) (263 aa)							
4ZR1	Ceramide very long chain fatty acid hydroxylase SCS7, hydroxylase domain (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c))	99,9	2e ⁻²³	21,2	214	298	(Zhu et al., 2015)
4ZR0	Ceramide very long chain fatty acid hydroxylase SCS7, full length scs7p (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c))	99,8	1,2e ⁻²⁰	20,2	190	392	(Zhu et al., 2015)
4YMK	Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Scd1 (<i>Mus musculus</i>)	51,5	210	18,4	215	339	(Bai et al., 2015)
EgeA(P) (271 aa)							
4ZR1	Ceramide very long chain fatty acid hydroxylase SCS7, hydroxylase domain (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c))	99,8	4,9e ⁻²²	20,5	182	298	(Zhu et al., 2015)
4ZR0	Ceramide very long chain fatty acid hydroxylase SCS7, full length scs7p (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c))	99,8	2,4e ⁻²⁰	19,6	183	392	(Zhu et al., 2015)
4YMK	Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Scd1 (<i>Mus musculus</i>)	89	15	16,1	182	339	(Bai et al., 2015)
EgeB(B3) (61 aa)							
5GAE_h	Protein translocase subunit SecE (<i>Escherichia coli</i>)	89,3	1,2	5,3	44	127	(Jomaa et al., 2016)
4LDS	Glucose-Transporter GlcP _{se} (<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228)	75	6	3,4	55	446	(Iancu et al., 2013)
4J05	Phosphate transporter P1PT (<i>Piriformospora indica</i>)	70,4	19	5	55	530	(Pedersen et al., 2013)
4IL3	CAAX protease Ste24p (<i>Saccharomyces mikatae</i>)	54,9	85	6,2	47	461	(Pryor et al., 2013)
6EI3	Proton-dependent oligopeptide transporter family protein (<i>Xanthomonas campestris</i>)	54,8	80	6	55	514	(Parker et al., 2017)
EgeB(P) (66 aa)							
5GAE_h	Protein translocase subunit SecE (<i>Escherichia coli</i>)	90,5	0,9	5,7	44	127	(Jomaa et al., 2016)
4LDS	Glucose-Transporter GlcP _{se} (<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228)	87,7	1,4	4,6	60	446	(Iancu et al., 2013)
4J05	Phosphate transporter P1PT (<i>Piriformospora indica</i>)	81,5	7,4	5,7	60	530	(Pedersen et al., 2013)
4ZP0	Multidrug transporter MdfA (<i>Escherichia coli</i> (strain K12))	76,1	17	5,9	60	392	(Heng et al., 2015)
4Q65	Proton-dependent oligopeptide transporter YbgH (<i>Escherichia coli</i>)	75,3	18	5,9	60	493	(Zhao et al., 2014)
4XNJ	Peptide transporter PepT _{St} (<i>Streptococcus thermophilus</i> LMG 18311)	73,4	24	6	60	483	(Huang et al., 2015)
2CFQ	Lactose permease LacY (<i>Escherichia coli</i>)	73	21	5,5	60	417	(Mirza et al., 2006)
6EI3	Proton-dependent oligopeptide transporter family protein (<i>Xanthomonas campestris</i>)	72,4	27	6,4	60	514	(Parker et al., 2017)
4YB9	Bovine Fructose Transporter GLUT5 (<i>Bos taurus</i>)	72,3	25	6	60	479	(Nomura et al., 2015)

PDB-Hit	Name	Probability	E-value	SS	Cols	Target Length	Literatur
EgeC(B3) (114 aa)							
4X86_A	Ubiquitin-like protein Ubl4A of BAG6-Ubl4a complex; tail-anchored trans-membrane protein biogenesis (<i>Homo sapiens</i>)	55,2	58	5,5	52	58	(Kuwabara et al., 2015)
2WX4	mRNA-decapping enzyme subunit 1 DCP1 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	42,4	96	4,8	35	46	(Tritschler et al., 2009)
1Y6U	Excisionase Tn916Xis (transposon Tn916) (<i>Enterococcus faecalis</i>)	40,9	41	2,4	22	70	(Abbani et al., 2005)
3CL6	Allantoinase Puue (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	39,5	93	4,6	40	308	(Ramazzina et al., 2008)
5G1W	Linalool Dehydratase-Isomerase LinD (<i>Castellaniella defragrans</i> 65Pphen)	39,4	99	5,2	61	372	(Nestl et al., 2017)
1Z4H	Tor inhibition protein/excisionase Tor1 (<i>Escherichia coli</i>)	38,2	49	2,4	26	66	(Elantak et al., 2005)
4QK0	Beta-L-arabinofuranosidase GH127 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i> T6)	37,1	120	5,4	44	648	To be published
EgeC(P) (121 aa)							
2WX4	mRNA-decapping enzyme subunit 1 DCP1 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	57,4	51	4,8	35	46	(Tritschler et al., 2009)
4X86_A	Ubiquitin-like protein Ubl4A of BAG6-Ubl4a complex; tail-anchored trans-membrane protein biogenesis (<i>Homo sapiens</i>)	45,9	91	6,6	57	58	(Kuwabara et al., 2015)
5G1W	Linalool Dehydratase-Isomerase LinD (<i>Castellaniella defragrans</i> 65Pphen)	40,9	86	5,1	55	372	(Nestl et al., 2017)
1Y6U	Excisionase Tn916Xis (transposon Tn916) (<i>Enterococcus faecalis</i>)	40,8	39	2,3	22	70	(Abbani et al., 2005)
3CL6	Allantoinase Puue (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	40,6	77	4,4	40	308	(Ramazzina et al., 2008)
2WX3	mRNA-decapping enzyme subunit 1 DCP1a (<i>Homo sapiens</i>)	40,6	110	4,8	35	51	(Tritschler et al., 2009)
3AWU_B	Tyrosinase co-factor MelC (<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>)	37,8	46	2,7	22	134	(Matoba et al., 2011)

Die Aminosäuresequenzen von EgeA, EgeB und EgeC aus BOE3 und BOE200 wurden mit HHpred analysiert. Aufgelistet sind die Treffer mit den höchsten Wahrscheinlichkeiten (Probability). SS: Secondary structure scoring; Cols: aligned columns; Target length: Länge des Zielproteins

SCS7 ist ein Enzym, das bei der Synthese von Sphingolipiden in *Saccharomyces cerevisiae* die alpha-Hydroxylierung der über eine Amid-Bindung verbundenen Fettsäure und damit die Reaktion von Inositolphosphorylceramid-B (IPC-B) zu Inositolphosphorylceramid-C (IPC-C) katalysiert (Zhu et al., 2015; Dunn et al., 1998; Haak et al., 1997). Diese Reaktion ist in Abbildung 4.28 dargestellt.

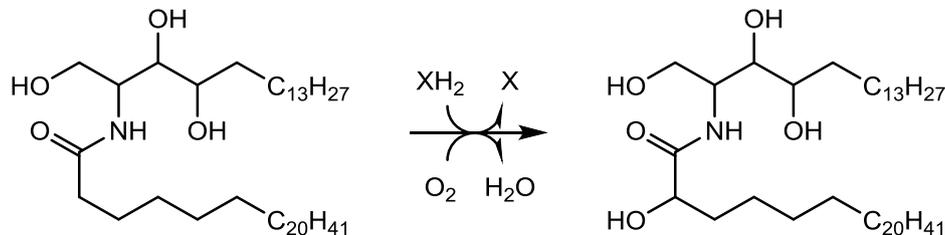


Abbildung 4.28 Die von SCS7 katalysierte Reaktion von IPC-B zu IPC-C

In *Saccharomyces cerevisiae* strain ATCC 204508 katalysiert die Ceramide very long chain fatty acid hydroxylase SCS7 die Reaktion von Inositolphosphorylceramid-B (IPC-B) zu Inositolphosphorylceramid-C (IPC-C). Hierbei wird der Fettsäurerest an alpha-Position hydroxyliert.

Um eine 3D-Proteinstruktur und weitere Informationen zur Funktion von EgeA zu erhalten, wurden die Sequenzen von EgeA(B3) und EgeA(P) mit dem 3D-Proteinstruktur- und Proteinfunktionsvorhersagetool I-TASSER analysiert (Zhang, 2008; Roy et al., 2010; Yang et al., 2015) (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Strukturmodelle wurden für die Proteine erstellt. Sie sind in Abbildung 4.29 dargestellt. Dabei wird die Qualität des Modells mit dem C-score gemessen. Der C-score liegt in einem Bereich von -5 bis 2 und es gilt, je höher der Wert desto genauer das Modell. Für das dargestellte Modell von EgeA(B3) lag er bei -0,78, für das von EgeA(P) bei -1,13.

I-TASSER verwendet das TM-align structural alignment program, um das erstellte Modell mit bekannten zu vergleichen. Die höchste Strukturübereinstimmung haben EgeA(B3) und Ege(P) demnach mit der Hydroxylase-Domäne der Ceramide very long chain fatty acid hydroxylase SCS7 (PDB 4ZR1) (TM-score 0,765 bzw. 0,748). Die zweithöchste Übereinstimmung (TM-score 0,485 bzw. 0,471) gab es mit der Stearoyl-CoA Desaturase aus *Homo sapiens* (PDB 4ZYO).

Mit Hilfe des TMHMM Servers (V 2.0) wurden die Sequenzen von EgeA(B3) und EgeA(P) auf Transmembranstrukturen hin untersucht (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Sonnhammer et al., 1998). Es wurden jeweils vier Transmembranhelices detektiert. EgeA ist demnach ein Membranprotein. Die Transmembranbereiche sind in Abbildung 4.29 in unterschiedlichen Grüntönen markiert. Die Außenbereiche des Proteins sind in Pink und Violett gehalten, die inneren in Blau. Rot markiert sind in der Graphik die konservierten Histidine (HX₍₂₋₃₎(XH)H-Motive, „Histidin-Boxen“), die für diese Proteinfamilie charakteristisch sind (Shanklin et al., 1994; Zhu et al., 2015)

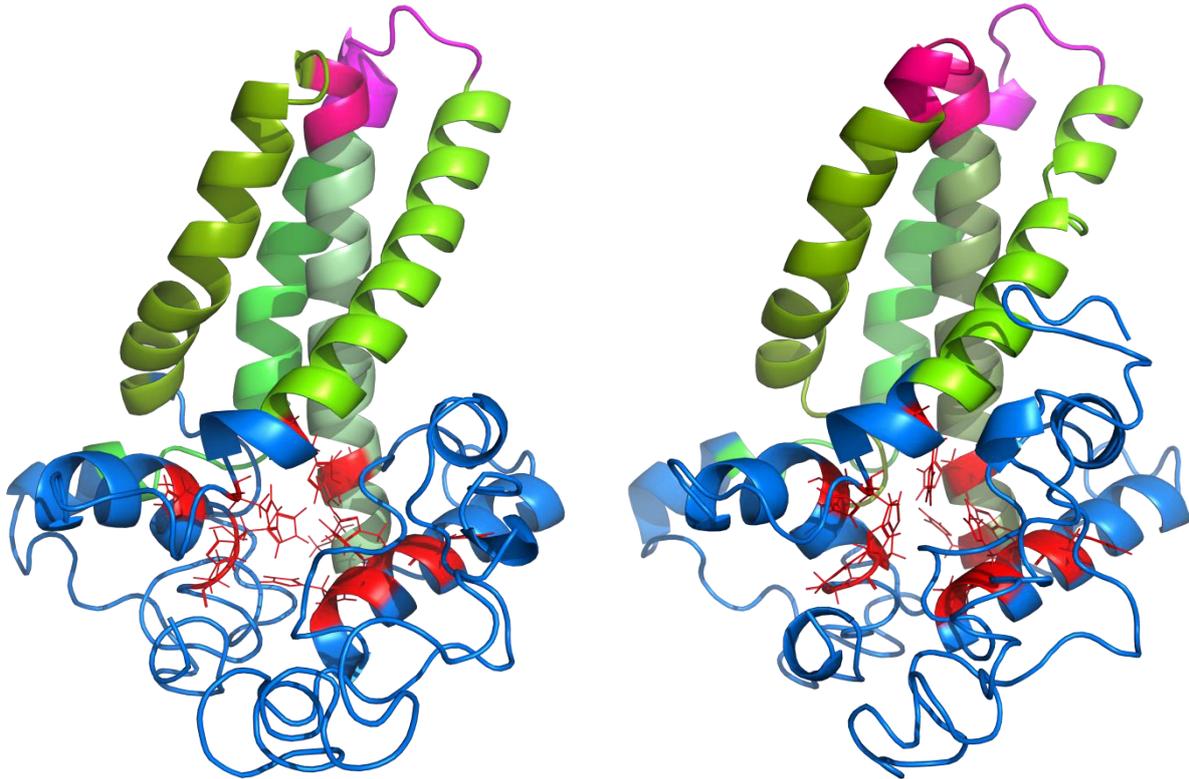


Abbildung 4.29 Strukturmodelle für EgeA

Mit I-TASSER wurden Proteinstruktur-Modelle für EgeA(B3) (links) und EgeA(P) (rechts) erstellt. Grün markiert sind Transmembranbereiche, pink/violett stellen die Außenbereiche dar, die blau markierten Bereiche befinden sich im inneren der Zelle. Die konservierten $HX_{(2-3)}(XH)H$ -Motive sind rot markiert.

Um mögliche konservierte, alpha-Hydroxylase-typische Aminosäuren zu ermitteln, wurden die Sequenzen von SCS7, EgeA(B3) und EgeA(P) mit dem Programm Clustal Omega aligniert (Sievers et al., 2011) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Die Aminosäuresequenz von SCS7 ist im Anhang in Kapitel 7.5 zu finden. Das Alignment ist in Abbildung 4.30 dargestellt.

SCS7 hat eine Länge von 392 Aminosäuren, EgeA(B3) von 263 und EgeA(P) von 271. Bei allen drei Sequenzen gab es insgesamt 41 Übereinstimmungen, die in der Abbildung grau unterlegt sind. Klar zu erkennen war, dass die für diese Proteinfamilie typischen vier Histidin-Boxen in allen drei Stämmen konserviert waren. Sie wurden in der Abbildung gelb markiert.

Ergebnisse

SCS7	MSTNTSKTLELFSKKTVQEHNTANDCWVITYQNRKIYDVTRFLSEHPGGDESILDYAGKDI	60
EgeA_B3	-----	0
EgeA_P	-----	0
SCS7	TEIMKDSVDVHEHSDSAYEILEDEYLIIGYLATDEEAARLLTNKNHKVEVQLSADGTEFDST	120
EgeA_B3	-----	0
EgeA_P	-----	0
SCS7	TFVKELPAEEKLSIATDYSNDYKHKHFLDLNRPLLMQILRSDFKKDFYVDQIHRPRHYGK	180
EgeA_B3	-----MELVHS-PMGLRQRKY-----REIYRS-RLSGFYNGYYHAFILIFGV	39
EgeA_P	-----MEIHNS-PMNERQRRY-----REVYRS-RTSGWYNGYVHAFILIFGI	39
	::: . . ::::: :: ** .:* . * :*	
SCS7	GSAPLFGNFLEPLTKTAWVVPVAWLPVVVYHMGVALKNMNQLFACFLFCVGVFVWTLIE	240
EgeA_B3	GLYEIYF-ATRHISNVLWWE---WLFVPAVF-----LFAQWVE	73
EgeA_P	GLYAIFF-FTMNLSEVLWWE---WLTIPVVF-----LGGQWVE	73
	* :: :::: ** ** : . . : :*	
SCS7	YGLHRFLFHFDLWLPESNIAFATHFLLHGCHH-----YLPMDKYRLVMPPTLFFVILCAP	294
EgeA_B3	YLFHRFLAHRPSKSPFWRLAYVRHTLMHHQFFTAEEPFRFASHKDWRVTIF-----PP	125
EgeA_P	YYTHRFLLRPKKSGMGRLLYVRHTLMHHQFFTAEPYANHRDWRVTLF-----PP	125
	* **** * . : : * *:* . . : :*::: *	
SCS7	FYKLVFALLPL-----YWAYA-----GFAGGLFGYVCYDECHFFFLH-----HSKL	334
EgeA_B3	FTLVFFTLTTIPFAFLAGIIISVNVGWLILATAIGSYVFYELLHFLCHVDDNWFVRHCP	185
EgeA_P	FTLTISTLMMLPSALVAGWVISGNVWLLMASTIGTYLFYEVLLHFLCHVGDNWFVRHCP	185
	* . :* : : :* : *:* * **:* * :.	
SCS7	PPFMRKLLKYYLLEHHYKNYQ--LGFGVTSWFWDEVFGTYLGPDAPLSKMKYE-----S	385
EgeA_B3	V---NTARRHHTAHHDSVMMEYNMSIVFPFWDWVYGTSDLDRGLFGHLFNGYSTKYVKK	242
EgeA_P	V---NTARRHHTAHHNHSIMMETNMSIVFPFWDWVYGTSDLDRGLIGHLFNGYSTKHIKK	242
	. . ::* * . . : . . *** *:* . : . . .	
SCS7	GLE-----VLFQ-----	392
EgeA_B3	DLRKTRKTPVETPIDTKPDR-----	263
EgeA_P	DLRQTAKTPHLLPHVSKASSKPGPEPANR	271
	.*.	

Abbildung 4.30 Multiple sequence alignment SCS7, EgeA(B3) und EgeA(P)

Die Aminosäuresequenzen der Proteine Ceramide very long chain fatty acid hydroxylase SCS7 (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508) und der Fettsäure-alpha-Hydroxylasen EgeA(B3) (BOE3) und EgeA(P) (BOE200) wurden mit dem Programm Clustal Omega alignet. Grau markiert sind die Übereinstimmungen, 41 an der Zahl, gelb markiert die für diese Enzymfamilie typischen konservierten Histidin-Boxen.

4.17.2 EgeB

Die Aminosäuresequenzen von EgeB(B3) und EgeB(P), zu finden im Angang, Kapitel 7.5, wurden ebenso wie zuvor die von EgeA mit den in Kapitel 4.17.1 genannten Datenbanken und online-Tools analysiert. EgeB(B3) hat eine Länge von 61 aa, ein Molekulargewicht von 6,8 kDa und einen pI von 8,93. EgeB(P) ist 66 aa lang bei einem MW von 7,2 kDa und einem pI von 8,16.

Die Ergebnisse der blastp-Suche lieferte für EgeB keine Erkenntnisse über die Funktion, es wurden ausschließlich "hypothetical protein" detektiert (s. Tabelle 4-24 für BOE3 und Tabelle 4-25 für BOE200).

Tabelle 4-24 blastp-Ergebnisse EgeB(B3) aus BOE3

Description	Identities	Positives	Gaps	Accession number
hypothetical protein [<i>Alicyclophilus</i> sp. B1]	60/61 (98,4 %)	61/61 (100 %)	0/61 (0 %)	WP_059401874.1
hypothetical protein [<i>Ralstonia pickettii</i>]	60/61 (98,4 %)	60/61 (98,4 %)	0/61 (0 %)	WP_024972731.1
hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. KO116]	29/57 (50,9 %)	41/57 (71,9 %)	0/57 (0 %)	WP_035564173.1
hypothetical protein [<i>Neocallimastix californiae</i>]	16/44 (36,4 %)	29/44 (65,9 %)	0/44 (0 %)	ORY22808.1
hypothetical protein [<i>Ca. Komeilibacteria</i> bacterium]	18/59 (30,5 %)	32/59 (54,2 %)	5/59 (8,5 %)	OGY89952.1

Tabelle 4-25 blastp-Ergebnisse EgeB(P) aus BOE200

Description	Identities	Positives	Gaps	Accession number
hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. KO116]	66/66 (100 %)	66/66 (100 %)	0/66 (0 %)	WP_035564173.1
hypothetical protein [<i>Alicyclophilus</i> sp. B1]	29/57 (50,9 %)	42/57 (73,7 %)	0/57 (0 %)	WP_059401874.1
hypothetical protein [<i>Ralstonia pickettii</i>]	29/57 (50,9 %)	42/57 (73,7 %)	0/57 (0 %)	WP_024972731.1

Das Tool HHpred zeigt die höchsten Wahrscheinlichkeiten, nämlich 89,3 % für EgeB(B3) und 90,5 % für EgeB(P), für eine Verwandtschaft mit der Proteintranslocase-Untereinheit SecE aus *E. coli* (PDB: 5GAE_h; 4V6M_BB) (s. Tabelle 4-23). Für das Alignment wurden hierbei jeweils 44 columns herangezogen. Das Protein SecE besteht aus insgesamt 127 Aminosäuren, EgeB(B3) aus 61 und EgeB(P) aus 66. Weitere Treffer waren ein Glucose-Transporter aus *Staphylococcus epidermidis* (PDB: 4LDS) (EgeB(B3): 75 %, EgeB(P): 87,7 %), wobei 55 bzw. 60 columns von 446 align wurden, und ein Phosphat-Transporter PiPT aus *Piriformo-*

Ergebnisse

spora indica (PDB: 4J05) (EgeB(B3): 70,4 %, EgeB(P): 81,5 %), bei dem 55 bzw. 60 von 530 columns align wurden.

Mit I-TASSER wurden für EgeB(B3) und EgeB(P) Proteinstruktur-Modelle erstellt, die in Abbildung 4.31 zu sehen sind. Der C-score lag für EgeB(B3) bei -1,85, für EgeB(P) bei -2,37. Grün dargestellt sind in dieser Abbildung die durch den TMHMM Server ermittelten Transmembranbereiche, jeweils zwei an der Zahl. Auch EgeB ist demnach ein Membranprotein.

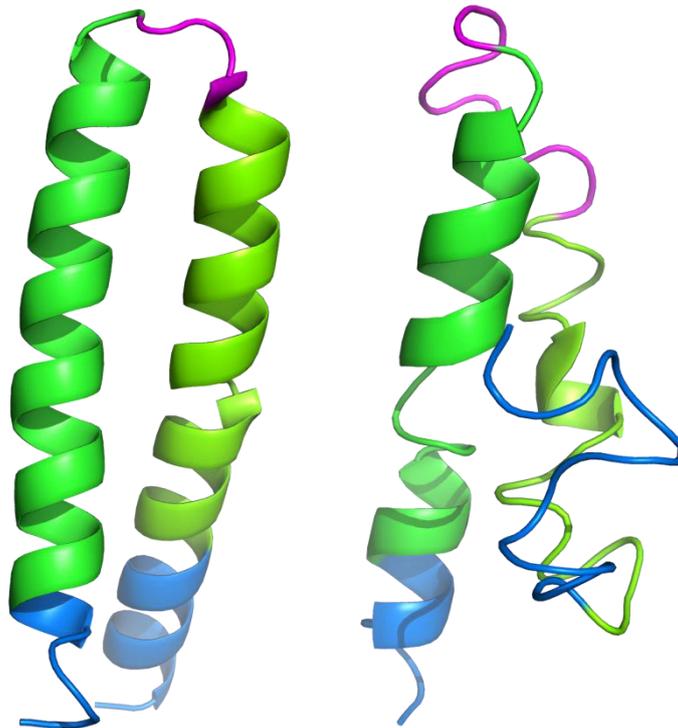


Abbildung 4.31 Strukturmodelle für EgeB

Mit I-TASSER wurden Proteinstruktur-Modelle für EgeB(B3) (links) und EgeB(P) (rechts) erstellt. Grün markiert sind Transmembranbereiche, pink stellt den Außenbereich dar, die blau markierten Bereiche befinden sich im inneren der Zelle.

4.17.3 EgeC

EgeC(B3) ist 114 aa lang bei einem MW von 12,7 kDa und einem pI von 4,44. EgeC(P) hat eine Länge von 121 aa, ein Molekulargewicht von 13,2 kDa und einen pI von 4,91.

Auch diese Sequenzen wurden analysiert, um die Funktion von EgeC zu ermitteln, und auch in diesem Fall ergab die blastp-Suche einzig „hypothetical protein“ (s. Tabelle 4-26 für EgeC(B3) und Tabelle 4-27 für EgeC(P)).

Die Ergebnisse der Analyse der Sequenzen mit HHpred sind in Tabelle 4-23 zu finden. EgeC(B3) hat die höchste Übereinstimmung mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein Ubl4a des Bag6-Ubl4a-Komplexes, das in *Homo sapiens* an der Biogenese endständig-verankerter

Ergebnisse

Proteine beteiligt ist (PDB 4X68_A). Die Wahrscheinlichkeit für eine Verwandtschaft liegt bei 55,2%. Weitere Treffer waren die Untereinheit DCP1 eines mRNA-decapping-Enzyms in *Drosophila melanogaster* (PDB 2WX4) mit 42,4% und die Excisionase Tn916Xis in *Enterococcus faecalis* (PDB 1Y6U) mit 40,9% Wahrscheinlichkeit. Bei EgeC(P) gab es die höchste Übereinstimmung mit DCP1 (mRNA-decapping-Enzym Untereinheit) mit 57,4%, die zweithöchste mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein Ubl4a mit 45,9%. An dritter Stelle folgte die Linalool Dehydratase/Isomerase LinD aus *Castellaniella defragrans* (PDB 5G1W) mit 40,9%.

Die Proteinstrukturmodelle, die mit I-TASSER erstellt wurden, sind in Abbildung 4.32 dargestellt. Der C-score für das EgeC(B3)-Modell lag bei -4,02, der für das EgeC(P)-Modell bei -3,92. Laut TMHMM handelt es sich um ein lösliches Protein.

Tabelle 4-26 blastp-Ergebnisse EgeC(B3) aus BOE3

Description	Identities	Positives	Gaps	Accession number
hypothetical protein [<i>Alicyclophilus</i> sp. B1]	114/114 (100 %)	114/114 (100 %)	0/114 (0 %)	WP_059401888.1
hypothetical protein [<i>Alicyclophilus</i> sp. B1]	113/114 (99,1 %)	114/114 (100 %)	0/114 (0 %)	WP_059401875.1
hypothetical protein [<i>Ralstonia pickettii</i>]	113/114 (99,1 %)	114/114 (100 %)	0/114 (0 %)	WP_024972730.1
hypothetical protein [<i>Macromonas</i> sp. BK-30]	112/114 (98,2 %)	113/114 (99,1 %)	0/114 (0 %)	WP_101049606.1
hypothetical protein [<i>Methylobacterium</i> sp. yr668]	41/102 (40,2 %)	58/102 (56,9 %)	0/102 (0 %)	WP_091927949.1

Tabelle 4-27 blastp-Ergebnisse EgeC(P) aus BOE200

Description	Identities	Positives	Gaps	Accession number
hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. KO116]	120/121 (99,2 %)	120/121 (99,2 %)	0/121 (0 %)	WP_045812353.1
hypothetical protein [<i>Bradyrhizobium elkanii</i>]	51/105 (48,6 %)	64/105 (61 %)	0/105 (0 %)	WP_081334991.1
hypothetical protein [<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i>]	51/99 (51,5 %)	63/99 (63,6 %)	0/99 (0 %)	WP_092125284.1
hypothetical protein [<i>Bradyrhizobium elkanii</i>]	50/99 (50,5 %)	63/99 (63,6 %)	0/99 (0 %)	WP_016842375.1
hypothetical protein [<i>Bradyrhizobium</i> sp. C9]	50/99 (50,5 %)	63/99 (63,6 %)	0/99 (0 %)	WP_097670738.1

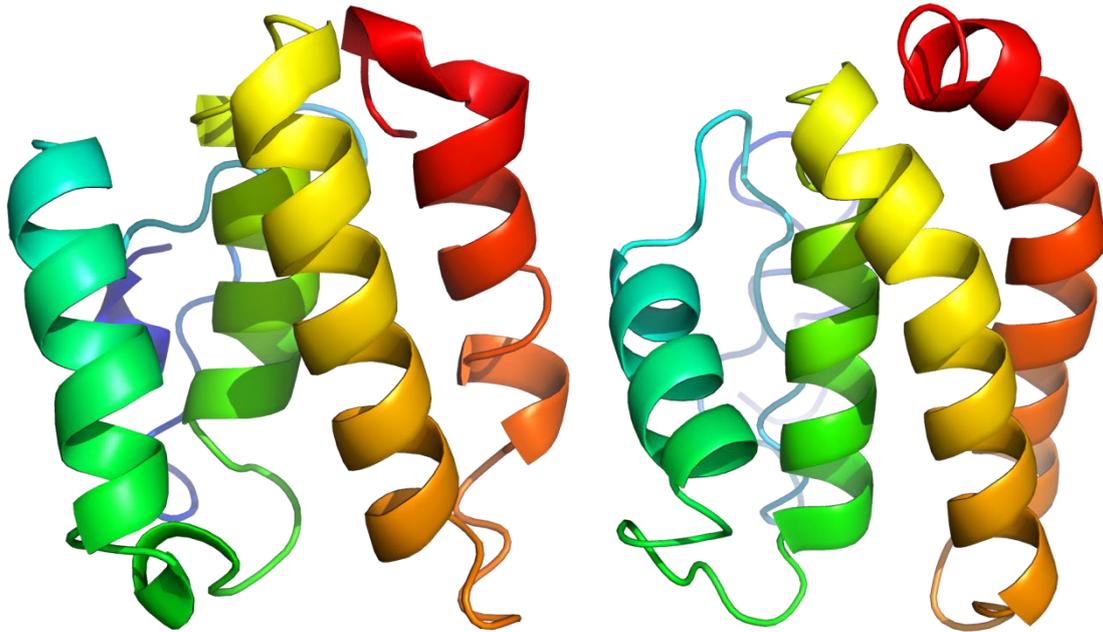


Abbildung 4.32 Strukturmodelle für Ege(C)

Mit I-TASSER wurden Proteinstruktur-Modelle für EgeC(B3) (links) und EgeC(P) (rechts) erstellt. Es handelt sich jeweils um ein lösliches Protein. In der Graphik ist der N-Terminus blau, der C-Terminus rot gefärbt.

4.18 *Ege*-Gene in den BOE-Stämmen

Die Gene *egeA*, *egeB* und *egeC* wurden in den Stämmen BOE3 und BOE200 identifiziert, woraufhin mittels PCR überprüft wurde, ob sie auch in den anderen BOE-Stämmen zu finden waren. Hierfür wurden 3 unterschiedliche Primerpaar-Kombinationen eingesetzt. Die erste für die Amplifikation von *egeA* aus BOE200 (*egeA*(P)), die zweite für die Amplifikation von *egeA* aus BOE3 (*egeA*(B3)) und die dritte für die Amplifikation von *egeABC* aus BOE200 (*egeABC*(P)) (s. Tabelle 3-6, Kapitel 3.19).

Die PCR-Proben wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, das in Abbildung 4.33 zu sehen ist. Man erkennt deutlich, dass bei allen *Pseudomonas* spp. unter den BOE-Stämmen bis auf BOE7 sowohl *egeA*(P) als auch *egeABC*(P) amplifiziert werden konnte. Alle drei *ege*-Gene waren demnach in diesen Stämmen zu finden. Bei BOE7 war bei der *egeA*(P)-PCR ein Bandenmuster zu erkennen. Neben der gesuchten Bande (ca. 0,9 kbp) waren noch weitere, kürzere Banden zu sehen. Bei der *egeABC*(P)-PCR hingegen war nur Schmier zu erkennen. Hier besteht die Möglichkeit, dass die Anordnung der Gene in BOE7 anders ist als in den anderen Stämmen oder auch, dass die Sequenz nicht zu 100 % übereinstimmt.

Das Gen *egeA*(B3) wurde ausschließlich in *Hydrogenophaga pseudoflava* BOE3 detektiert. Keine Bande bei allen 3 PCRs wurde sowohl mit der DNA von *Gordonia terrae* BOE5 als auch mit der DNA von *Cupriavidus oxalaticus* BOE300 erzeugt.

Ergebnisse

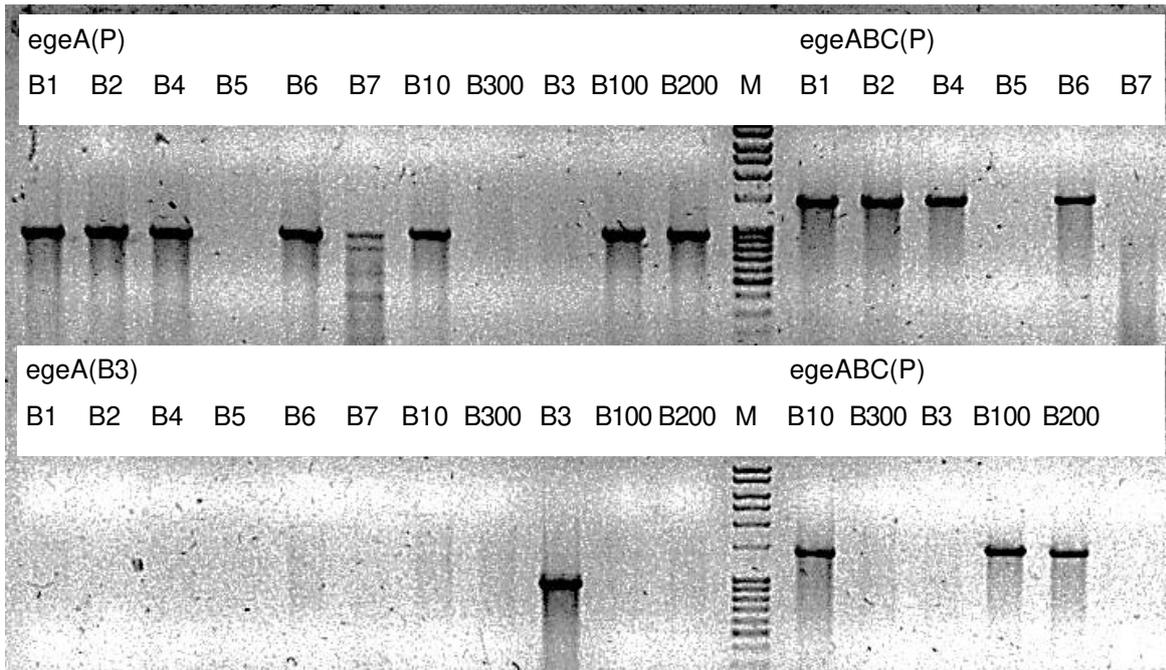


Abbildung 4.33 Agarosegel ege-PCR

Aufgetrennt wurden die Amplifikate zur Detektion von *egeA(P)*, *egeA(B3)* und *egeABC(P)*. „BOE“ wurde mit „B“ abgekürzt. Oben v. l. n. r.: *egeA(P)*: BOE1, BOE2, BOE4, BOE5, BOE6, BOE7, BOE10, BOE300, BOE3, BOE100, BOE200; M: Marker (100 bp DNA-Leiter extended, Carl Roth, Karlsruhe: 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 0,9 kb, 0,8 kb, 0,7 kb, 0,6 kb, 0,5 kb, 0,4 kb, 0,3 kb, 0,2 kb, 0,1 kb); *egeABC(P)*: BOE1, BOE2, BOE4, BOE5, BOE6, BOE7. Unten v. l. n. r.: *egeA(B3)*: BOE1, BOE2, BOE4, BOE5, BOE6, BOE7, BOE10, BOE300, BOE3, BOE100, BOE200; M: Marker (100 bp DNA-Leiter extended, Carl Roth, Karlsruhe); *egeABC(P)*: BOE10, BOE300, BOE3, BOE100, BOE200. Das Gen *egeA(P)* und der Genbereich *egeABC(P)* wurden in allen Pseudomonaden unter den BOE-Stämmen eindeutig nachgewiesen außer in BOE7. Das Gen *egeA(B3)* wurde ausschließlich in BOE3 detektiert. Mit den verwendeten Primern konnte weder in BOE5 noch in BOE300 ein *egeA*-Gen nachgewiesen werden. Bei BOE7 gab es bei der PCR zur Identifizierung von *egeA(P)* statt nur einer Bande mehrere unspezifische Banden.

Da das Gesamtgenom von BOE100 sequenziert wurde (s. Kapitel 4.12.1), konnte man diese Sequenz direkt mit der von BOE200 vergleichen. Die Nukleotidsequenzen stimmen für *egeA* und *egeB* zu 100 % überein. Bei *egeC* gibt es zwei Unterschiede, und zwar an den Positionen 247 und 248. In BOE200 sind hier Cytosin und Guanin, in BOE100 Thymin und Adenin. Dies hat Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz. Während an dieser Stelle in BOE200 ein Arginin (Arg83) zu finden ist, wird in BOE100 ein Tyrosin (Tyr83) gebildet. In BOE3 wird an selber Stelle ein Glutamin (Gln83) erzeugt.

4.19 Überexpression in *P. putida* KT2440

4.19.1 Die Expressionsplasmide pCom10.*egeA(P)* und pCom10.*egeABC(P)*

Für die Herstellung der Expressionsplasmide pCom10.*egeA(P)* und pCom10.*egeABC(P)* wurden zunächst die Inserts mittels PCR mit der Phusion DNA-Polymerase generiert, hierbei zwei unterschiedliche Annealing-Temperaturen getestet (66 und 68 °C) (s. Kapitel 3.19). Das

Ergebnisse

Agarosebild (Abbildung 4.34, A) zeigt, dass bei beiden Temperaturen ein Amplifikat erzeugt werden konnte.

Nach Aufreinigung, Restriktion und erneuter Aufreinigung wurde die Inserts in den ebenfalls verdauten Vektor pCom10 ligiert, anschließend die Ligationsansätze in *E. coli* NEB5- α transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB + Km-Platten. Mittels Colony-PCR wurde überprüft, ob im jeweiligen Klon das korrekte Plasmid vorhanden war. In Abbildung 4.34, B ist das Agarosegelbild mit den Resultaten der Colony-PCR zu sehen. Die pCom10.egeA(P)-Klone 1–4 (Nr. 1–4 in der Abbildung) tragen alle das korrekte Plasmid, die pCom10.egeABC(P)-Klone 2–4 (Nr. 6–8 in der Abbildung) ebenfalls. Im Gegensatz dazu besitzt pCom10.egeABC(P)-Klon 1 (Nr. 5 in der Abbildung) ein Plasmid mit dem falschen Insert, das PCR-Amplifikat ist deutlich zu kurz.

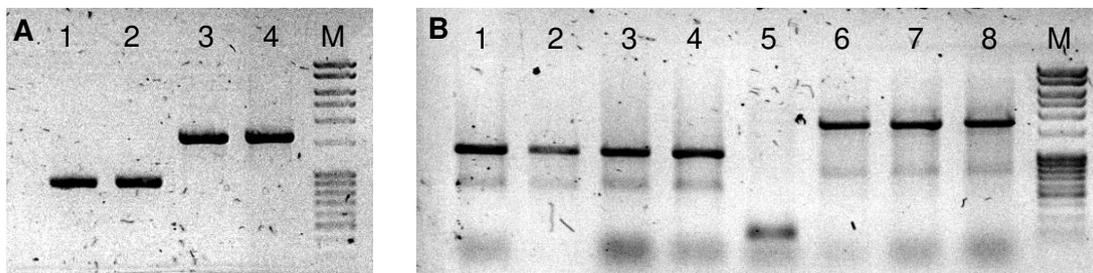


Abbildung 4.34 Agarosegelbilder Expressionsplasmid

A Die PCR-Amplifikate zur Herstellung der Inserts: 1: egeA(P), Annealing bei 66 °C; 2: egeA(P), Annealing bei 68 °C; 3: egeABC(P), Annealing bei 66 °C; 4: egeABC(P), Annealing bei 68 °C; M: 100 bp-DNA-Leiter extended (Carl Roth, Karlsruhe; 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 0,9 kb, 0,8 kb, 0,7 kb, 0,6 kb, 0,5 kb, 0,4 kb, 0,3 kb, 0,2 kb, 0,1 kb); **B** Colony-PCR von je 4 Klonen: 1–4: *E. coli* pCom10.egeA(P) Klon 1–4; 5–6: *E. coli* pCom10.egeABC(P) Klon 1–4; M: 100 bp-DNA-Leiter extended (Carl Roth, Karlsruhe). Die PCR zur Erstellung der Inserts für die Expressionsplasmide war in beiden Fällen für beide Temperaturen erfolgreich. Bei der Colony-PCR stellte sich heraus, dass alle untersuchten Klone bis auf *E. coli* pCom10.egeABC(P)-Klon 1 ein Plasmid mit der korrekten Insert-Länge besaßen.

Aus Übernachtskulturen von je zwei Klonen wurden die Plasmide mit dem Kit Roti-Prep Plasmid MINI (Carl Roth, Karlsruhe) isoliert und zum Sequenzieren der Insert-Sequenz an die Firma Seqlab GmbH (Göttingen) gesendet. Jeweils eines der Plasmide wurde anschließend in *P. putida* KT2440 transformiert.

4.19.2 Überexpression der Gene *egeA* bzw. *egeA*, *egeB* und *egeC*

Die Stämme *Pseudomonas putida* KT2440 WT (Wildtyp, ohne Plasmid; Negativkontrolle), *P. putida* KT2440 pCom10.egeA(P) und *P. putida* KT2440 pCom10.egeABC(P) wurden auf Wachstum mit Butoxyessigsäure und Butoxyethanol untersucht, um dadurch die Rolle der Gene *egeA*, *egeB* und *egeC* beim Abbau von BET bzw. BES zu ermitteln. Wird das Ether-spaltungsenzym erfolgreich hergestellt und ist aktiv, kann *P. putida* KT2440 mit den Spaltungsprodukten Butanol bzw. Glyoxylsäure wachsen.

Ergebnisse

Mit allen 3 Stämmen wurden jeweils 2 Kulturen angesetzt (s. Kapitel 3.28.2):

- A) MM + 0,05 % v/v BES + 0,05 % v/v DCPK + ggf. Km
- B) MM + 0,05 % v/v BET + 0,05 % v/v DCPK + ggf. Km

Dicyclopropylketon (DCPK) war der Induktor des *PalkB* Promotors der Expressionsplasmide, Butoxyessigsäure bzw. Butoxyethanol die einzige Kohlenstoff- und Energiequelle. Die OD₅₄₆ wurde regelmäßig gemessen. Die OD-Werte sind im Anhang, Tabelle 7-9, zu finden. Der Wachstumsverlauf ist in Abbildung 4.35 dargestellt.

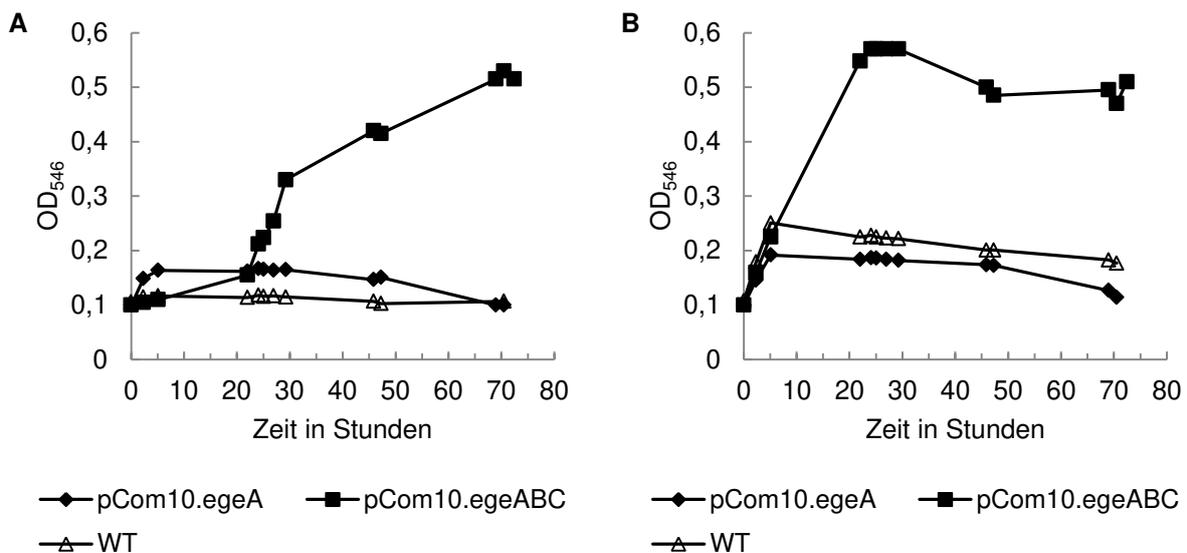


Abbildung 4.35 Wachstumskurven Überexpression

Je 50 mL MM (ggf. + Km) wurden mit der jeweiligen *Pseudomonas putida* KT2440-Vorkultur angeimpft (pCom10.egeA(P): beinhaltet das Gen *egeA*(P) (Fettsäure-alpha-Hydroxylase); pCom10.egeABC(P): beinhaltet neben *egeA*(P) auch die Gene der hypothetischen Proteine *egeB*(P) und *egeC*(P); WT: KT2440 Wildtyp), mit Substrat (A: 0,05 % BES, B: 0,05 % BET) und 0,05 % Induktor (DCPK) versetzt und bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die OD₅₄₆ wurde in regelmäßigen Abständen gemessen. Nur dieser Stamm konnte BET bzw. BES abbauen, was durch Extraktion der Kulturüberstände mit DCM und anschließender Analyse mittels GC-MS belegt werden konnte.

Es war eindeutig zu erkennen, dass bei beiden Ansätzen der Stamm mit dem Plasmid pCom10.egeABC(P) die deutlichste OD-Zunahme zu verzeichnen hatte von anfänglich ca. 0,1 auf 0,5–0,6. Die OD-Zunahme bei dem Wildtyp und bei dem Stamm mit dem Plasmid pCom10.egeA belief sich auf bis zu ca. 0,1 bei Zugabe von BET. Die Oxidation der Hydroxylgruppe liefert Energie in Form von Reduktionsäquivalenten, die für diese geringfügige OD-Zunahme verantwortlich sein kann, da mit Hilfe dieser Energie möglicherweise vorhandenen Speicherstoffe verstoffwechselt und in Biomasse umgesetzt werden können. Die genauen Gründe für die leichte OD-Zunahme wurden nicht näher untersucht. Ein Abbau der Substrate konnte jedenfalls ausgeschlossen werden, da die Kulturüberstände im Anschluss an den Versuch mit Dichlormethan extrahiert und im GC-MS analysiert worden sind (Durchführung s. Kapitel 3.3). Hierbei wurde bei dem Wildtyp und bei dem Stamm mit dem Plasmid

pCom10.egeA(P) bei beiden Substraten ausschließlich BES als Metabolit detektiert, während bei den Überständen der pCom10.egeABC(P)-Kulturen kein Metabolit zu detektieren war. Butoxyethanol bzw. Butoxyessigsäure wurde demnach ausschließlich von *P. putida* KT2440 pCom10.egeABC(P) vollständig abgebaut.

4.20 Der Abbauweg von Butoxyethanol

Anhand der gewonnenen Ergebnisse wurde ein Abbauweg für Butoxyethanol postuliert. Er ist in Abbildung 4.36 dargestellt. Durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH), in Stamm BOE100 handelt es sich um die PQQ- und Cytochrom c_{550} -abhängige ADH PedE, wird Butoxyethanol zum -aldehyd, durch eine Aldehyddehydrogenase (ALDH) oder eine Alkanalmonooxygenase (ALMO) weiter zur Butoxyessigsäure oxidiert. Es wurde nicht näher untersucht, durch welches Enzym die Oxidation des Aldehyds erfolgt, da der Hauptgegenstand der Arbeit die Identifizierung des Etherspaltungsenzyms war.

Nach der Reaktion zur Säure erfolgt die Spaltung des Ethers, indem die Fettsäure-alpha-Hydroxylase EgeA Butoxyessigsäure in alpha-Position hydroxyliert. Hierbei entsteht 2-Hydroxy-2-butoxyessigsäure, ein instabiles Intermediat, das anschließend zu *n*-Butanol und Glyoxylsäure zerfällt. Butanol wird weiter mit Enzymen abgebaut, die dem Butanoat-Metabolismus angehören, Glyoxylsäure wird im Glyoxylatzyklus verstoffwechselt.

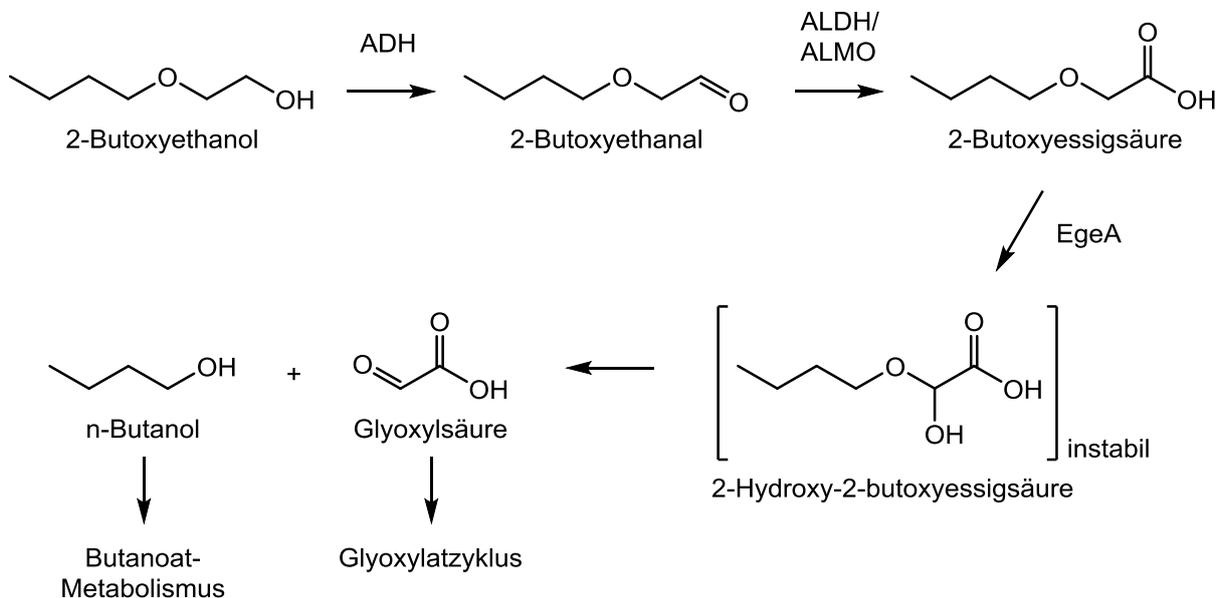


Abbildung 4.36 Der Abbauweg von 2-Butoxyethanol

Butoxyethanol wird mittels einer Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Butoxyethanal oxidiert. Im Stamm BOE100 erfolgt diese Reaktion durch die PQQ- und Cytochrom c_{550} -abhängige Alkoholdehydrogenase PedE. Butoxyethanal wird mittels einer Aldehyddehydrogenase (ALDH) oder einer Alkanalmonooxygenase (ALMO) weiter oxidiert zur Butoxyessigsäure. Jene wird durch die Fettsäure-alpha-Hydroxylase EgeA an alpha-Position hydroxyliert, was zur Bildung des instabilen Halbacetals 2-Hydroxy-2-butoxyessigsäure führt. Diese zerfällt zu Butanol und Glyoxylsäure, die im Butanoat-Metabolismus bzw. im Glyoxylatzyklus weiter abgebaut werden.

5 Diskussion

5.1 Butoxyethanol-Abbauer

Für die Untersuchung des biologischen Abbaus von hydroxylierten Alkylethern, insbesondere für den Abbau von 2-Butoxyethanol, konnten 11 Reinstämme isoliert werden, die BET vollständig abbauen: *Pseudomonas knackmussii* BOE1, *Pseudomonas putida* BOE2, *Hydrogenophaga pseudoflava* BOE3, *Pseudomonas umsongensis* BOE4, *Gordonia terrae* BOE5, *Pseudomonas extremaustralis* BOE6, *Pseudomonas plecoglossicida* BOE7, *Pseudomonas* sp. BOE10, *Pseudomonas putida* BOE100, *Pseudomonas vancouverensis* BOE200 und *Cupriavidus oxalaticus* BOE300. Bis auf BOE5 waren alle Isolate gram-negativ und 8 der 10 gram-negativen Stämme zählen zu dem Genus *Pseudomonas*.

Es wurde eine große Anzahl verschiedener *Pseudomonas*-Stämme beschrieben, die viele unterschiedliche Substrate abbauen können. Zu den aromatischen Verbindungen zählen u. a. Benzol, Toluol, Ethylbenzol und alle drei Xylole, Phenol, Brenzkatechin und die drei Kresole, Benzoesäure, 3- und 4-Methylbenzoesäure, 2-Aminobenzoesäure, 3- und 4-Hydroxybenzoesäure, Gentisinsäure, Homogentisinsäure, 3- und 4-Phenoxybenzoesäure, Styrol, 1- und 2-Phenylethanol, Biphenyl, die PAKs Naphthalen, Fluoren und Phanthren, die Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, Phenylacetat, 3- und 4-Hydroxyphenylacetat, Vanillin, Vanillinsäure und Mandelsäure, Eugenol und Ferulasäure, Koffein, Nicotin und Nicotinsäure und die biogenen Amine 2-Phenylethylamin, Tyramin, Dopamin, Octopamin, Synephrin und Noradrenalin (Gibson et al., 1973; Davey & Gibson, 1974; Worsey & Williams, 1975; Smith & Ratledge, 1989; Smith, 1990; Williams & Sayers, 1994; Corkery et al., 1994; Jindrová et al., 2002; Tao et al., 2004; Bagnéris et al., 2005; Di Martino et al., 2012; Baggi et al., 1987; Dagley & Gibson, 1965; Bayly et al., 1966; Feist & Hegeman, 1969; Bayly & Wigmore, 1973; Murray et al., 1972; Nakazawa & Yokota, 1973; Williams & Murray, 1974; Altmerschmidt et al., 1993; Retallack et al., 2006; Wheelis et al., 1967; Seidman et al., 1969; Harpel & Lipscomb, 1990; Jimenez et al., 2002; Arias-Barrau et al., 2004; Wittich et al., 1990; Dehmel et al., 1995; Utkin et al., 1991; Park et al., 2005; Mooney et al., 2006; Catelani et al., 1971; Furukawa et al., 1989; Williams & Sayers, 1994; Nam et al., 2014; Bosch et al., 1999; Balashova et al., 1999; Peng et al., 2008; Stanier et al., 1951; Adachi et al., 1966; Guroff & Rhoads, 1967; Narumiya et al., 1979; Koyama, 1982; Kurnasov et al., 2003; Arias-Barrau et al., 2004; Olivera et al., 1994; Teufel et al., 2010; Brunel & Davison, 1988; Priefert et al., 1997; El-mansi & Anderson, 2004; Gunsalus, I. C. et al., 1953; Stanier et al., 1953; Gunsalus, C. F. et al., 1953; Hegeman, 1966; Rosenberg, 1971; Furukawa et al., 1998; Plaggenborg et al., 2003; Mathew & Abraham, 2006; Ashengroph et al., 2011; Dash & Gummadi, 2006b; Dash & Gummadi, 2006a; Dash & Gummadi, 2006b; Wada & Yamasaki, 1954;

Behrman & Stanier, 1957; Gauthier & Rittenberg, 1971; Thacker et al., 1978; Brandsch, 2006; Cuskey et al., 1987; Arias et al., 2008; Arcos et al., 2010).

Doch nicht nur Aromaten werden durch Pseudomonaden abgebaut, auch andere organische Verbindungen wie lineare Alkane mit Kettenlängen von C₂ bis C₃₄, zyklische Verbindungen wie Campher, Chinasäure, Shikimisäure, 2-Adamantanon und α -Pinen, Polyvinylalkohol, sekundäre Alkohole und Methyl-*tert*-butylether im Cometabolismus mit Pentan (Baptist et al., 1963; van Beilen et al., 1994; Arp, 1999; Smits et al., 2003; van Beilen & Funhoff, 2007; Rojo, 2009; Ougham et al., 1983; Kadow et al., 2012; Yoshida, 1964; Ingledew & Tai, 1972; Singh et al., 2008; Selifonov, 1992; Tudroszen et al., 1977; Suzuki et al., 1973; Kawai & Hu, 2009; Suzuki, 1978; Forney & Markovetz, 1970; Veteikytė et al., 2013; Morales et al., 2009; Li et al., 2016).

Wie in Kapitel 2.2 bereits ausführlich beschrieben fanden sich unter den Stämmen, die PEG abbauen können, auch *Pseudomonas*-Stämme, nämlich *Pseudomonas* sp. KW8, *P. stutzeri* JA1001, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* sp. P 400 und *Pseudomonas* sp. strain PE-2 (Watson & Jones, 1977; Obradors & Aguilar, 1991; Haines & Alexander, 1975; Thėlu et al., 1980; Hu et al., 2007)

Es ist demnach nicht verwunderlich, dass sich unter den isolierten Butoxyethanol-Abbauern derart viele *Pseudomonas*-Stämme fanden. Vor allem wenn man bedenkt, dass Pseudomonaden ubiquitär verbreitet sind, u. a. Boden, Wasser, Pflanzen, Tiere und auch den Menschen besiedeln.

5.1.1 Substratverwertung der BOE-Stämme

Wie in Kapitel 3.16 dargestellt zeigten alle isolierten BOE-Stämme Wachstum mit dem Kernsubstrat 2-Butoxyethanol und dessen (potentiellen) Metaboliten 2-Butoxyessigsäure, Glyoxylsäure und *n*-Butanol. Diese Ergebnisse lieferten einen ersten Hinweis auf den Abbauweg von BET, ohne ihn jedoch zu beweisen. Da außerdem die Alkohole Ethanol und *n*-Hexanol verwertet wurden, kann sicher behauptet werden, dass Enzyme für den Abbau von Alkoholen in allen Stämmen vorhanden sind. Ein weiterer Stoff, denn alle BOE-Stämme abbauen können, ist der Ester Ethylacetat, der normalerweise im ersten Schritt durch eine Esterase in Essigsäure und Ethanol gespalten wird.

Aceton und 2-Propanol wurden nur von den Stämmen BOE5 und BOE300 abgebaut. Alle im Rahmen dieser Arbeit isolierten *Pseudomonas*-Stämme sowie der *Hydrogenophaga*-Stamm BOE3 verfügen nicht über das Enzymset, diese sekundären Verbindungen verwerten zu können. Das Keton Butanon (MEK) hingegen wurde außer von BOE5 und BOE300 zusätzlich von den Stämmen BOE6 und BOE200 mineralisiert. Die Fähigkeit, das C₅-Keton abbau-

en zu können, war demnach weiter verbreitet unter den untersuchten Stämmen als die Abbaufähigkeit kürzerkettiger Ketone.

Interessanterweise war keiner der gram-negativen BOE-Stämme in der Lage auch nur einen der getesteten unpolaren Ether, um genauer zu sein Ethyl-, Butyl-, Isopentyl-, Butylvinyl- und Dibenzylether, abzubauen. Ausschließlich *Gordonia terrae* BOE5 wuchs mit Ethyl-, Butyl-, Butylvinyl- und Dibenzylether. Bei den gram-negativen Stämmen war Voraussetzung für den Abbau einer Etherverbindung das Vorhandensein einer terminalen Ethylenglycol-Gruppe. 2-Butoxyethanol, 2-Ethoxyethanol und 2-Propoxyethanol wurden von allen BOE-Stämmen als Substrat verwendet, PEG 200 von BOE3 und BOE100, 2-Phenoxyethanol von BOE2 und BOE4. PEG 200 besteht ausschließlich aus Ethylenglycol-Einheiten, konnte aber dennoch nicht von allen Stämmen mineralisiert werden. Die Kettenlänge und damit verbunden die Aufnahme des Substrates in die Zelle war hier voraussichtlich der limitierende Faktor und konnte von den Stämmen nicht in gleicher Weise bewerkstelligt werden.

1-Butoxy-2-propanol wurde nur von dem gram-positiven Stamm BOE5 abgebaut und 4-Methoxy-1-butanol von BOE200 und BOE300, geringes Wachstum zeigte auch BOE100.

Dass BOE5 mit unpolaren und hydroxylierten Alkyl-, Aryl- und Alkylarylethern wuchs, kann ein Hinweis darauf sein, dass Etherverbindungen in diesem Stamm auf eine andere Weise abgebaut werden als in den anderen Stämmen. Die nähere Untersuchung der Ether-Abbauzyme in BOE5 war allerdings nicht Bestandteil vorliegender Arbeit, weswegen keine weiteren Aussagen hierzu getroffen werden können. Bestimmt behauptet werden kann allerdings, dass die Etherspaltungsgene *egeA*, *egeB* und *egeC*, die in den Pseudomonaden unter den BOE-Stämmen und in BOE3 gefunden worden sind, mittels PCR nicht in BOE5 nachweisbar waren (s. Kapitel 4.18).

Die Alkane Hexan und Cyclohexan wurden von keinem BOE-Stamm mineralisiert, die hierfür benötigten Monooxygenasen besitzt keiner der isolierten Stämme.

Ebenso wenig wurden die Aromaten Styrol und Toluol abgebaut. Benzoessäure hingegen wurde von BOE2, BOE4, BOE5, BOE7, BOE100, BOE200 und BOE300 als Wachstumssubstrat genutzt, 2-Phenylethanol von BO5, BOE10, BOE100 und BOE200 sowie, in geringem Maße, auch von BOE2 und BOE300.

5.1.2 Wachstum mit Butoxyethanol

Die Wachstumsparameter aller BOE-Stämme bei einer Butoxyethanolkonzentration von 10 mM wurden im Batch-Ansatz bestimmt (s. Kapitel 4.6.1, 4.6.2, 4.6.4 und 4.6.5). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die *Pseudomonas*-Stämme unter den BET-Abbauern deutlich schneller wuchsen als die drei anderen, namentlich *Cupriavidus oxalaticus* BOE300, *Gordo-*

nia terrae BOE5 und *Hydrogenophaga pseudoflava* BOE3. Die höchste Wachstumsrate bei dieser Substratkonzentration hatte BOE100 mit $\mu = 0,565 \text{ h}^{-1}$, gefolgt von BOE4 ($0,397 \text{ h}^{-1}$), BOE10 ($0,374 \text{ h}^{-1}$), BOE200 ($0,362 \text{ h}^{-1}$), BOE2 ($0,35 \text{ h}^{-1}$), BOE7 ($0,325 \text{ h}^{-1}$), BOE6 ($0,272 \text{ h}^{-1}$), BOE1 ($0,229 \text{ h}^{-1}$), BOE3 ($0,193 \text{ h}^{-1}$), BOE300 ($0,144 \text{ h}^{-1}$) und BOE5 ($0,133 \text{ h}^{-1}$).

Die Wachstumsparameter bei weiteren Butoxyethanolkonzentrationen wurden bei den Hauptstämmen BOE3, BOE100 und BOE200 bestimmt. Dabei zeigten sich unterschiedliche Substratkonzentrations-Optima. BOE3, untersucht bei 2, 4, 6, 8 und 10 mM Butoxyethanol, erzielte bei einer BET-Konzentration von 4 mM eine Wachstumsrate von $0,204 \text{ h}^{-1}$ mit einer Verdopplungszeit von 204 Minuten. Die Wachstumsrate von BOE100 wurde bei BET-Konzentrationen von 5, 7,5, 10, 12,5 und 15 mM ermittelt und war mit $0,645 \text{ h}^{-1}$ am höchsten bei einer BET-Konzentration von 5 mM. Die Verdopplungszeit betrug 64 min. Wachstumskurven bei Substratkonzentrationen von 2, 4, 6, 8 und 10 mM wurden bei BOE200 aufgezeichnet. Die höchste Wachstumsrate betrug $0,395 \text{ h}^{-1}$ bei 6 mM BET ($t_d = 105 \text{ min}$).

BET-Konzentrationen von 20 mM wurden von den Stämmen BOE3 und BOE200 innerhalb von 3–4 Tagen vollständig abgebaut (s. Kapitel 4.7). Dasselbe gilt für 30 mM durch den Stamm BOE100. Alle Konzentrationen darüber führten zu deutlich verlangsamtem Wachstum. Außerdem akkumulierte BES beim BET-Abbau durch BOE100 und BOE200, was zu einem pH-Abfall im Medium führte.

Neben der Tatsache, dass unter den isolierten BET-Abbauern BOE100 das schnellste Wachstum mit Butoxyethanol zeigte und höhere Konzentrationen besser abbauen konnte, zeichnet den Stamm außerdem aus, dass er im Gegensatz zu den anderen Stämmen Salzkonzentrationen von 3,5–4 % tolerierte (s. Kapitel 4.4).

Diese Versuche zeigten, dass BOE100 den anderen Stämmen im Hinblick auf Wachstumsgeschwindigkeit und der Toleranz gegenüber erhöhten BET- und Salz-Konzentrationen überlegen war.

5.1.3 Antibiotikaresistenzen

Die Stämme BOE3, BOE100 und BOE200 wurden auf Resistenzen gegen die Antibiotika Chloramphenicol, Tetracyclin, Kanamycin, Ampicillin, Penicillin, Streptomycin und Nalidixinsäure getestet. Es stellte sich heraus, dass die beiden *Pseudomonas*-Stämme BOE100 und BOE200 gegen Ampicillin und Penicillin resistent waren. Eine natürlich vorkommende Resistenz gegen diese Antibiotika ist unter Pseudomonaden weit verbreitet (Hoogkamp-Korstanje & Westerdaal, 1979). Betrachtet man die Genomsequenzen von BOE100 und BOE200 finden sich einige beta-Lactamasen (BOE100: locus tags PputBOE100_01197, PputBOE100_03250, PputBOE100_04989, PputBOE100_06727; BOE200: Gene-IDs BOE01363,

BOE01430, BOE01431, BOE02060, BOE04244). BOE3 zeigte im Gegensatz dazu keine Resistenzen gegen die getesteten Antibiotika.

5.2 Die einzelnen Schritte des Abbaus von 2-Butoxyethanol

Der Abbau von Butoxyethanol durch die Stämme BOE3, BOE100 und BOE200 lässt sich in mehrere Schritte unterteilen: Zunächst wird die Hydroxylgruppe oxidiert, dann erfolgt die Etherspaltung und im Anschluss werden die daraus entstandenen Metabolite Glyoxylsäure und *n*-Butanol weiter verstoffwechselt.

5.2.1 Die Oxidation der Hydroxylgruppe

Die für die initiale Oxidation von Butoxyethanol benötigte Alkoholdehydrogenase wurde in BOE100 mittels Transposonmutagenese identifiziert (s. Kapitel 4.14). Zwölf Mutanten des Stammes konnten nicht mit Butoxyethanol wachsen, wohl aber mit Butoxyessigsäure. Der Reaktionsschritt vom Alkohol zur Säure wurde unterbrochen. Verantwortlich ist eine PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenase, die bereits in dem Stamm *Pseudomonas putida* U ausführlich beschrieben wurde und dort die Reaktion von Phenylethanol zu Phenylessigsäure katalysiert (Arias et al., 2008) (GenBank accession number EF406121). Die Gene dieses Abbauweges sind in insgesamt drei unterschiedlichen Genclustern organisiert. Zum einen das Phenylethanol Dehydrogenase Gencluster *pedS₁R₁ABCS₂R₂DEFGHI*, dann das Cytochrom c Biogenese Gencluster *ccmABCDEFXI* und zuletzt das PQQ Biosynthese Gencluster *pqqF(A)BCDE*. Bei den Transposonmutagenese-Versuchen in BOE100 wurden Mutanten erhalten, die in den Genen *pedF*, *pedR₂*, *pedS₂*, *pqqE*, *ccmA*, *ccmB*, *ccmC*, *ccmE* und *ccmF* ausgeknockt waren.

Vergleicht man die Nukleotidsequenzen des *ped*-Genclusters von *P. putida* U mit dem von BOE100 (Contig 30, IMG submission ID: 11454), so zeigen sich 19132 Übereinstimmungen bei 19183 Nukleotiden (99,7 %) mit 14 Gaps.

Die Genexpression des *ped*-Clusters wird reguliert durch zwei Zweikomponentensysteme (*pedS₁ + pedR₁* sowie *pedS₂ + pedR₂*), wobei *pedS* jeweils als Sensor fungiert und *pedR* die Regulation übernimmt. Arias et al. (2008) haben festgestellt, dass *pedS₁R₁* die wichtigere Rolle bei der Genregulation übernimmt und Mutanten, die im Gen *pedS₂* oder *pedR₂* ausgeknockt worden waren, weiterhin Alkohole oxidieren konnten, allerdings mit einer Verzögerung von 36 Stunden beim Abbau von Phenylethanol und 50 Stunden beim Abbau von Heptanol. Diese Beobachtung konnte im Stamm BOE100 nicht gemacht werden. Die Mutante P22 F29 ($\Delta pedR_2::Tn5$) zeigte auch nach 7 Tagen und länger kein Wachstum mit *n*-Hexanol, *n*-Octanol oder 2-Butoxyethanol (s. Abbildung 4.21, Kapitel 4.14).

Diskussion

Die Gene *pedABC* codieren für ein ABC-2-Typ Transportsystem, das exklusiv mit PQQ-abhängigen Enzymen in Erscheinung tritt. Dabei fungiert PedA als äußeres Membranprotein, PedB als ATP-bindendes Protein und PedC als Permease. Die Aufgabe dieses Systems besteht vermutlich darin, die Konzentrationen an Alkoholen und den daraus entstehenden toxischeren Aldehyden innerhalb der Zellen zu regulieren.

Downstream von *pedC* befindet sich das Gen *orf1*, dem Arias et al. (2008) keine Rolle bei der Alkoholorxidation zuweisen konnten. Ein CXXCW-Motiv weist auf eine mögliche Redox-Cofaktor-Bindestelle hin (TIGR03865, IPR022376) (Finn et al., 2017; Haft et al., 2013). Proteine dieser Familie sind häufig nahe Transportsystemen zu finden, die Alkohole mittels PQQ-abhängiger Dehydrogenase oxidieren, wie in diesem Fall das *pedABC*-System.

Das upstream von *pedA* gelegene Gen *orf2* hat Homologien zu der InterPro-Familie „ABC transporter, substrate-binding protein, PQQ-dependent alcohol dehydrogenase system“ (IPR022478) und ist demnach vermutlich ein Substrat-bindendes Protein, das mit dem ABC-Transportsystem *pedABC* verbunden ist.

Arias et al. haben sowohl eine $\Delta orf1::Tn5$ -Mutante als auch eine $\Delta orf2::Tn5$ -Mutante erzeugt, bei der der Abbau von Phenylethanol im Gegensatz zu den Mutanten, die in den Genen *pedA*, *pedB* und *pedC* ausgeknockt waren, nicht beeinflusst war. Daher spielen ORF1 und ORF2 vermutlich keine essentielle Rolle beim Transport von Phenylethanol in die Zelle bzw. möglichen Metaboliten aus der Zelle. Da in BOE100 keine derartige Mutante vorlag, kann über die Funktion dieser Gene beim Abbau bzw. Transport von BET keine Aussage getroffen werden.

PedD ist ein Protein, das das Pentapeptid Repeat-Motiv A(D/N)LXX 13 Mal enthält. Die Funktion dieser konservierten Proteine ist nicht geklärt (Bateman et al., 1998).

PedE und PedH sind Alkoholdehydrogenasen, um genauer zu sein Typ I Quinoprotein-Alkoholdehydrogenasen (EC 1.1.2.8), die im periplasmatischen Raum der Zelle lokalisiert sind. Die Aminosäuresequenzen dieser beiden Enzyme stimmen in BOE100 untereinander zu 52 % überein (68 % Positives, 5 % Gaps). Arias et al. (2008) zeigten, dass eine $\Delta pedE::Tn5$ -Mutante verzögert mit primären C6–C9-Alkoholen sowie Phenylethanol wuchs, das Wachstum mit Decanol aber nicht beeinflusst war. Daraufhin haben sie in dieser Mutante auch das *pedH*-Gen ausgeknockt. Besagte Doppelmutante konnte mit keinem der genannten Alkohole wachsen außer mit Decanol, hier jedoch mit einer deutlichen lag-Phase von 50 Stunden. Sie vermuteten, dass sowohl PedE als auch PedH die Oxidation von Phenylethanol katalysieren kann, PedE allerdings das bevorzugte Enzym ist, auch für die Oxidation von C6–C9-Alkoholen, und PedH vornehmlich Decanol und möglicherweise auch länger-kettige Alkohole oxidiert.

Typ I Quinoprotein Alkoholdehydrogenasen benötigen neben PQQ auch Cytochrom c_{550} , um funktional zu sein. PedF stellt ein Mono-Häm Cytochrom c_{550} dar, das als Elektronenakzeptor für die PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenasen fungiert (Mennenga et al., 2009).

PedG ist ein „putative ABC transporter substrate-binding protein“, das möglicherweise in den Substrattransport involviert ist.

PedI ist eine Aldehyddehydrogenase. Arias et al. (2008) fanden heraus, dass Mutanten, bei denen *pedI* ausgeknockt war, weiterhin Phenylethanol und andere Alkohole ohne verminderte Aktivität umsetzen konnten, weswegen über die Rolle im Abbau von Phenylethanol nur spekuliert werden kann. *P. putida* U besitzt jedenfalls mindestens eine weitere Aldehyddehydrogenase, die in der Lage ist, Phenylacetaldehyd zur Phenylethylsäure zu oxidieren, und möglicherweise ist PedI überhaupt nicht beim Abbau von Phenylethanol beteiligt. In BOE100 wurde das Gen *pedI* nicht inaktiviert. Ob es beim Abbau von Butoxyethanol vonnöten ist, kann daher weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Die Gene für die Synthese des Cofaktors PQQ sind in BOE100 im Gencluster *pqqFBCDE* organisiert und im Gesamtgenom von BOE100 in Contig 42 zu finden. Ein weiteres Gen, das benötigt wird, ist *pqqA*, das in BOE100 downstream von *pedI* lokalisiert ist (Contig 30). P88 F37, eine BOE100-Mutante, bei der das Gen *pqqE* ausgeknockt worden war, konnte nicht mit Butoxyethanol wachsen.

Das von *pedF* codierte Cytochrom c_{550} wird posttranslatorisch modifiziert, um funktional zu sein. Die hierfür nötigen Gene sind im Gencluster *ccmABCDEFGHI* (Contig 1) organisiert. Es wurden 8 Mutanten generiert, bei denen das Transposon in dieses Gencluster inseriert war. Die Mutanten P11 F47 und P19 F28 ($\Delta ccmA::Tn5$), P50 F27 ($\Delta ccmB::Tn5$), P9 F11 und P81 F22 ($\Delta ccmC::Tn5$), P65 F48 ($\Delta ccmE::Tn5$) sowie F67 F25 und P95 F5 ($\Delta ccmF::Tn5$) hatten die Fähigkeit verloren mit Butoxyethanol zu wachsen.

Da BOE100-Mutanten, bei denen eines der Gene dieser drei Gencluster inaktiviert worden war, nicht mehr in der Lage waren, mit BET zu wachsen, war davon auszugehen, dass PedE die Alkoholdehydrogenase ist, die die Reaktion von Butoxyethanol zu Butoxyethanal katalysiert. Dafür spricht auch, dass PedE im 2D-Proteingel detektiert wurden, demnach in BOE100 beim Wachstum mit BET synthetisiert wird (s. Kapitel 4.13).

Die Tatsache, dass die Mutanten P13 F44 ($\Delta pedF::Tn5$) und P22 F29 ($\Delta pedR_2::Tn5$) außerdem weder mit Hexanol noch Octanol, wohl aber mit Butanol und Pentanol wachsen konnten, zeigte, dass die Quinoprotein Alkoholdehydrogenase PedE neben Butoxyethanol (6 C-Atome) auch lineare C6- und C8-Alkohole (und möglicherweise auch länger-kettige) oxidiert, für C5- und kürzerkettige Alkohole aber andere Alkoholdehydrogenasen vorliegen. Obwohl in BOE100 28 unterschiedliche Alkoholdehydrogenasen codiert sind, scheint ausschließlich PedE in der Lage zu sein, Butoxyethanol, Hexanol und Octanol umsetzen zu können.

Somit ist die Alkoholdehydrogenase, die die initiale Reaktion vom Butoxyethanol zum Aldehyd katalysiert, im Stamm BOE100 identifiziert. Zu der anschließend aktiven Aldehyddehydrogenase kann, wie bereits erwähnt, keine genaue Aussage getroffen werden. Bei dem 2D-Proteingel wurde ein Luciferase-ähnliches Enzym identifiziert (PputBOE100_06638). Viele Luciferasen oxidieren Aldehyde zu Säuren, wobei Licht emittiert wird (Fisher et al., 1996). Da PputBOE100_06638 Homologien zu Luciferase-Enzymen aufweist, besteht die Möglichkeit, dass dieses Enzym Butoxyethanal zu Butoxyessigsäure umsetzt. Da aber außer diesem Enzym noch wenigstens 23 weitere Aldehyddehydrogenasen im Genom von BOE100 zu finden sind und nicht auszuschließen ist, dass mehr als nur ein Enzym diese Reaktion katalysieren kann, bleibt diese Vermutung reine Spekulation.

Die initialen Butoxyethanol-Abbaugene im Stamm *Pseudomonas Vancouverensis* BOE200 wurden nicht explizit untersucht. Es wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt, um alle am Abbau von Butoxyethanol beteiligten Gene zu identifizieren. Obwohl auch in diesem Stamm die Gene des *ped*-Genclusters vorhanden sind, war keines davon zum Zeitpunkt der Probenahme signifikant hochreguliert. Die Oxidation der Hydroxylgruppe wird demnach womöglich von einem anderen Enzym bewerkstelligt. Ein Enzym, das beim Abbau von Butoxyethanol hergestellt wurde, ist eine Typ II Quinohemoprotein-Alkoholdehydrogenase (BOE02094), EC-Nummer 1.1.9.1. Enzyme dieser Klasse, die in *Camomonas* und *Pseudomonas* spp. vorkommen, haben ein breites Substratspektrum an sowohl primären als auch sekundären Alkoholen und auch Aldehyden (Groen et al., 1986; Toyama et al., 1995; Stigter et al., 1997). Hochreguliert wurde außerdem eine Cholin-Dehydrogenase (BOE06858), die 50 % bzw. 51 % Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit den PEG-Dehydrogenasen PegA in *Sphingopyxis macrogoltabida* 103 bzw. *Sphingopyxis terrae* zeigt. Diese Stämme bauen PEGs unterschiedlichen Molekulargewichts ab und PegA ist jeweils das initiale Enzym, das die Hydroxyl- zur Aldehydgruppe oxidiert (Kawai et al., 1980) (s. auch Kapitel 2.2). Es kann folglich durchaus sein, dass eines dieser Enzyme die Oxidation von Butoxyethanol bewerkstelligt.

Des Weiteren sind zwei Phenylacetaldehyd-Dehydrogenasen in der Liste der hochregulierten Gene zu finden, BOE02092 BOE03872, die an der Oxidation des Butoxyethanals beteiligt sein könnten.

Im Genom von BOE200 sind jedoch jeweils etwa 30 unterschiedliche Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen zu finden, weswegen hier keine genaue Aussage getroffen werden kann. Die initiale Oxidation von Butoxyethanol durch BOE200 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht, da der Fokus auf der Spaltung des Ethers lag.

5.2.2 Die Spaltung des Ethers

Bei dem Stamm *Hydrogenophaga pseudoflava* BOE3 wurden zur Identifizierung des Etherspaltungsenzyms Transposonmutageneseversuche mit dem Plasmid pCro2a durchgeführt und 30 Mutanten erhalten, die kein oder stark vermindertes Wachstum mit Butoxyessigsäure, wohl aber gutes Wachstum mit Butanol zeigten (s. Kapitel 4.15). Bei 12 dieser Mutanten wurde das jeweils inaktivierte Gen identifiziert. Es wurden drei unterschiedliche Gene ausgeknockt, die innerhalb eines Bereiches von knapp 2,2 kbp liegen.

Um Abbaugene im Stamm *Pseudomonas Vancouverensis* BOE200 zu identifizieren, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt (s. Kapitel 4.16).

Bei den BOE3-Mutanten M301, M302, M304, M306, M309, M311 und M318, die nicht in der Lage waren mit BES zu wachsen, wurde das Gen mit der ID BOE3003 inaktiviert (s. Kapitel 4.15). Dieses Gen erhielt die Bezeichnung *egeA*(B3). „Ege“ ist die Abkürzung für Ethylenglycolether und EgeA ist das erste Protein („A“), das für die Etherspaltung in BOE3 („B3“) nötig ist. In BOE200 findet man in der Liste der Butoxyethanol-induzierten Gene das „fatty acid hydroxylase superfamily protein“ (Gen-ID BOE02141), das mit 73 % Übereinstimmung (84 % Positives, 0 Gaps) sehr hohe Homologien zu *egeA*(B3) zeigte und daher die Bezeichnung *egeA*(P) („P“ für *Pseudomonas*) erhielt.

Die Aminosäuresequenz dieser beiden Proteine wurde mit den Tools blastp, HHpred und ITASSER analysiert, um herauszufinden, zu welcher Enzymklasse sie gehören (s. Kapitel 4.17.1). Sie zählen zur pfam04116 „fatty acid hydroxylase superfamily“ und sind verwandt mit der Ceramide very long chain fatty acid hydroxylase SCS7 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Bei dieser handelt es sich um eine Fettsäure-alpha-Hydroxylase, die Inositolphosphorylceramid-B hydroxyliert, wobei Inositolphosphorylceramid-C entsteht (s. Kapitel 4.17.1). SCS7 ist ein Membranprotein und auch EgeA weist 4 Transmembran-Helices auf. Konservierte Motive dieser Fettsäure-alpha-Hydroxylase-Familie sind so genannte Histidin-Boxen, die sowohl in SCS7 als auch in EgeA zu finden sind. Insgesamt sind 41 Aminosäuren konserviert (s. Abbildung 4.30).

Beim Abbau von Butoxyessigsäure wird daraus folgend BES an alpha-Position hydroxyliert, ein instabiles Halbacetal entsteht, die Etherspaltung erfolgt und Butanol und Glyoxylsäure entstehen als Metabolite (s. Abbildung 4.36).

In der BOE3-Mutante M303 wurde das dem Gen *egeA*(B3) direkt benachbarte „hypothetical protein“ mit der Gen-ID BOE3004 inaktiviert. Dieses Gen wurde *egeB*(B3) benannt. M303 zeigte kein Wachstum mit BES. In BOE200 findet sich downstream von *egeA*(P) das Gen mit der ID BOE02142, das ebenso wie *egeA*(P) beim Abbau von Butoxyethanol hochreguliert wurde. Da es Homologien zu *egeB*(B3) zeigte (51 % Übereinstimmung, 72 % Positives, 0

Gaps), wurde es als *egeB*(P) bezeichnet. Auch EgeB ist ein Membranprotein mit zwei Transmembranbereichen.

Die Aminosäuresequenzen beider ORFs zeigten keinerlei Homologien zu bekannten Sequenzen (s. Kapitel 4.17.2). Analysiert mit dem Tool HHpred zeigten sich mit Wahrscheinlichkeiten von 89,3% bzw. 90,5% Verwandtschaften zu SecE, der Proteintranslocase-Untereinheit des protein translocation channel SecYEG in *Escherichia coli* K12 (s. Tabelle 4-23). Weitere Ähnlichkeiten gab es mit dem Glucose-Transporter GlcP_{se} in *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 und dem Phosphattransporter PiPT in *Piriformospora indica*. EgeB ist mit 61 (BOE3) bzw. 66 Aminosäuren (BOE200) Länge deutlich kürzer als die verwandten Proteine SecE (127 aa), GlcP_{se} (446 aa) und PiPT (530 aa).

Downstream von *egeA* und *egeB* liegt ein weiteres „hypothetical protein“, das Gen BOE3005 in BOE3 bzw. BOE02143 in BOE200, das die Bezeichnung *egeC* erhielt. In BOE200 wurde es beim Wachstum mit Butoxyethanol hochreguliert. EgeC(B3) und EgeC(P) zeigten untereinander 44% Übereinstimmung (50% Positives, 0 Gaps) in der Aminosäuresequenz. Es handelt sich um ein lösliches Protein.

Die Ergebnisse der HHpred-Analyse zeigten nur noch relativ geringe Wahrscheinlichkeiten für Verwandtschaften zu bekannten Proteinen (s. Tabelle 4-23). Die besten Treffer waren das Ubiquitin-ähnliche Protein Ubl4a aus *Homo sapiens*, das für die Biogenese endständig-verankerter Proteine vonnöten ist (55,2 bzw. 45,9% Wahrscheinlichkeit bei E-values von 58 bzw. 91) sowie die mRNA-decapping-Enzym-Untereinheit DCP1 aus *Drosophila melanogaster* (42,4 bzw. 57,4% Wahrscheinlichkeit bei E-values von 96 bzw. 51). In *Homo sapiens* übernimmt der Bag6-Ubl4a-Complex eine entscheidende Rolle bei dem posttranslatorischen Transport von membrangebundenen Proteinen in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (Mariappan et al., 2010; Darby et al., 2014; Kuwabara et al., 2015). Ubl4a hat eine Länge von 58 aa, während EgeC 114 bzw. 121 aa lang ist.

DCP1 ist Bestandteil des DCP1-DCP2-Komplexes, das in Eukaryonten wie *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* und *Saccharomyces cerevisiae* den Abbau von mRNA bewerkstelligt (LaGrandeur & Parker, 1998; Lykke-Andersen, 2002). DCP1 aus *D. melanogaster* hat eine Länge von 46 aa, das aus *Homo sapiens* 51 aa.

Welche genauen Funktionen EgeB und EgeC haben, lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass EgeB und EgeC an posttranslatorischen Modifikationen von EgeA beteiligt und für den Transport und die Lokalisierung in die Membran vonnöten sind. Weitere Untersuchungen sind nötig, um deren Aufgabe im Detail zu klären.

Das Tn5-Transposon inserierte bei den drei verbliebenen, noch nicht erläuterten BOE3-Mutanten M305, M307 und M308, deren Wachstum gehemmt war, aber dennoch stattfand, in eine alpha/beta Hydrolase (pfam00561) (BOE3006). Enzyme dieser Familie bilden eine

alpha/beta-Faltung, die aus 8 beta-Faltblättern besteht, die wiederum durch 6 alpha-Helices verbunden sind (Ollis et al., 1992). Zu ihr zählt man eine Vielzahl an unterschiedlichen Enzymen, u. a. Acetylcholinesterasen, Dienlactonhydrolasen, Lipasen, Thioesterasen, Serin-carboxypeptidasen, Proliniminopeptidasen, Prolinoligopeptidasen, Haloalkandehalogenasen, Haloperoxidasen, Epoxidhydrolasen und Hydroxynitrillyasen (Holmquist, 2000). Da das Wachstum mit BET in besagten Mutanten zwar gehemmt, aber nicht vollständig unterbunden worden war, konnte diesem Protein keine essentielle Rolle beim Abbau von Butoxyethanol zugesprochen werden. Die Insertion des Transposons in dieses Gen hat vermutlich polare Effekte, die sich negativ auf die Transkription der vorhergehenden Gene *egeA*, *egeB* und *egeC* ausgewirkt und somit das Wachstum vermindert hat.

Der finale Beweis dafür, dass alle drei Proteine EgeA, EgeB und EgeC für die Etherspaltung essentiell sind, wurde durch Überexpression in *Pseudomonas putida* KT2440 erbracht. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Expressionsplasmide konstruiert. Zum einen das Plasmid pCom10.egeA(P), bei dem das Gen *egeA(P)* in den Vektor pCom10 kloniert wurde, zum anderen das Plasmid pCom10.egeABC(P), bei dem alle drei Gene *egeA(P)*, *egeB(P)* und *egeC(P)* kloniert wurden (s. Kapitel 4.19). Die Überexpression wurde in Minimalmedium durchgeführt mit DCPK als Induktor und Butoxyessigsäure bzw. Butoxyethanol als alleiniger Kohlenstoffquelle. Der Wildtyp von KT2440 war nicht in der Lage mit BES zu wachsen, Butanol und auch Glyoxylsäure, die Etherspaltungsprodukte, konnte er als C-Quelle hingegen verwerten. In den Überexpressionsversuchen wurde daher rein auf Wachstum gescreent, da bei erfolgreicher Expression und Aktivität der Gene KT2440 in der Lage sein sollte, BES zu spalten und mit den Spaltungsprodukten zu wachsen. Hierbei hat sich herausgestellt, dass der Stamm *P. putida* KT2440 pCom10.egeA(P) nicht mit BES oder BET wachsen konnte, der Stamm *P. putida* KT2440 pCom10.egeABC(P) hingegen schon. Am Ende der Expressionsversuche wurde das Medium mit Dichlormethan extrahiert und im GC-MS analysiert und es konnte im Stamm KT2440 pCom10.egeABC(P) keine Butoxyessigsäure detektiert werden, sie wurde vollständig abgebaut. Es sind demnach alle drei Gene essentiell für die Spaltung der Ethergruppe, *egeA* alleine reicht nicht aus.

Die Gene *egeA(P)*, *egeB(P)* und *egeC(P)* wurden in allen Pseudomonaden unter den BOE-Stämmen mittels PCR nachgewiesen außer bei BOE7 (s. Kapitel 4.18). Im Genom von BOE100 finden sich diese Gene in Contig 91.

Die Nukleotidsequenzen dieses Genclusters und der umliegenden Bereiche ist bei den Stämmen BOE3, BOE100 und BOE200 bekannt. Auffällig ist hierbei, dass in allen drei Stämmen in unmittelbarer Umgebung mindestens ein Gen für eine Transposase zu finden ist. Es handelt sich demnach aller Voraussicht nach um mobile Gene, die in das Genom inserierten. Dafür spricht auch die Tatsache, dass man in der Datenbank von NCBI keine *Pseudomonas*- oder *Hydrogenophaga*-Treffer findet, wenn man die Proteinsequenz blastet,

sondern Übereinstimmungen von bis zu 100 % mit Proteinsequenzen aus *Alicyclophilus* sp., *Ralstonia pickettii*, *Macromonas* sp. und *Halomonas* sp.. Auch in diesen Stämmen findet sich eine Transposase in unmittelbarer Umgebung auf dem Genom. Ein weiteres Indiz dafür, dass es sich um mobile Elemente handelt, ist die Tatsache, dass das Gencluster *egeABC(P)* einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 51 % aufweist, das Gesamtgenom von BOE100 hingegen 61 %, das von BOE200 59 %. Diese abweichenden Werte sprechen dafür, dass die DNA ursprünglich aus einem anderen Organismus stammt.

5.2.3 Der weitere Abbau der Spaltungsprodukte

Die Dehydrogenierung von Butoxyethanol in BOE100 ist nicht NAD-abhängig (s. Kapitel 4.10). Im Rohextrakt wurde allerdings bei BET-induzierten BOE100-Zellen nach Zugabe von Butanol ein NAD-Umsatz gemessen, was bedeutet, dass beim Abbau von Butoxyethanol neben der Alkoholdehydrogenase, die BET oxidiert, noch mindestens eine weitere exprimiert wurde, die NAD-abhängig ist. Bei der Spaltung des Ethers entsteht Butanol, wie in Kapitel 4.8 gezeigt wurde. Besagte NAD-anhängige Alkoholdehydrogenase könnte also zu dem Zweck hergestellt worden sein, den Metabolit Butanol zum Aldehyd umzusetzen. Um welche Alkoholdehydrogenase es sich im Detail handelt, wurde nicht näher untersucht, da der Abbauweg von Butanol nicht der eigentliche Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit war. Das Gen mit dem locus tag PputBOE100_00725, das für eine Zink- und NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase codiert, ist ein möglicher Kandidat. Dieses Gen wurde mittels der 2D-Gelelektrophorese identifiziert, wurde demnach beim Wachstum mit BET hochreguliert (s. Kapitel 4.13). Doch da die Annotation des Genoms von BOE100 insgesamt 28 Alkoholdehydrogenasen ergeben hat, lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen, welches dieser Enzyme Butanol oxidiert und ob nicht sogar mehrere diese Reaktion katalysieren können.

Im 2D-Proteingel von BOE100 und bei der Genexpressionsanalyse von BOE200 wurde eine Vielzahl weiterer Enzyme detektiert, die im Zusammenhang mit dem Abbau der Spaltungsprodukte Glyoxylsäure und *n*-Butanol stehen.

Der Glyoxylatzyklus ist ein Stoffwechselweg, der anaplerotische Reaktionen zur Synthese von C4-Molekülen wie Succinat, Malat, Oxaloacetat und Citrat aus dem C2-Molekül Acetyl-CoA beinhaltet. Wie der Name schon sagt ist Glyoxylat ein Bestandteil dieses Zykluses. Beim Wachstum mit BET wurden Enzyme dieses Stoffwechselweges exprimiert (s. Kapitel 4.13 und 4.16). Die Reaktion von Acetyl-CoA mit Glyoxylat zu Malat wird von der Malatsynthase katalysiert. Die Isocitratlyase katalysiert die Reaktion von *D-threo*-isocitrat zu Glyoxylat unter Abspaltung von Succinat. Dem Glyoxylatzyklus benachbarte Reaktionen fanden ebenfalls statt. Die Malatdehydrogenase mit der EC-Nummer 1.1.1.40 (nicht zu verwechseln mit

1.1.1.37) decarboxyliert sowohl Malat als auch Oxaloacetat und es entsteht Pyruvat. Mit Beteiligung des Enzyms Tartronatesemialdehydsynthase reagieren 2 Glyoxylatmoleküle unter Abspaltung von CO_2 zu 2 Molekülen Tartonatsemialdehyd. Dieses reagiert durch das Enzym 2-Hydroxy-3-oxopropionatreduktase weiter zu Glycerat. Eine andere Weiterreaktion des Tartonatsemialdehyds, bei der Hydroxypyruvat entsteht, wird durch die Hydroxypyruvatisomerase katalysiert. Detektiert wurde außerdem die Glycolatoxidase, die Glycolat zu Glyoxylat oxidiert. Die Reaktion zwischen Hydroxypyruvat und Glycerat wird von der ebenfalls exprimierten Hydroxypyruvatreduktase katalysiert. Die Gene der Enzyme Glycolatoxidase, Hydroxypyruvatreduktase, 2-Hydroxy-3-oxopropionatreduktase, Hydroxypyruvatisomerase und Tartonatsemialdehydsynthase liegen in einem gemeinsamen Gencluster und werden zusammen exprimiert.

Die Reaktionen der hochregulierten Gene, die mit dem Metabolismus von Butanol und damit verbunden dem Fettsäureabbau assoziiert sind, werden nachfolgend erläutert. Die Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysiert die erste Reaktion des Fettsäureabbaus, wobei aus einem Acyl-CoA ein $\text{trans-}\Delta^2$ -Enoyl-CoA wird. Das 3-Hydroxybutanoyl-CoA reagiert mit Hilfe der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase zu Acetoacetyl-CoA. Die 3-Oxoacid-CoA-transferase bewältigt die Reaktion von Acetoacetyl-CoA mit Succinat, wobei Acetoacetat und Succinyl-CoA entstehen. Eine andere Reaktion des Acetoacetyl-CoAs ist die Umwandlung zu Acetyl-CoA durch die Acetyl-CoA C-Acetyltransferase. Die Pyruvatformatlyase bildet aus Acetyl-CoA und Format Pyruvat, das durch die Acetolactatsynthase zu Acetolactat konvertiert wird.

Die Detektion all dieser Gene in Butoxyethanol-induzierten Zellen von BOE100 und BOE200 unterstreicht die Vermutung, dass beim Abbau von BET Glyoxylsäure und Butanol als Zwischenprodukte entstehen.

5.2.4 Kompakt: Der Abbauweg von 2-Butoxyethanol

Der Abbau von 2-Butoxyethanol durch die Stämme BOE3, BOE100 und BOE200 beginnt mit der Oxidation der Hydroxylgruppe zur Aldehyd- und weiter zur Carboxylgruppe, wobei Butoxyessigsäure entsteht. In BOE100 wird die erste Reaktion durch die Alkoholdehydrogenase PedE katalysiert, in den anderen Stämmen wurde dies nicht näher untersucht. Die Spaltung des Ethers erfolgt erst nach Oxidation zu Butoxyessigsäure. Diese wird durch die Fettsäure-alpha-Hydroxylase EgeA unter Beteiligung der Proteine EgeB und EgeC in alpha-Position hydroxyliert, die instabile 2-Hydroxy-2-butoxyessigsäure entsteht und zerfällt in Glyoxylsäure und *n*-Butanol. Glyoxylsäure und Butanol werden im Glyoxylat-Zyklus bzw. im Butanoat-Metabolismus weiter verstoffwechselt.

5.3 Ausblick

Die Rolle der Proteine EgeB und EgeC bei der Etherspaltung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht zufriedenstellend geklärt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass sie für den Transport und die Lokalisierung von EgeA in die Membran benötigt werden, was experimentell jedoch in keiner Weise belegt werden konnte. Weitere Untersuchungen zur Funktion dieser beiden Enzyme müssen zukünftig erfolgen.

Zu den Butoxyethanol-Abbaugenen in *Gordonia terrae* BOE5 und *Cupriavidus oxalaticus* BOE300 gibt es keine Informationen, da der Fokus dieser Arbeit auf den Stämmen BOE3, BOE100 und BOE200 lag. Die Gene *egeA*, *egeB* und *egeC* konnten in BOE5 und BOE300 nicht nachgewiesen werden. Mit welchen Enzymen und auf welche Weise der Abbau von Butoxyethanol und anderen Glycolethern in diesen beiden Stämmen vonstatten geht, bleibt weiterhin Forschungsgegenstand.

6 Literaturverzeichnis

- Abbani, M., Iwahara, M. & Clubb, R. T. (2005). The structure of the excisionase (Xis) protein from conjugative transposon Tn916 provides insights into the regulation of heterobivalent tyrosine recombinases. *Journal of Molecular Biology* 347, 11–25.
- Adachi, K., Iwayama, Y., Tanioka, H. & Takeda, Y. (1966). Purification and properties of homogentisate oxygenase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochimica et Biophysica Acta* 118, 88–97.
- Altenschmidt, U., Oswald, B., Steiner, E., Herrmann, H. & Fuchs, G. (1993). New aerobic benzoate oxidation pathway via benzoyl-coenzyme A and 3-hydroxybenzoyl-coenzyme A in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Journal of Bacteriology* 175, 4851–4858.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Arcos, M., Olivera, E. R., Arias, S., Naharro, G. & Luengo, J. M. (2010). The 3,4-dihydroxyphenylacetic acid catabolon, a catabolic unit for degradation of biogenic amines tyramine and dopamine in *Pseudomonas putida* U. *Environmental microbiology* 12, 1684–1704.
- Arias, S., Olivera, E. R., Arcos, M., Naharro, G. & Luengo, J. M. (2008). Genetic analyses and molecular characterization of the pathways involved in the conversion of 2-phenylethylamine and 2-phenylethanol into phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U. *Environmental microbiology* 10, 413–432.
- Arias-Barrau, E., Olivera, E. R., Luengo, J. M., Fernández, C., Galán, B., García, J. L., Díaz, E. & Miñambres, B. (2004). The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 186, 5062–5077.
- Arp, D. J. (1999). Butane metabolism by butane-grown '*Pseudomonas butanovora*'. *Microbiology* 145 (Pt 5), 1173–1180.
- Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. & Momenbeik, F. (2011). *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. *New biotechnology* 28, 656–664.
- Atlas, R. M. & Hazen, T. C. (2011). Oil biodegradation and bioremediation. A tale of the two worst spills in U.S. history. *Environmental science & technology* 45, 6709–6715.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L.,

- Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. & Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics* 9, 75.
- Baggi, G., Barbieri, P., Galli, E. & Tollari, S. (1987). Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2129–2132.
- Bagn ris, C., Cammack, R. & Mason, J. R. (2005). Subtle difference between benzene and toluene dioxygenases of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1570–1580.
- Bai, Y., McCoy, J. G., Levin, E. J., Sobrado, P., Rajashankar, K. R., Fox, B. G. & Zhou, M. (2015). X-ray structure of a mammalian stearyl-CoA desaturase. *Nature* 524, 252–256.
- Balashova, N. V., Kosheleva, I. A., Golovchenko, N. P. & Boronin, A. M. (1999). Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. *Process Biochemistry* 35, 291–296.
- Baptist, J. N., Gholson, R. K. & Coon, M. J. (1963). Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system. I. Products of octane oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 69, 40–47.
- Bateman, A., Murzin, A. G. & Teichmann, S. A. (1998). Structure and distribution of pentapeptide repeats in bacteria. *Protein science : a publication of the Protein Society* 7, 1477–1480.
- Bauer, D. (2011). Variant calling comparison CASAVA1.8 and GATK. *Nature Precedings*.
- Bayly, R. C., Dagley, S. & Gibson, D. T. (1966). The metabolism of cresols by species of *Pseudomonas*. *Biochemical Journal* 101, 293–301.
- Bayly, R. C. & Wigmore, G. J. (1973). Metabolism of phenol and cresols by mutants of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 113, 1112–1120.
- Behrman, E. J. & Stanier, R. Y. (1957). The bacterial oxidation of nicotinic acid. *Journal of Biological Chemistry* 228, 923–945.
- Bosch, R., Moore, E. R., García-Vald es, E. & Pieper, D. H. (1999). NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Journal of Bacteriology* 181, 2315–2322.
- BP Gulf Science Data (2014a). *Application of dispersants to surface oil slicks by aircraft and by boat in approved areas of the Gulf of Mexico from April 22, 2010 to final application on July 19, 2010*: Harte Research Institute. <https://data.gulfresearchinitiative.org/data/BP.x750.000:0017>.

- BP Gulf Science Data (2014b). *Subsea Dispersant Application records collected during the Deepwater Horizon (DWH) accident near the Mississippi Canyon block 252 wellhead from April 30 to July 22, 2010*: Harte Research Institute. <https://data.gulfresearchinitiative.org/data/BP.x750.000:0018#>.
- 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 Biochemistry* 72, 248–254.
- Brandsch, R. (2006). Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *Applied microbiology and biotechnology* 69, 493–498.
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A., Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A. R. & Xia, F. (2015). RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific reports* 5, 8365.
- Brunel, F. & Davison, J. (1988). Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes encoding vanillate demethylase. *J. Bacteriol.* 170, 4924–4930.
- Brunschwig, E. & Darzins, A. (1992). A two-component T7 system for the overexpression of genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 111, 35–41.
- Catelani, D., Sorlini, C. & Treccani, V. (1971). The metabolism of biphenyl by *Pseudomonas putida*. *Experientia* 27, 1173–1174.
- Charoenpanich, J., Tani, A., Moriwaki, N., Kimbara, K. & Kawai, F. (2006). Dual regulation of a polyethylene glycol degradative operon by AraC-type and GalR-type regulators in *Sphingopyxis macrogoltabida* strain 103. *Microbiology* 152, 3025–3034.
- Chimalakonda, G., Ruiz, N., Chng, S.-S., Garner, R. A., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2011). Lipoprotein LptE is required for the assembly of LptD by the β -barrel assembly machine in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 2492–2497.
- Collet, J.-F. & Bardwell, J. C. A. (2002). Oxidative protein folding in bacteria. *Molecular microbiology* 44, 1–8.
- Committee on Energy and Commerce U.S. House of Representatives (2011). *Chemicals used in hydraulic fracturing*.
- Corkery, D. M., O'Connor, K. E., Buckley, C. M. & Dobson, A. D.W. (1994). Ethylbenzene degradation by *Pseudomonas fluorescens* strain CA-4. *FEMS Microbiology Letters* 124, 23–27.

- Cuskey, S. M., Peccoraro, V. & Olsen, R. H. (1987). Initial catabolism of aromatic biogenic amines by *Pseudomonas aeruginosa* PAO: Pathway description, mapping of mutations, and cloning of essential genes. *Journal of Bacteriology* 169, 2398–2404.
- Dagley, S. & Gibson, D. T. (1965). The bacterial degradation of catechol. *Biochemical Journal* 95, 466–474.
- Darby, J. F., Krysztofinska, E. M., Simpson, P. J., Simon, A. C., Leznicki, P., Sriskandarajah, N., Bishop, D. S., Hale, L. R., Alfano, C., Conte, M. R., Martínez-Lumbreras, S., Thapaliya, A., High, S. & Isaacson, R. L. (2014). Solution structure of the SGTA dimerisation domain and investigation of its interactions with the ubiquitin-like domains of BAG6 and UBL4A. *PLoS one* 9, e113281.
- Dash, S. S. & Gummadi, S. N. (2006a). Biodegradation of Caffeine by *Pseudomonas* sp. NCIM 5235. *Research J. of Microbiology* 1, 115–123.
- Dash, S. S. & Gummadi, S. N. (2006b). Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnology Letters* 28, 1993–2002.
- Davey, J. F. & Gibson, D. T. (1974). Bacterial metabolism of *para*- and *meta*-xylene: Oxidation of a methyl substituent. *Journal of Bacteriology* 119, 923–929.
- Dehmel, U., Engesser, K.-H., Timmis, K. N. & Dwyer, D. F. (1995). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding a novel dioxygenase involved in metabolism of carboxydiphenyl ethers in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310. *Archives of microbiology* 163, 35–41.
- Di Martino, C., López, N. I. & Raiger Lustman, L. J. (2012). Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 67, 15–20.
- Dunn, T. M., Haak, D., Monaghan, E. & Beeler, T. J. (1998). Synthesis of monohydroxylated inositolphosphorylceramide (IPC-C) in *Saccharomyces cerevisiae* requires Scs7p, a protein with both a cytochrome b₅-like domain and a hydroxylase/desaturase domain. *Yeast* 14, 311–321.
- Dwyer, D. F. & Tiedje, J. M. (1986). Metabolism of polyethylene glycol by two anaerobic bacteria, *Desulfovibrio desulfuricans* and a *Bacteroides* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 852–856.
- Elantak, L., Ansaldi, M., Guerlesquin, F., Méjean, V. & Morelli, X. (2005). Structural and genetic analyses reveal a key role in prophage excision for the Tor1 response regulator inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 280, 36802–36808.

- El-mansi, E.M.T. & Anderson, S.C.K. (2004). The hydroxylation of vanillate and its conversion to methoxyhydroquinone by a strain of *Pseudomonas fluorescens* devoid of demethylase and methylhydroxylase activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 827–832.
- Enokibara, S. & Kawai, F. (1997). Purification and characterization of an ether bond-cleaving enzyme involved in the metabolism of polyethylene glycol. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83, 549–554.
- EPA (2011). Revisions needed to national contingency plan based on Deepwater Horizon oil spill, report No. 11-P-0534. <https://www.epa.gov/office-inspector-general/report-revisions-needed-national-contingency-plan-based-deepwater-horizon>, accessed January 8, 2018.
- European Chemicals Bureau (2006). 2-Butoxyethanol (EGBE). Part I - Environment. In *European Union Risk Assessment Report*.
- Feist, C. F. & Hegeman, G. D. (1969). Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: Regulation of tangential pathways. *Journal of Bacteriology* 100, 869–877.
- Fiedler, S. & Wirth, R. (1988). Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Analytical Biochemistry* 170, 38–44.
- Fincher, E. L. & Payne, W. J. (1962). Bacterial utilization of ether glycols. *Applied Microbiology* 10, 542–547.
- Finn, R. D., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A. J., Chang, H.-Y., Dosztányi, Z., El-Gebali, S., Fraser, M., Gough, J., Haft, D., Holliday, G. L., Huang, H., Huang, X., Letunic, I., Lopez, R., Lu, S., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Mistry, J., Natale, D. A., Necci, M., Nuka, G., Orengo, C. A., Park, Y., Pesseat, S., Piovesan, D., Potter, S. C., Rawlings, N. D., Redaschi, N., Richardson, L., Rivoire, C., Sangrador-Vegas, A., Sigrist, C., Sillitoe, I., Smithers, B., Squizzato, S., Sutton, G., Thanki, N., Thomas, P. D., Tosatto, S. C. E., Wu, C. H., Xenarios, I., Yeh, L.-S., Young, S.-Y. & Mitchell, A. L. (2017). InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. *Nucleic acids research* 45, D190-D199.
- Fisher, A. J., Thompson, T. B., Thoden, J. B., Baldwin, T. O. & Rayment, I. (1996). The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. *Journal of Biological Chemistry* 271, 21956–21968.
- Forney, F. W. & Markovetz, A. J. (1970). Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons. *Journal of Bacteriology* 102, 281–282.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A. & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2461–2470.

- Frings, J. & Schink, B. (1994). Fermentation of phenoxyethanol to phenol and acetate by a homoacetogenic bacterium. *Archives of microbiology* 162, 199–204.
- Frings, J., Schramm, E. & Schink, B. (1992). Enzymes involved in anaerobic polyethylene glycol degradation by *Pelobacter venetianus* and *Bacteroides* strain PG1. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2164–2167.
- Furukawa, H., Wieser, M., Morita, H., Sugio, T. & Nagasawa, T. (1998). Purification and characterization of eugenol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* E118. *Archives of microbiology* 171, 37–43.
- Furukawa, K., Hayase, N., Taira, K. & Tomizuka, N. (1989). Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: Some soil bacteria possess a highly conserved *bph* operon. *J. Bacteriol.* 171, 5467–5472.
- Gauthier, J. J. & Rittenberg, S. C. (1971). The metabolism of nicotinic acid: I. Purification and properties of 2,5-dihydroxypyridine oxygenase from *Pseudomonas putida* N-9. *Journal of Biological Chemistry* 246, 3737–3742.
- Gibson, D. T., Gschwendt, B., Yeh, W. K. & Kopal, V. M. (1973). Initial reactions in the oxidation of ethylbenzene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 12, 1520–1528.
- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J. & Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research* 36, 3420–3435.
- Grant, M. A. & Payne, W. J. (1983). Anaerobic growth of *Alcaligenes faecalis* var. *denitrificans* at the expense of ether glycols and nonionic detergents. *Biotechnology and Bioengineering* 25, 627–630.
- Groen, B. W., van Kleef, M. A. G. & Duine, J. A. (1986). Quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochemical Journal* 234, 611–615.
- Gu, X., Zhang, Y., Zhang, J., Yang, M., Tamaki, H., Kamagata, Y. & Li, D. (2010). Isolation of phylogenetically diverse nonylphenol ethoxylate-degrading bacteria and characterization of their corresponding biotransformation pathways. *Chemosphere* 80, 216–222.
- Gunsalus, C. F., Stanier, R. Y. & Gunsalus, I. C. (1953). The enzymatic conversion of mandelic acid to benzoic acid. III. Fractionation and properties of the soluble enzymes. *Journal of Bacteriology* 66, 548–553.
- Gunsalus, I. C., Gunsalus, C. F. & Stanier, R. Y. (1953). The enzymatic conversion of mandelic acid to benzoic acid. I. Gross fractionation of the system into soluble and particulate components. *Journal of Bacteriology* 66, 538–542.

- Guroff, G. & Rhoads, C. A. (1967). Phenylalanine hydroxylase from *Pseudomonas* species (ATCC 11299a). Purification of the enzyme and activation by various metal ions. *Journal of Biological Chemistry* 242, 3641–3645.
- Haak, D., Gable, K., Beeler, T. & Dunn, T. (1997). Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29704–29710.
- Haft, D. H., Selengut, J. D., Richter, R. A., Harkins, D., Basu, M. K. & Beck, E. (2013). TIGR-FAMs and Genome Properties in 2013. *Nucleic acids research* 41, D387-95.
- Haines, J. R. & Alexander, M. (1975). Microbial degradation of polyethylene glycols. *Applied Microbiology* 29, 621–625.
- Harpel, M. R. & Lipscomb, J. D. (1990). Gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*. Purification, characterization, and comparison of the enzymes from *Pseudomonas testosteroni* and *Pseudomonas acidovorans*. *Journal of Biological Chemistry* 265, 6301–6311.
- Hegeman, G. D. (1966). Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by the wild type. *Journal of Bacteriology* 91, 1140–1154.
- Heng, J., Zhao, Y., Liu, M., Liu, Y., Fan, J., Wang, X., Zhao, Y. & Zhang, X. C. (2015). Substrate-bound structure of the *E. coli* multidrug resistance transporter MdfA. *Cell research* 25, 1060–1073.
- Hildebrand, A., Remmert, M., Biegert, A. & Söding, J. (2009). Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. *Proteins* 77 Suppl 9, 128–132.
- Holmquist, M. (2000). Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Current protein & peptide science* 1, 209–235.
- Hoogkamp-Korstanje, J. A. & Westerdaal, N. A. (1979). *In vitro* susceptibility of *Pseudomonas* to four beta-lactam antibiotics (ampicillin, cephalothin, carbenicillin, piperacillin), to four aminoglycosides (kanamycin, amikacin, gentamicin, tobramycin) and to colimycin. *Chemotherapy* 25, 48–53.
- Horecker, B. L. & Kornberg, A. (1948). THE EXTINCTION COEFFICIENTS OF THE REDUCED BAND OF PYRIDINE NUCLEOTIDES. *Journal of Biological Chemistry* 175, 385–390.
- Hosoya, H., Miyazaki, N., Sugisaki, Y., Takanashi, E., Tsurufuji, M., Yamasaki, M. & Tamura, G. (1978). Bacterial degradation of synthetic polymers and oligomers with the special reference to the case of polyethylene glycol. *Agricultural and Biological Chemistry* 42, 1545–1552.

- Howard, P. H. (1991). *Handbook of environmental degradation rates*. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Hu, X., Fukutani, A., Liu, X., Kimbara, K. & Kawai, F. (2007). Isolation of bacteria able to grow on both polyethylene glycol (PEG) and polypropylene glycol (PPG) and their PEG/PPG dehydrogenases. *Applied microbiology and biotechnology* 73, 1407–1413.
- Hu, X., Liu, X., Tani, A., Kimbara, K. & Kawai, F. (2008). Proposed oxidative metabolic pathway for polypropylene glycol in *Sphingobium* sp. strain PW-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72, 1115–1118.
- Huang, C. Y., Olieric, V., Ma, P., Panepucci, E., Diederichs, K., Wang, M. & Caffrey, M. (2015). *In meso in situ* serial X-ray crystallography of soluble and membrane proteins. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 71, 1238–1256.
- Iancu, C. V., Zmoon, J., Woo, S. B., Aleshin, A. & Choe, J.-y. (2013). Crystal structure of a glucose/H⁺ symporter and its mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 17862–17867.
- IARC (2006). Volume 88: Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-*tert*-Butoxypropan-2-ol. In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*.
- Ingledeu, W. M. & Tai, C. C. (1972). Quinate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian journal of microbiology* 18, 1817–1824.
- Jimenez, J. I., Minambres, B., Garcia, J. L. & Diaz, E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4, 824–841.
- Jindrová, E., Chocová, M., Demnerová, K. & Brenner, V. (2002). Bacterial aerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene. *Folia Microbiologica* 47, 83–93.
- John, D. M. & White, G. F. (1998). Mechanism for biotransformation of nonylphenol polyethoxylates to xenoestrogens in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 180, 4332–4338.
- Jomaa, A., Boehringer, D., Leibundgut, M. & Ban, N. (2016). Structures of the *E. coli* translating ribosome with SRP and its receptor and with the translocon. *Nature communications* 7, 10471.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.
- Kadow, M., Loschinski, K., Saß, S., Schmidt, M. & Bornscheuer, U. T. (2012). Completing the series of BVMOs involved in camphor metabolism of *Pseudomonas putida* NCIMB 10007 by identification of the two missing genes, their functional expression in *E. coli*, and biochemical characterization. *Applied microbiology and biotechnology* 96, 419–429.

- Kawai, F. (1985). Existence of ether bond-cleaving enzyme in a polyethylene glycol-utilizing symbiotic mixed culture. *FEMS Microbiology Letters* 30, 273–276.
- Kawai, F. (2010). The biochemistry and molecular biology of xenobiotic polymer degradation by microorganisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74, 1743–1759.
- Kawai, F. & Enokibara, S. (1996). Role of novel dye-linked dehydrogenases in the metabolism of polyethylene glycol by pure cultures of *Sphingomonas* sp. N6. *FEMS Microbiology Letters* 141, 45–50.
- Kawai, F. & Hu, X. (2009). Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Applied microbiology and biotechnology* 84, 227.
- Kawai, F., Kimura, T., Fukaya, M., Tani, Y., Ogata, K., Ueno, T. & Fukami, H. (1978). Bacterial oxidation of polyethylene glycol. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 679–684.
- Kawai, F., Kimura, T., Tani, Y., Yamada, H. & Kurachi, M. (1980). Purification and characterization of polyethylene glycol dehydrogenase involved in the bacterial metabolism of polyethylene glycol. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 701–705.
- Kawai, F. & Takeuchi, M. (1996). Taxonomical position of newly isolated polyethylene glycol-utilizing bacteria. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82, 492–494.
- Kawai, F. & Yamanaka, H. (1986). Biodegradation of polyethylene glycol by symbiotic mixed culture (obligate mutualism). *Archives of microbiology* 146, 125–129.
- Kawai, F. & Yamanaka, H. (1989). Inducible or constitutive polyethylene glycol dehydrogenase involved in the aerobic metabolism of polyethylene glycol. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 67, 300–302.
- Kleindienst, S., Seidel, M., Ziervogel, K., Grim, S., Loftis, K., Harrison, S., Malkin, S. Y., Perkins, M. J., Field, J., Sogin, M. L., Dittmar, T., Passow, U., Medeiros, P. M. & Joye, S. B. (2015). Chemical dispersants can suppress the activity of natural oil-degrading microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Kohlweyer, U., Thiemer, B., Schraeder, T. & Andreesen, J. R. (2000). Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1. *FEMS Microbiology Letters* 186, 301–306.
- Kover, S. C., Rosario-Ortiz, F. L. & Linden, K. G. (2014). Photochemical fate of solvent constituents of Corexit oil dispersants. *Water Research* 52, 101–111.
- Koyama, H. (1982). Purification and characterization of a novel L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501. *The Journal of Biochemistry* 92, 1235–1240.

- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 33, 1870–1874.
- Kurnasov, O., Jablonski, L., Polanuyer, B., Dorrestein, P., Begley, T. & Osterman, A. (2003). Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiology Letters* 227, 219–227.
- Kuwabara, N., Minami, R., Yokota, N., Matsumoto, H., Senda, T., Kawahara, H. & Kato, R. (2015). Structure of a BAG6 (Bcl-2-associated athanogene 6)-Ubl4a (ubiquitin-like protein 4a) complex reveals a novel binding interface that functions in tail-anchored protein biogenesis. *The Journal of biological chemistry* 290, 9387–9398.
- LaGrandeur, T. E. & Parker, R. (1998). Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *The EMBO Journal* 17, 1487–1496.
- Lee, S., Sowa, M. E., Choi, J.-M. & Tsai, F. T. F. (2004). The ClpB/Hsp104 molecular chaperone—a protein disaggregating machine. *Journal of structural biology* 146, 99–105.
- Li, S., Wang, S. & Yan, W. (2016). Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by co-metabolism with a *Pseudomonas* sp. strain. *International journal of environmental research and public health* 13.
- Liu, X., Tani, A., Kimbara, K. & Kawai, F. (2006). Metabolic pathway of xenoestrogenic short ethoxy chain-nonylphenol to nonylphenol by aerobic bacteria, *Ensifer* sp. strain AS08 and *Pseudomonas* sp. strain AS90. *Applied microbiology and biotechnology* 72, 552–559.
- Liu, X., Tani, A., Kimbara, K. & Kawai, F. (2007). Xenoestrogenic short ethoxy chain nonylphenol is oxidized by a flavoprotein alcohol dehydrogenase from *Ensifer* sp. strain AS08. *Applied microbiology and biotechnology* 73, 1414–1422.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., Liu, Y., Tang, J., Wu, G., Zhang, H., Shi, Y., Liu, Y., Yu, C., Wang, B., Lu, Y., Han, C., Cheung, D. W., Yiu, S.-M., Peng, S., Xiaoqian, Z., Liu, G., Liao, X., Li, Y., Yang, H., Wang, J., Lam, T.-W. & Wang, J. (2012). SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler. *Gigascience* 1, 18.
- Lykke-Andersen, J. (2002). Identification of a Human Decapping Complex Associated with hUpf Proteins in Nonsense-Mediated Decay. *Molecular and Cellular Biology* 22, 8114–8121.
- Mariappan, M., Li, X., Stefanovic, S., Sharma, A., Mateja, A., Keenan, R. J. & Hegde, R. S. (2010). A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature* 466, 1120–1124.
- Markowitz, V. M., Chen, I.-M. A., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K., Ivanova,

- N. N. & Kyrpides, N. C. (2012). IMG: The Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system. *Nucleic acids research* 40, D115-22.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D. A., Boulnois, G. J. & Claverys, J.-P. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucl Acids Res* 20, 3479–3483.
- Mathew, S. & Abraham, T. E. (2006). Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. *Critical reviews in microbiology* 32, 115–125.
- Matoba, Y., Bando, N., Oda, K., Noda, M., Higashikawa, F., Kumagai, T. & Sugiyama, M. (2011). A molecular mechanism for copper transportation to tyrosinase that is assisted by a metallochaperone, caddie protein. *The Journal of biological chemistry* 286, 30219–30231.
- Mennenga, B., Kay, C. W. M. & Görisch, H. (2009). Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: the unusual disulfide ring formed by adjacent cysteine residues is essential for efficient electron transfer to cytochrome c_{550} . *Archives of microbiology* 191, 361.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics* 11, 31–46.
- Mirza, O., Guan, L., Verner, G., Iwata, S. & Kaback, H. R. (2006). Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY. *The EMBO Journal* 25, 1177–1183.
- Mooney, A., Ward, P. G. & O'Connor, K. E. (2006). Microbial degradation of styrene: biochemistry, molecular genetics, and perspectives for biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology* 72, 1.
- Morales, M., Nava, V., Velásquez, E., Razo-Flores, E. & Revah, S. (2009). Mineralization of methyl *tert*-butyl ether and other gasoline oxygenates by Pseudomonads using short n-alkanes as growth source. *Biodegradation* 20, 271–280.
- Murray, K., Duggleby, C. J., Williams, P. A. & Sala-Trepat, J. M. (1972). The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the *meta*-cleavage pathway by *Pseudomonas arvilla* mt-2. *European journal of biochemistry* 28, 301–310.
- Nakazawa, T. & Yokota, T. (1973). Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: Demonstration of two benzoate pathways. *Journal of Bacteriology* 115, 262–267.
- Nalco (2011). *Corexit EC9527A Safety Data Sheet*. <https://www.nalcoenvironmentalsolutionsllc.com/documents/>, accessed July 4, 2011.

- Nam, I.-H., Chon, C.-M., Jung, K.-Y. & Kim, J.-G. (2014). Biodegradation of biphenyl and 2-chlorobiphenyl by a *Pseudomonas* sp. KM-04 isolated from PCBs-contaminated coal mine soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 93, 89–94.
- Narumiya, S., Takai, K., Tokuyama, T., Noda, Y., Ushiro, H. & Hayaishi, O. (1979). A new metabolic pathway of tryptophan initiated by tryptophan side chain oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 254, 7007–7015.
- Nestl, B. M., Geinitz, C., Popa, S., Rizek, S., Haselbeck, R. J., Stephen, R., Noble, M. A., Fischer, M.-P., Ralph, E. C., Hau, H. T., Man, H., Omar, M., Turkenburg, J. P., van Dien, S., Culler, S. J., Grogan, G. & Hauer, B. (2017). Structural and functional insights into asymmetric enzymatic dehydration of alkenols. *Nature chemical biology* 13, 275–281.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal* 1, 841–845.
- Nomura, N., Verdon, G., Kang, H. J., Shimamura, T., Nomura, Y., Sonoda, Y., Hussien, S. A., Qureshi, A. A., Coincon, M., Sato, Y., Abe, H., Nakada-Nakura, Y., Hino, T., Arakawa, T., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Murata, T., Kobayashi, T., Hamakubo, T., Kasahara, M., Iwata, S. & Drew, D. (2015). Structure and mechanism of the mammalian fructose transporter GLUT5. *Nature* 526, 397–401.
- Obradors, N. & Aguilar, J. (1991). Efficient biodegradation of high-molecular-weight polyethylene glycols by pure cultures of *Pseudomonas stutzeri*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2383–2388.
- OECD (1997). *SIDS Initial Assessment Report for 6th SIAM, 2-Butoxyethanol*. Paris: UNEP Publications.
- OECD (2004). *SIDS Initial Assessment Report for SIAM 19, Monoethylene Glycol Ethers Category*. Berlin: UNEP Publications.
- Ohta, T., Kawabata, T., Nishikawa, K., Tani, A., Kimbara, K. & Kawai, F. (2006). Analysis of amino acid residues involved in catalysis of polyethylene glycol dehydrogenase from *Sphingopyxis terrae*, using three-dimensional molecular modeling-based kinetic characterization of mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4388–4396.
- Ohta, T., Tani, A., Kimbara, K. & Kawai, F. (2005). A novel nicotinoprotein aldehyde dehydrogenase involved in polyethylene glycol degradation. *Applied microbiology and biotechnology* 68, 639–646.

- Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Numata, M., Tsuchikane, K., Hosoyama, A., Yamazoe, A., Tsuda, M., Fujita, N. & Kawai, F. (2015). Complete genome sequence of a polypropylene glycol-degrading strain, *Microbacterium* sp. No. 7. *Genome announcements* 3.
- Olivera, E. R., Reglero, A., Martínez-Blanco, H., Fernández-Medarde, A., Moreno, M. A. & Luengo, J. M. (1994). Catabolism of aromatics in *Pseudomonas putida* U. Formal evidence that phenylacetic acid and 4-hydroxyphenylacetic acid are catabolized by two unrelated pathways. *European journal of biochemistry* 221, 375–381.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I. & Schrag, J. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein engineering* 5, 197–211.
- Onaca, C., Kieninger, M., Engesser, K.-H. & Altenbuchner, J. (2007). Degradation of alkyl methyl ketones by *Pseudomonas veronii* MEK700. *Journal of Bacteriology* 189, 3759–3767.
- Ougham, H. J., Taylor, D. G. & Trudgill, P. W. (1983). Camphor revisited: Involvement of a unique monooxygenase in metabolism of 2-oxo- Δ^3 -4,5,5-trimethylcyclopentenylic acid by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 153, 140–152.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F. & Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research* 42, 14.
- Park, M. S., Han, J. H., Yoo, S. S., Lee, E. Y., Lee, S. G. & Park, S. (2005). Degradation of styrene by a new isolate *Pseudomonas putida* SN1. *Korean Journal of Chemical Engineering* 22, 418–424.
- Parker, J. L., Li, C., Brinth, A., Wang, Z., Vogeley, L., Solcan, N., Ledderboge-Vucinic, G., Swanson, J. M. J., Caffrey, M., Voth, G. A. & Newstead, S. (2017). Proton movement and coupling in the POT family of peptide transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 13182–13187.
- Pawitan, Y., Michiels, S., Koscielny, S., Gusnanto, A. & Ploner, A. (2005). False discovery rate, sensitivity and sample size for microarray studies. *Bioinformatics* 21, 3017–3024.
- Payne, W. J. (1963). Pure culture studies of the degradation of detergent compounds. *Biotechnology and Bioengineering* 5, 355–365.
- Payne, W. J. & Todd, R. L. (1966). Flavin-linked dehydrogenation of ether glycols by cell-free extracts of a soil bacterium. *Journal of Bacteriology* 91, 1533–1536.

- Pearce, B. A. & Heydeman, M. T. (1980). Metabolism of di(ethylene glycol) [2-(2'-hydroxyethoxy)ethanol] and other short poly(ethylene glycol)s by gram-negative bacteria. *Microbiology* 118, 21–27.
- Pedersen, B. P., Kumar, H., Waight, A. B., Risenmay, A. J., Roe-Zurz, Z., Chau, B. H., Schlessinger, A., Bonomi, M., Harries, W., Sali, A., Johri, A. K. & Stroud, R. M. (2013). Crystal structure of a eukaryotic phosphate transporter. *Nature* 496, 533–536.
- Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S. & Yao, Q.-H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 927–955.
- Plaggenborg, R., Overhage, J., Steinbüchel, A. & Priefert, H. (2003). Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied microbiology and biotechnology* 61, 528–535.
- Priefert, H., Rabenhorst, J. & Steinbüchel, A. (1997). Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *Journal of Bacteriology* 179, 2595–2607.
- Pryor, E. E., Horanyi, P. S., Clark, K. M., Fedoriw, N., Connelly, S. M., Koszelak-Rosenblum, M., Zhu, G., Malkowski, M. G., Wiener, M. C. & Dumont, M. E. (2013). Structure of the integral membrane protein CAAX protease Ste24p. *Science (New York, N.Y.)* 339, 1600–1604.
- Punta, M., Coghill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R., Bateman, A. & Finn, R. D. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research* 40, D290-301.
- Ramazzina, I., Cendron, L., Folli, C., Berni, R., Monteverdi, D., Zanotti, G. & Percudani, R. (2008). Logical identification of an allantoinase analog (*puuE*) recruited from polysaccharide deacetylases. *Journal of Biological Chemistry* 283, 23295–23304.
- Retallack, D. M., Thomas, T. C., Shao, Y., Haney, K. L., Resnick, S. M., Lee, V. D. & Squires, C. H. (2006). Identification of anthranilate and benzoate metabolic operons of *Pseudomonas fluorescens* and functional characterization of their promoter regions. *Microbial cell factories* 5, 1.
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental microbiology* 11, 2477–2490.
- Rosenberg, S. L. (1971). Regulation of the mandelate pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 108, 1257–1269.

- Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* 5, 725–738.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4, 406–425.
- Schink, B. & Stieb, M. (1983). Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 1905–1913.
- Schramm, E. & Schink, B. (1991). Ether-cleaving enzyme and diol dehydratase involved in anaerobic polyethylene glycol degradation by a new *Acetobacterium* sp. *Biodegradation* 2, 71–79.
- Seidman, M. M., Toms, A. & Wood, J. M. (1969). Influence of side-chain substituents on the position of cleavage of the benzene ring by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 97, 1192–1197.
- Selifonov, S. A. (1992). Microbial oxidation of adamantanone by *Pseudomonas putida* carrying the camphor catabolic plasmid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186, 1429–1436.
- Shanklin, J., Whittle, E. & Fox, B. G. (1994). Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33, 12787–12794.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7, 539.
- Simon, O., Klebensberger, J., Mükschel, B., Klaiber, I., Graf, N., Altenbuchner, J., Huber, A., Hauer, B. & Pfannstiel, J. (2015). Analysis of the molecular response of *Pseudomonas putida* KT2440 to the next-generation biofuel n-butanol. *Journal of Proteomics* 122, 11–25.
- Singh, S., Stavrinides, J., Christendat, D. & Guttman, D. S. (2008). A phylogenomic analysis of the shikimate dehydrogenases reveals broadscale functional diversification and identifies one functionally distinct subclass. *Molecular biology and evolution* 25, 2221–2232.
- Smith, M. R. (1990). The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* 1, 191–206.
- Smith, M. R. & Ratledge, C. (1989). Catabolism of alkylbenzenes by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643. *Applied microbiology and biotechnology* 32, 68–75.

- Smits, T. H.M., Seeger, M. A., Witholt, B. & van Beilen, J. B. (2001). New alkane-responsive expression vectors for *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Plasmid* 46, 16–24.
- Smits, T. H.M., Witholt, B. & van Beilen, J. B. (2003). Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 84, 193–200.
- Söding, J. (2005). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21, 951–960.
- Somyoonsap, P., Tani, A., Charoenpanich, J., Minami, T., Kimbara, K. & Kawai, F. (2008). Involvement of PEG-carboxylate dehydrogenase and glutathione S-transferase in PEG metabolism by *Sphingopyxis macrogoltabida* strain 103. *Applied microbiology and biotechnology* 81, 473–484.
- Sonnhammer, E. L., Heijne, G. von & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* 6, 175–182.
- Speranza, G., Mueller, B., Orlandi, M., Morelli, C. F., Manitto, P. & Schink, B. (2002). Mechanism of anaerobic ether cleavage. Conversion of 2-phenoxyethanol to phenol and acetaldehyde by *Acetobacterium* sp. *The Journal of biological chemistry* 277, 11684–11690.
- Speranza, G., Mueller, B., Orlandi, M., Morelli, C. F., Manitto, P. & Schink, B. (2003). Stereochemistry of the Conversion of 2-Phenoxyethanol into Phenol and Acetaldehyde by *Acetobacterium* sp. *Helvetica Chimica Acta* 86, 2629–2636.
- Staijen, I. E., Marcionelli, R. & Witholt, B. (1999). The $P_{alkBFGHJKL}$ promoter is under carbon catabolite repression control in *Pseudomonas oleovorans* but not in *Escherichia coli alk⁺* recombinants. *J. Bacteriol.* 181, 1610–1616.
- Stanier, R. Y., Gunsalus, I. C. & Gunsalus, C. F. (1953). The enzymatic conversion of mandelic acid to benzoic acid. II. Properties of the particulate fractions. *Journal of Bacteriology* 66, 543–547.
- Stanier, R. Y., Hayaishi, O. & Tsuchida, M. (1951). The bacterial oxidation of tryptophan. I. A general survey of the pathways. *Journal of Bacteriology* 62, 355–366.
- Stigter, E. C.A., van der Lugt, J. P. & Somers, W. A.C. (1997). Enantioselective oxidation of secondary alcohols by quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2, 291–297.
- Straß, A. & Schink, B. (1986). Fermentation of polyethylene glycol via acetaldehyde in *Pelobacter venetianus*. *Applied microbiology and biotechnology* 25, 37–42.

- Sugimoto, M., Tanabe, M., Hataya, M., Enokibara, S., Duine, J. A. & Kawai, F. (2001). The first step in polyethylene glycol degradation by Sphingomonads proceeds via a flavoprotein alcohol dehydrogenase containing flavin adenine dinucleotide. *Journal of Bacteriology* 183, 6694–6698.
- Suzuki, T. (1978). Degradation of polyvinyl alcohol by microorganisms. III. Oxidation of secondary alcohols by polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by *Pseudomonas* O-3. *Agricultural and Biological Chemistry* 42, 1187–1194.
- Suzuki, T., Ichihara, Y., Yamada, M. & Tonomura, K. (1973). Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agricultural and Biological Chemistry* 37, 747–756.
- Tachibana, S., Kawai, F. & Yasuda, M. (2002). Heterogeneity of dehydrogenases of *Stenotrophomonas maltophilia* showing dye-linked activity with polypropylene glycols. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66, 737–742.
- Tachibana, S., Kuba, N., Kawai, F., Duine, J. A. & Yasuda, M. (2003). Involvement of a quinoprotein (PQQ-containing) alcohol dehydrogenase in the degradation of polypropylene glycols by the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters* 218, 345–349.
- Tachibana, S., Naka, N., Kawai, F. & Yasuda, M. (2008). Purification and characterization of cytoplasmic NAD-dependent polypropylene glycol dehydrogenase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters* 288, 266–272.
- Takeuchi, M., Hamana, M. & Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51, 1405–1417.
- Takeuchi, M., Kawai, F., Shimada, Y. & Yokota, A. (1993). Taxonomic study of polyethylene glycol-utilizing bacteria: Emended description of the genus *Sphingomonas* and new descriptions of *Sphingomonas macrogoltabidus* sp. nov., *Sphingomonas sanguis* sp. nov. and *Sphingomonas terrae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 16, 227–238.
- Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 11030–11035.
- Tani, A., Charoenpanich, J., Mori, T., Takeichi, M., Kimbara, K. & Kawai, F. (2007). Structure and conservation of a polyethylene glycol-degradative operon in sphingomonads. *Microbiology* 153, 338–346.

- Tani, A., Somyoonsap, P., Minami, T., Kimbara, K. & Kawai, F. (2008). Polyethylene glycol (PEG)-carboxylate-CoA synthetase is involved in PEG metabolism in *Sphingopyxis macrogoltabida* strain 103. *Archives of microbiology* 189, 407–410.
- Tao, Y., Fishman, A., Bentley, W. E. & Wood, T. K. (2004). Oxidation of benzene to phenol, catechol, and 1,2,3-trihydroxybenzene by toluene 4-monooxygenase of *Pseudomonas mendocina* KR1 and toluene 3-monooxygenase of *Ralstonia pickettii* PKO1. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3814–3820.
- Tasaki, Y., Yoshikawa, H. & Tamura, H. (2006). Isolation and characterization of an alcohol dehydrogenase gene from the octylphenol polyethoxylate degrader *Pseudomonas putida* S-5. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70, 1855–1863.
- Teufel, R., Mascaraque, V., Ismail, W., Voss, M., Perera, J., Eisenreich, W., Haehnel, W. & Fuchs, G. (2010). Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 14390–14395.
- Thacker, R., Rørvig, O., Kahlon, P. & Gunsalus, I. C. (1978). NIC, a conjugative nicotine-nicotinate degradative plasmid in *Pseudomonas convexa*. *Journal of Bacteriology* 135, 289–290.
- Thélu, J., Medina, L. & Pelmont, J. (1980). Oxidation of polyoxyethylene oligomers by an inducible enzyme from *Pseudomonas* P 400. *FEMS Microbiology Letters* 8, 187–190.
- Thomas, J. G. & Baneyx, F. (2000). ClpB and HtpG facilitate *de novo* protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Molecular microbiology* 36, 1360–1370.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22, 4673–4680.
- Toyama, H., Fujii, A., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyama, M. & Adachi, O. (1995). Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *J. Bacteriol.* 177, 2442–2450.
- Tritschler, F., Braun, J. E., Motz, C., Igreja, C., Haas, G., Truffault, V., Izaurralde, E. & Weichenrieder, O. (2009). DCP1 forms asymmetric trimers to assemble into active mRNA decapping complexes in metazoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 21591–21596.
- Tudroszen, N. J., Kelly, D. P. & Millis, N. F. (1977). α -Pinene metabolism by *Pseudomonas putida*. *Biochemical Journal* 168, 315–318.

- U.S. EPA (2010). *Toxicological review of ethylene glycol monobutyl ether (EGBE) (CAS No. 111-76-2)*. Washington, DC.
- Uehara, T. & Park, J. T. (2003). Identification of MpaA, an amidase in *Escherichia coli* that hydrolyzes the γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelate bond in murein peptides. *J. Bacteriol.* 185, 679–682.
- Utkin, I. B., Yakimov, M. M., Matveeva, L. N., Kozlyak, E. I., Rogozhin, I. S., Solomon, Z. G. & Bezborodov, A. M. (1991). Degradation of styrene and ethylbenzene by *Pseudomonas* species Y2. *FEMS Microbiology Letters* 77, 237–242.
- van Beilen, J. B. & Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied microbiology and biotechnology* 74, 13–21.
- van Beilen, J. B., Wubbolts, M. G. & Witholt, B. (1994). Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation* 5, 161–174.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, Frans J. de & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25–40.
- Veteikytė, A., Aštrauskaitė, M., Gruškienė, R., Tekorienė, R. & Matijošytė, I. (2013). Secondary alcohol oxidase activity identified in genus of *Pseudomonas* isolated from the oil polluted soil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2, 89–95.
- Wada, E. & Yamasaki, K. (1954). Degradation of nicotine by soil bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 155–157.
- Wagener, S. & Schink, B. (1988). Fermentative degradation of nonionic surfactants and polyethylene glycol by enrichment cultures and by pure cultures of homoacetogenic and propionate-forming bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 561–565.
- Watson, A. A., Alm, R. A. & Mattick, J. S. (1996). Construction of improved vectors for protein production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 172, 163–164.
- Watson, G. K. & Jones, N. (1977). The biodegradation of polyethylene glycols by sewage bacteria. *Water Research* 11, 95–100.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697–703.
- Wheelis, M. L., Palleroni, N. J. & Stanier, R. Y. (1967). The metabolism of aromatic acids by *Pseudomonas testosteroni* and *P. acidovorans*. *Archiv für Mikrobiologie* 59, 302–314.

- Williams, P. A. & Murray, K. (1974). Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida (arvilla)* mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. *Journal of Bacteriology* 120, 416–423.
- Williams, P. A. & Sayers, J. R. (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation* 5, 195–217.
- Wittich, R.-M., Schmidt, S. & Fortnagel, P. (1990). Bacterial degradation of 3- and 4-carboxybiphenyl ether by *Pseudomonas* sp. NSS2. *FEMS Microbiology Letters* 67, 157–160.
- Worsey, M. J. & Williams, P. A. (1975). Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas (putida (arvilla))* mt-2: Evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 124, 7–13.
- Yamanaka, H. & Kawai, F. (1989). Purification and characterization of constitutive polyethylene glycol (PEG) dehydrogenase of a PEG 4000-utilizing *Flavobacterium* sp. no. 203. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 67, 324–330.
- Yamanaka, H. & Kawai, F. (1991). Purification and characterization of a glycolic acid (GA) oxidase active toward diglycolic acid (DGA) produced by DGA-utilizing *Rhodococcus* sp. No. 432. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71, 83–88.
- Yamashita, M., Tani, A. & Kawai, F. (2004a). A new ether bond-splitting enzyme found in Gram-positive polyethylene glycol 6000-utilizing bacterium, *Pseudonocardia* sp. strain K1. *Applied microbiology and biotechnology* 66, 174–179.
- Yamashita, M., Tani, A. & Kawai, F. (2004b). Cloning and expression of an ether-bond-cleaving enzyme involved in the metabolism of polyethylene glycol. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98, 313–315.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature methods* 12, 7–8.
- Yoon, B.-J. (2009). Hidden Markov Models and their applications in biological sequence analysis. *Current genomics* 10, 402–415.
- Yoshida, S. (1964). Metabolism of shikimic and quinic acids in *Pseudomonas ovalis*. *Shokubutsugaku Zasshi* 77, 10–16.
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics* 9, 40.
- Zhao, Y., Mao, G., Liu, M., Zhang, L., Wang, X. & Zhang, X. C. (2014). Crystal structure of the *E. coli* peptide transporter YbgH. *Structure* 22, 1152–1160.

Literaturverzeichnis

Zhu, G., Koszelak-Rosenblum, M., Connelly, S. M., Dumont, M. E. & Malkowski, M. G. (2015). The crystal structure of an integral membrane fatty acid α -hydroxylase. *The Journal of biological chemistry* 290, 29820–29833.

Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S.-Z., Rau, D., Kübler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Söding, J., Lupas, A. N. & Alva, V. (2017). A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *Journal of Molecular Biology*.

7 Anhang

7.1 16S rRNA-Gensequenzen

Pseudomonas knackmussii BOE1 (1310 bp) (GenBank accession number: MH580159)

```

1 tagtggggga caacgtttcg aaaggaacgc taataccgca tacgtcctac gggagaaagc
61 aggggacctt cgggccttgc gctatcagat gaggcctaggt cggattagct agttgggtgag
121 gtaacggctc accaaggcga cgatccgtaa ctggctctgag aggatgatca gtcacactgg
181 aactgagaca cggtcagac tcctacggga ggcagcagtg gggaaatattg gacaatgggc
241 gaaagcctga tccagccatg ccgctgtgtg gaagaaggtc ttcggattgt aaagcacttt
301 aagttgggag gaagggcatt aacctaatc gttagtgttt tgacgttacc gacagaataa
361 gcaccgggcta acttcgtgcc agcagccgcy gtaatacgaa gggtgcaagc gttaatcgga
421 attactgggc gtaaagcgcy cgtaggtggt ttgttaagtt gaatgtgaaa gccccgggct
481 caacctggga actgcatcca aaactggcaa gctagagtat ggcagagggg ggtggaattt
541 cctgtgtagc ggtgaaatgc gtagatatag gaaggaacac cagtggcgaa ggcgaccacc
601 tgggctaata ctgacactga ggtgcaaaag cgtggggagc aaacaggatt agataccctg
661 gtagtccacg ccgtaaacga tgtcgactag ccgttgggat cttgagatc ttagtggcgc
721 agctaacgca ttaagtcgac cgcctgggga gtacggccgc aaggttaaaa ctcaaatgaa
781 ttgacggggg cccgcacaag cggtgagca tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcaagaac
841 cttaccaggc cttgacatgc agagaacttt ccagagatgg attggtgcct tcgggaactc
901 tgacacaggt gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatggtggg ttaagtcccg
961 taacgagcgc aacccttgtc cttagttacc agcacgttaa ggtgggact ctaaggagac
1021 tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaag tcatcatggc cttacggcc
1081 tgggctacac acgtgctaca atggtcggta caaaggggtg ccaagccgcy aggtggagct
1141 aatcccataa aaccgatcgt agtccgatc gcagctctgca actcgactgc gtgaagtccg
1201 aatcgctagt aatcgtaaat cagaatgtca cgggtaatac gttcccgggc cttgtacaca
1261 ccgcccgtca caccatggga gtgggttgc cagaagtag ctagtctaac

```

Pseudomonas putida BOE2 (1390 bp) (GenBank accession number: MH580208)

```

1 agtcgagcgg atgagaagag cttgctcttc gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct
61 aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc
121 ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgctctatc agatgagcct aggtcggatt
181 agctagttgg tgaggtaatg gtcaccaag ggcagatcc gtaactggtc tgagaggatg
241 atcagtcaca ctggaactga gacacggtec agactcctac gggaggcagc agtggggaat
301 attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgctg gtgtgaagaa ggtcttcgga
361 ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttgacgt
421 taccgacaga ataagcaccg gctaactctg tgccagcagc cgcggttaata cagaggggtg
481 aagcgttaat cggattact gggcgtaaag cgcgctagg tggtttgta agttggatgt
541 gaaagccccg ggtcaacct gggaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtacggtaga
601 ggggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg
661 cgaaggcgac cacctggact gatactgaca ctgaggtgcy aaagcgtggg gagcaaacag
721 gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcaa ctagccgttg gaatccttga
781 gatttttagt gcgcagctaa cgcattaagt tgaccgcctg gggagtacgg ccgcaagggt
841 aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa
901 gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttcagag atggattggg
961 gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt
1021 tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg taatggtggg
1081 cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca
1141 tggcccttac ggccgtgggt acacacgtgc tacaatggtc ggtacagagg gttgccaagc
1201 cgcgaggtgg agctaattct acaaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga
1261 ctgctgaaag tcggaatcgc tagtaatcgc gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc
1321 gggccttcta cacaccgccc gtcacacat gggagtgggt tgcaccagaa gtagctagtc
1381 taaccttcgg

```

Anhang

Hydrogenophaga pseudoflava BOE3 (1378 bp) (GenBank accession number: MH580209)

```
1 caggccgcaa ggtgctgacg agtggcgaac gggtgagtaa tgcacgga cgtgccagc
61 cgtgggggat aacgcagcga aagctgtgct aataccgcat acgatctatg gatgaaagcg
121 ggggaccgta aggcctcgcg cgattggagc ggccgatgtc agattaggtg gttgggtggg
181 taaagcccta ccaagccaac gatctgtagc tggctctgaga ggacgaccag ccacactggg
241 actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtg ggaatttttg acaatgggcg
301 caagcctgat ccagcaatgc cgcgtgcagg aagaaggcct tcgggttgta aactgctttt
361 gtacggaacg aaacggctct ggtaataacc ctggactaat gacggtaccg taagaataag
421 caccggctaa ctacgtgcca gcagccgchg taatacgtag ggtgcaagcg ttaatcggaa
481 ttactgggcg taaagcgtgc gcaggcggtt ttgtaagaca ggcgtgaaat ccccgggctc
541 aacctgggaa ttgctgtgtg actgcaagcg ctggagtgcg gcagaggggg atggaattcc
601 gcgtagtagc gtgaaatgcg tagatagcg gaggaacacc gatggcgaag gcaatcccct
661 gggcctgcac tgacgctcat gcacgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg
721 tagtccacgc cctaaacgat gtcaactggt tgttgggaat ttactttctc agtaacgaag
781 ctaacgcgtg aagttgaccg cctggggagt acggccgcaa ggttgaaact caaaggaatt
841 gacggggacc cgcacaagcg gtggatgatg tggtttaatt cgatgcaacg cgaaaaacct
901 taccacacct tgacatggca ggaagtttcc agagatggat tcgtgctcga aagagaacct
961 gcacacaggt gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgctcgt agatgttggg ttaagtcccg
1021 caacgagcgc aacccttgcc attagttgct acgaaagggc actctaattg gactgccggg
1081 gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgct aagtcctcat ggcccttata ggtggggcta
1141 cacacgcat acaatggccg gtacaaaggg cagccaacc gcaaggggga gccaatcca
1201 taaagccggt cgtagtccgg atcgcagctc gcaactcgac tgcgtgaagt cggaatcgct
1261 agtaatcggt gatcagcatg tcacggtgaa tacgttcccg ggtcttgta acaccgcccg
1321 tcacaccatg ggagcgggctc tcgccagaag tagttagcct aaccgcaag agggcgat
```

Pseudomonas umsongensis BOE4 (1401 bp) (GenBank accession number: MH580210)

```
1 atgcagtcga gcggatgaag agagcttgct ctctgattca gcggcggacg ggtgagtaat
61 gcctaggaat ctgcctggta gtgggggaca acgtctcgaa agggacgcta ataccgcata
121 cgtcctacgg gagaaagcag gggaccttcg gcccttgcg tatcagatga gcctaggtcg
181 gattagctag ttggtgaggt aatggctcac caaggcgacg atccgtaact ggtctgagag
241 gatgatcagt cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtggg
301 gaatattgga caatgggcca aagcctgatc cagccatgcc gcgtgtgtga agaaggtctt
361 cggattgtaa agcactttaa gttgggagga agggcagtaa attaatactt tgctgttttg
421 acgttaccga cagaataagc accggctaac tctgtgccag cagccgcggt aatacagagg
481 gtgcaagcgt taatcggaat tactgggctg aaagcgcgcg taggtgggtt gttaagttgg
541 atgtgaaatc cccgggctca acctgggaac tgcattcaaa actgacaagc tagagtatgg
601 tagagggtyg tggaaattcc tgtgtagcgg tgaatgctg agatatagga aggaacacca
661 gtggcgaagc cgaccacctg gactgatact gacactgagg tgcgaaagcg tggggagcaa
721 acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg tcaactagcc gttgggagcc
781 ttgagctctt agtggcgag ctaacgcatt aagttgaccg cctggggagt acggccgcaa
841 ggttaaaaact caaatgaatt gacgggggccc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt
901 cgaagcaacg cgaagaacct taccaggcct tgacatcaa tgaactttcc agagatggat
961 tgggtgccttc gggaacattg agacaggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag
1021 atgttggggt aagtcccgtg acgagcgcaa ccctgtcct tagttaccag cacgtaatgg
1081 tgggactctt aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc
1141 atcatggccc ttacggcctg ggctacacac gtgctacaat ggtcgggtaca gagggttgcc
1201 aagccgaggt gtggagctaa tcccataaaa ccgatcgtag tccggatcgc agtctgcaac
1261 tcgactgcgt gaagtccgaa tcgctagtaa tcgcaatca gaatgtcgcg gtgaatacgt
1321 tcccgggccc tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt gggttgcacc agaagtagct
1381 agtctaacct tcgggaggac
```

Anhang

Gordonia terrae BOE5 (1310bp) (GenBank accession number: MH580211)

```
1 gagtaacacg tgggtgatct gccctgcact ctgggataag cctgggaaac tgggtctaatt
61 accggatatg accaactgtc gcatgggtgt tgggtgaaag cttttgcggt gtgggatggg
121 cccgcggcct atcagcttgt tgggtgggta atggcctacc aaggcgacga cgggtagccg
181 acctgagagg gtgatcggcc aactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc
241 agcagtgggg aatattgcac aatgggcgca agcctgatgc agcgacgccg cgtgagggat
301 gacggccttc gggttgtaaa cctctttcac cagggacgaa gcgtgagtga cggtacctgg
361 agaagaagca cccggccaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg tgcgagcgtt
421 gtccggaatt actgggcgta aagagctcgt aggcggttt tgcgctcgtc tgtgaaattc
481 tgcaactcaa ttgcaggcgt gcaggcgata cgggcagact tgagtactac aggggagact
541 ggaattcctg gtgtagcggg gaaatgcgca gatatcagga ggaacaccgg tggcgaaggc
601 gggctctctg gtagtactg acgctgagga gcgaaagcgt gggtagcgaa caggattaga
661 taccctggta gtccacgccg taaacggtgg gtactaggtg tgggttcctt ttcacgggat
721 ccgtgccgta gctaacgcat taagtacccc gcctggggag tacggccgca aggctaaaac
781 tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggccggagcat gtggattaat tcgatgcaac
841 gcgaagaacc ttacctgggt ttgacataca ccagacgccg ctagagatag tcgttcctt
901 gtggttggtg tacaggtggg gcatggctgt cgtcagctcg tgcgtgaga tgttgggtta
961 agtcccgcaa cgagcgcaac ccttgcctg tattgccagc gggttatgcc ggggacttgc
1021 aggagactgc cgggtcaac tcggagaag gtgggatga cgtcaagtca tcatgccct
1081 tatgtccagg gcttcacacn tgctacaatg cctggtagag agggctgcga taccgtgagg
1141 tggagcgaat ccctaaagc cagtctcagt tcggattggg gtctgcaact cgacccatg
1201 aagtcggagt cgtagtaat cgcagatcag caacgctgcg gngaatacgt tcccggcct
1261 tgtacacacc gccgctcag tcatgaaagt cggtaacacc cgaagccggt
```

Pseudomonas extremaustralis BOE6 (1366 bp) (GenBank accession number: MH580212)

```
1 agcttgcttc tcttgagagc ggccgacggg tgagtaatgc ctaggaatct gcctggtagt
61 gggggataac gttcggaaac ggacgctaatt accgcatacgc tcctacggga gaaagcaggg
121 gaccttcggg ccttgcgcta tcagatgagc ctaggtcggg ttagctagtt ggtgaggtaa
181 tggctcacca aggcgacgat ccgtaactgg tctgagagga tgatcagtca cactggaact
241 gagacacggg ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgaaa
301 gcctgatcca gccatgccgc gtgtgtgaag aaggctcttcg gattgtaaag cactttaagt
361 tgggaggaag rgcagttacc taatacgtga ttgttttgac gttaccgaca gaataagcac
421 cggctaactc tgtgccagca gccgcggtaa tacagagggg gcaagcgtta atcggaatta
481 ctgggcgtaa agcgcgcgta ggtggttagt taagttggat gtgaaatccc cgggctcaac
541 ctgggaactg cattcaaaac tgactgacta gagtatgga gaggggtggg gaatttcctg
601 tgtagcggg aaatgcgtag atataggaag gaacaccagt ggcgaaggcg accacctgga
661 ctgatactga cactgagggt cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag
721 tccacgccgt aaacgatgtc aactagccgt tgggagcctt gagctcttag tggcgcagct
781 aacgcattaa gttgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca aatgaattga
841 cgggggcccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta
901 ccaggccttg acatccaatg aactttctag agatagattg gtgccttcgg gaacattgag
961 acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgtaac
1021 gagcgcaacc cttgtcctta gttaccagca cgttatgggt ggcactctaa ggagactgcc
1081 ggtgacaaac cggaggaagg tgggatgac gtcaagtcac catggccctt acggcctggg
1141 ctacacacgt gctacaatgg tcggtacaga gggttgcaa gccgcgaggg ggagctaatac
1201 ccagaaaacc gatcgtagtc cggatcgcag tctgcaactc gactgcgtga agtcggaatac
1261 gctagtaatac gcgaatcaga atgtcgggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc
1321 ccgtcacacc atgggagtggt gttgcaccag aagtagctag tctaac
```

Anhang

Pseudomonas plecoglossicida BOE7 (1393 bp) (GenBank accession number: MH580213)

```
1 tgcagtcgag cggatgacgg gagcttgctc cttgattcag cggcggacgg gtgagtaatg
61 cctaggaatc tgcctggtag tgggggacaa cgtttcgaaa ggaacgctaa taccgcatac
121 gtcctacggg agaaagcagg ggaccttcgg gccttgcgct atcagatgag cctaggtcgg
181 attagctagt tgggtgggta atggctcacc aaggcgacga tccgtaactg gtctgagagg
241 atgatcagtc aactgggaac tgagacacgg tccagactcc tacgggaggc agcagtgagg
301 aatattggac aatgggcgaa agcctgatcc agccatgccg cgtgtgtgaa gaaggtcttc
361 ggattgtaaa gcactttaag ttgggaggaa gggcagtaag ctaatacctt gctgttttga
421 cgttaccgac agaataagca ccggctaact ctgtgccagc agccgcggta atacagaggg
481 tgcaagcgtt aatcggaatt actgggcgta aagcgcgcgt aggtggtttg ttaagttgga
541 tgtgaaagcc ccgggctcaa cctgggaact gcatcaaaaa ctggcaagct agagtacggg
601 agagggtggg ggaatttcct gtgtagcggg gaaatgcgta gatataggaa ggaacaccag
661 tggcgaaggg gaccacctgg actgatactg aactgaggt gcgaaagcgt ggggagcaaa
721 caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatgt caactagccg ttggaatcct
781 tgagatttta gtggcgagc taacgcatta agttgaccgc ctggggagta cggccgcaag
841 gttaaaactc aaatgaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc
901 gaagcaacgc gaagaacctt accaggcctt gacatgcaga gaactttcca gagatggatt
961 ggtgccttcg ggaactctga cacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg tgtcgtgaga
1021 tgttggggtt agtcccgtaa cgagcgcaac ccttgcctt agttaccagc acgttatggg
1081 gggcactcta aggagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga cgtcaagtca
1141 tcatggccct tacggcctgg gctacacacg tgctacaatg gtcggtacag agggttgcca
1201 agccgcgagg tggagctaact ctacacaaac cgatcgtagt ccggatcgca gtctgcaact
1261 cgactgcgty aagtcggaat cgctagtaat cgcgatcag aatgtcgcgg tgaatacgtt
1321 cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtg gttgcacca gaagtagcta
1381 gtctaacctt cgg
```

Pseudomonas sp. BOE10 (1403 bp) (GenBank accession number: MH580214)

```
1 atgcagtcga gcggatgaga agagcttgct cttcgattca gcggcggacg ggtgagtaat
61 acctaggaat ctgcctggta gtgggggaca acgtttcgaa aggaacgcta ataccgcata
121 cgtcctacgg gagaaagcag gggaccttcg gcccttgcgc tatcagatga gcctaggtcg
181 gattagctag ttggtgaggt aatggctcac caaggctacg atccgtaact ggtctgagag
241 gatgatcagt cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtgagg
301 gaatattgga caatgggcca aagcctgatc cagccatgcc gcgtgtgtga agaaggtctt
361 cggattgtaa agcactttaa gttgggagga agggcagtaa gcgaatacct tgctgttttg
421 acgttaccga cagaataagc accggctaac tctgtgccag cagccgcggg aatacagagg
481 gtgcaagcgt taatcggaat tactgggcgt aaagcgcgcg taggtgggtc gttaagttgg
541 atgtgaaatc cccgggctca acctgggaac tgcatcmeta actggcgagc tagagtaggg
601 cagaggggtg tggaaatttc tgtgtagcgg tgaatgcggt agatatagga aggaacacca
661 gtggcgaagg cgaccacctg ggctcactact gacactgagg tgcgaaagcg tggggagcaa
721 acaggattag ataccctggg agtccacgcc gtaaacgatg tcaactagcc gttggaatcc
781 ttgagatttt agtggcgag ctaacgcatt aagttgaccg cctggggagt acggccgcaa
841 ggttaaaaact caaatgaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt
901 cgaagcaacg cgaagaacct taccaggcct tgacatcaa tgaactttcc agagatggat
961 tgggtgcctt cggarcattg agacaggtgc tgcatggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag
1021 atgttggggt aagtcccgtc acgagcmeta ccttgcctt tagttaccag cacgttatgg
1081 tgggcactct aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc
1141 atcatggccc ttacggcctg ggctacacac gtgctacaat ggtcggtaga gagggtcgcc
1201 aagccgcgag gtggagctaa tctcmeta cggatcgtag tccggatcgc agtctgcaac
1261 tcgactgcgt gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcaatca gaatgtcgcg gtgaatacgt
1321 tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagtg gggttgcacc agaagtagct
1381 agtctaacct tcgggaggac gg
```

Anhang

Pseudomonas putida BOE100 (1419 bp) (GenBank accession number: MH580215)

```
1 atggctcaga ttgaacgctg gcggcaggcc taacacatgc aagtcgagcg gatgagaaga
61 gcttgctctt cgattcagcg gcggacgggt gagtaatgcc taggaatctg cctggtagtg
121 ggggacaacg tttcgaaagg aacgctaata ccgcatacgt cctacgggag aaagcagggg
181 accttcgggc cttgcgctat cagatgagcc taggtcggat tagctagttg gtgaggtaat
241 ggctcaccaa ggcgacgatc cgtaactggt ctgagaggat gatcagtcac actggaactg
301 agacacggtc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgaaag
361 cctgatccag ccatgccgcg tgtgtgaaga aggtcttcgg attgtaaagc actttaagtt
421 gggaggaagg gcattaacct aatacgttag tgttttgacg ttaccgacag aataagcacc
481 ggctaactct gtgccagcag ccgcggtaat acagaggggtg caagcgtaa tcggaattac
541 tgggcgtaaa gcgcgcgtag gtggtttgtt aagttggatg tgaaagcccc gggctcaacc
601 tgggaactgc atccaaaact ggcaagctag agtacggtag aggggtgggtg aatttcctgt
661 gtagcggtga aatgcgtaga tataggaagg aacaccagtg gcgaaggcga ccacctggac
721 tgatactgac actgaggtgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata ccctggtagt
781 ccacgccgta aacgatgtca actagccgtt ggaatccttg agattttagt ggcgagcta
841 acgcatthaag ttgaccgcct ggggagtagc gccgcaaggt taaaactcaa atgaattgac
901 gggggccccg acaagcggtg gagcatgtgg ttttaattcga agcaacgcga agaaccttac
961 caggccttga catgcagaga actttccaga gatggattgg tgccttcggg aactctgaca
1021 caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgtaacg
1081 agcgcaacc ttgtccttag ttaccagcac gtaatgggtg gcactctaag gagactgccg
1141 gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaagtcac atggccctta cggcctgggc
1201 tacacacgtg ctacaatggg cggtacagag ggttgccaag ccgcgaggtg gagctaactt
1261 cacaaaaccg atcgtagtcc ggatcgcagt ctgcaactcg actgcgtgaa gtcggaatcg
1321 ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcgggt aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc
1381 cgtcacacca tgggagtggg ttgcaccaga agtagctag
```

Pseudomonas Vancouverensis BOE200 (1389 bp) (GenBank accession number: MH580216)

```
1 catgcagtcg agcggatgaa gagagcttgc tctctgattc agcggcggac ggggtgagtaa
61 tgcctaggaa tctgcctggg agtgggggac aacgtttcga aaggaacgct aataccgcat
121 acgtcctacg ggagaaagca ggggaccttc gggccttgcg ctatcagatg agcctaggtc
181 ggattagcta gttggtgagg taatggctca ccaaggcgac gatccgtaac tgggtctgaga
241 ggatgatcag tcacactgga actgagacac ggtccagact cctacgggag gcagcagtg
301 ggaatattgg acaatgggcg aaagcctgat ccagccatgc cgcgtgtgtg aagaaggtct
361 tcggattgta aagcacttta agttgggagg aagggttgta gattaatact ctgcaatttt
421 gacgttaccg acagaataag caccggctaa ctctgtgcca gcagccgcbg taatacagag
481 ggtgcaagcg ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgcgc gtaggtgggt tgttaagttg
541 gatgtgaaag ccccgggctc aacctgggaa ctgcattcaa aactgacaag ctagagtatg
601 gtagaggggt gtggaatttc ctgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatagg aaggaacacc
661 agtggcgaa ggcgaccact ggactgatac tgacactgag gtgcgaaagc gtggggagca
721 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gtcaactagc cgttgggagc
781 cttgagctct tagtggcgca gctaacgcat taagttgacc gcctggggag tacggccgca
841 aggttaaaac tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat
901 tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggcc ttgacatcca atgaactttc cagagatgga
961 ttggtgcctt cgggaacatt gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgctgta
1021 gatgttgggt taagtcccgt aacgagcgca acccttgtcc ttagttagca gcacgtcatg
1081 gtgggcactc taagtagact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaagt
1141 catcatggcc cttacggcct gggctacaca cgtgctacaa tggtcggtac agagggttgc
1201 caagccgcga ggtggagcta atcccataaa accgatcgta gtccggatcg cagtctgcaa
1261 ctgcactgcg tgaagtcgga atcgcctagta atcgcgaatc agaatgtcgc ggtgaatacg
1321 ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accatggggag tgggttgcac cagaagtagc
1381 tagtctaac
```

Anhang

Cupriavidus oxalaticus BOE300 (1396 bp) (GenBank accession number: MH580217)

```

1 agtcgaacgg cagcacgggc ttcgggctgg tggcgagtgg cgaacgggtg agtaatacat
61 cggaacgtgc cctgtcgtgg gggataacta gtcgaaagat tagctaatac cgcatacgac
121 ctgaggggtga aagcggggga ccgnaacgg cctcgcgcga caggagcggc cgatgtctga
181 ttagctagtt ggtggggtaa gagcctacca aggcgacgat cagtagctgg tctgagagga
241 cgatcagcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga
301 attttgaca atgggggcaa ccctgatcca gcaatgccgc gtgtgtgaag aaggccttcg
361 ggttgtaaag cacttttgtc cggaaagaaa acgcgctggg taatacctgg cgtggatgac
421 ggtaccggaa gaataagcac cggtaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggg
481 gcgagcgta atcggaatta ctgggcgtaa agcgtgcgca ggcggtttga taagacaggc
541 gtgaaatccc cgagctcaac ttgggaatgg cgcttctgac tgtcaggcta gagtatgtca
601 gaggggggta gaattccacg tgtagcagtg aaatgcgtag agatgtggag gaataccgat
661 ggcaaggca gccccctggg acgtgactga cgctcatgca cgaagcgtg gggagcaaac
721 aggttagat accctggtag tccacgcctt aaacgatgct aactagtgtg tggggattca
781 tttcttcagt aacgtagcta acgcgtgaag ttgaccgcct ggggagtacg gtcgcaagat
841 taaaactcaa aggaattgac ggggaccgcg acaagcgggt gatgatgtgg attaattcga
901 tgcaacgcga aaaaccttac ctacccttga catgccacta acgaagcaga gatgcatcag
961 gtgcccgaag gggaaagtgg acacaggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag
1021 atgttgggtt aagtcccgcg acgagcgcga cccttctctc tagttgctac gcaagagcac
1081 tctagagaga ctgccggtga caaacgggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcctcatgg
1141 cccttatggg tagggcttca cacgtcatac aatgggtgctg acagaggggtt gccaacccgc
1201 gagggggagc taatcccaga aaacgcacgc tagtccggat cgtagtctgc aactcgacta
1261 cgtgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg
1321 tcttgtagac accgcccgtc acaccatggg agtgggtttt gccagaagta gttagcctaa
1381 ccgcaaggag ggcgat

```

7.2 OD-Werte

Tabelle 7-1 OD₅₄₆-Werte Salztoleranz

Zeit in d	BOE3 0 % NaCl				BOE100 0 % NaCl				BOE200 0 % NaCl			
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Ø
0	0,066	0,074	0,070		0,102	0,11	0,106	0,106	0,09	0,09	0,091	0,090
0,3	0,084	0,092	0,088		1,6	1,62	1,42	1,547	0,43	0,36	0,368	0,386
1,1	0,9	0,98	0,940		1,42	1,43	1,42	1,423	1,23	1,23	1,17	1,210
1,3	1,22	1,31	1,265		1,38	1,38	1,4	1,387	1,27	1,26	1,22	1,250
2,0	1,2	1,32	1,260		1,42	1,45	1,46	1,443	1,29	1,29	1,24	1,273
2,3	1,24	1,28	1,260		1,4	1,38	1,42	1,400	1,26	1,24	1,2	1,233
3,0	1,15	1,25	1,200		1,47	1,42	1,46	1,450	1,26	1,25	1,19	1,233
4,0	1,11	1,24	1,175		1,43	1,41	1,42	1,420	1,26	1,25	1,19	1,233
Zeit in d	BOE3 3,5 % NaCl				BOE100 3,5 % NaCl				BOE200 3,5 % NaCl			
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Ø
0	0,079	0,084	0,078	0,080	0,129	0,123	0,123	0,125	0,11	0,106	0,108	0,108
0,3	0,082	0,081	0,074	0,079	0,133	0,132	0,125	0,130	0,093	0,102	0,091	0,095
1,1	0,067	0,07	0,066	0,068	0,183	0,191	0,192	0,189	0,09	0,076	0,075	0,080
1,3	0,077	0,077	0,068	0,074	0,239	0,248	0,251	0,246	0,085	0,07	0,072	0,076
2,0	0,078	0,088	0,074	0,080	0,58	0,59	0,6	0,590	0,08	0,07	0,07	0,073
2,3	0,079	0,092	0,084	0,085	1,36	1,27	1,25	1,293	0,078	0,07	0,069	0,072
3,0	0,074	0,087	0,081	0,081	1,37	1,26	1,25	1,293	0,07	0,065	0,063	0,066
4,0	0,069	0,078	0,073	0,073	1,32	1,25	1,22	1,263	0,065	0,06	0,063	0,063

Kolben mit MM und 5 mM BET wurden mit 0 % bzw. 3,5 % NaCl versetzt, mit den Stämmen BOE3, BOE100 oder BOE200 inokuliert und die OD₅₄₆ regelmäßig bestimmt (s. Kapitel 4.4). Die Durchführung erfolgte in dreifacher Ausführung („Nr. 1“, „Nr.2“, „Nr. 3“). Bei BOE3 mit 0 % NaCl ist eine Kultur (Nr. 3) nicht gewachsen, deswegen wurde sie nicht berücksichtigt.

Anhang

Tabelle 7-2 OD₅₄₆-Werte Wachstumskurven BOE3

Zeit in h	2 mM				4 mM			
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø
0,00	0,09	0,09	0,1	0,093	0,1	0,09	0,09	0,09
0,72	0,09	0,09	0,1	0,095	0,1	0,09	0,09	0,093
1,58	0,10	0,1	0,11	0,104	0,11	0,10	0,10	0,10
2,45	0,13	0,13	0,13	0,131	0,14	0,13	0,13	0,131
3,13	0,15	0,15	0,16	0,151	0,15	0,15	0,15	0,148
4,07	0,18	0,17	0,18	0,173	0,18	0,17	0,17	0,173
5,22	0,22	0,21	0,22	0,215	0,21	0,21	0,20	0,209
6,02	0,26	0,25	0,26	0,255	0,24	0,24	0,24	0,241
6,98	0,32	0,3	0,31	0,307	0,29	0,29	0,29	0,292
8,00	0,39	0,36	0,38	0,375	0,37	0,36	0,36	0,361
9,02	0,51	0,44	0,48	0,475	0,48	0,46	0,46	0,465
9,75	0,55	0,51	0,55	0,532	0,55	0,55	0,54	0,548
10,42	0,54	0,53	0,55	0,538	0,64	0,62	0,63	0,627
11,18	0,54	0,55	0,55	0,547	0,77	0,76	0,75	0,757
12,07					0,94	0,91	0,94	0,927
12,87					1,00	1,00	1,00	0,998
13,52					1,01	1,00	0,99	0,998

Zeit in h	6 mM				8 mM				10 mM			
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø
0,00	0,09	0,09	0,1	0,094	0,1	0,10	0,09	0,096	0,09	0,09	0,09	0,092
0,72	0,09	0,1	0,1	0,096	0,1	0,10	0,10	0,098	0,09	0,10	0,1	0,094
1,58	0,1	0,11	0,11	0,104	0,11	0,11	0,10	0,108	0,10	0,10	0,10	0,102
2,45	0,12	0,12	0,13	0,128	0,13	0,13	0,13	0,129	0,12	0,13	0,12	0,123
3,13	0,15	0,14	0,14	0,144	0,15	0,15	0,15	0,147	0,14	0,14	0,14	0,138
4,07	0,17	0,17	0,17	0,168	0,17	0,18	0,17	0,170	0,16	0,16	0,15	0,157
5,22	0,20	0,19	0,20	0,197	0,20	0,20	0,19	0,198	0,19	0,19	0,18	0,185
6,02	0,23	0,23	0,23	0,230	0,23	0,23	0,23	0,230	0,22	0,22	0,21	0,215
6,98	0,29	0,28	0,27	0,276	0,28	0,28	0,27	0,278	0,26	0,25	0,25	0,254
8,00	0,35	0,34	0,33	0,339	0,34	0,35	0,34	0,341	0,33	0,31	0,31	0,314
9,02	0,45	0,43	0,41	0,428	0,44	0,43	0,42	0,430	0,43	0,40	0,39	0,403
9,75	0,53	0,50	0,48	0,500	0,5	0,50	0,49	0,497	0,49	0,46	0,45	0,465
10,42	0,60	0,56	0,55	0,567	0,58	0,58	0,56	0,572	0,56	0,52	0,51	0,527
11,18	0,72	0,67	0,65	0,678	0,68	0,67	0,66	0,668	0,65	0,59	0,59	0,608
12,07	0,86	0,83	0,78	0,820	0,8	0,81	0,79	0,797	0,79	0,71	0,71	0,733
12,83	1,02	0,94	0,92	0,955	0,95	0,94	0,93	0,938	0,91	0,86	0,84	0,867
13,50	1,2	1,06	1,04	1,082	1,09	1,04	1,06	1,062	1,05	0,95	0,98	0,993
13,95	1,3	1,17	1,13	1,183	1,18	1,14	1,14	1,153	1,14	1,02	1,02	1,055

Die OD₅₄₆ von BOE3 beim Wachstum mit unterschiedlichen BET-Konzentrationen wurde in Dreifachbestimmung regelmäßig gemessen zur Ermittlung der Wachstumsparameter (s. Kapitel 4.6.1). Für die Berechnung von μ wurden die **fett** markierten Werte verwendet.

Anhang

Tabelle 7-3 OD₅₄₆-Werte Wachstumskurven BOE100

Zeit in h	5 mM				7,5 mM			
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	σ	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	σ
0,00	0,09	0,09	0,09	0,087	0,09	0,08	0,09	0,086
0,57	0,08	0,08	0,09	0,083	0,08	0,09	0,10	0,086
1,13	0,10	0,10	0,11	0,104	0,10	0,11	0,12	0,109
1,75	0,15	0,15	0,16	0,154	0,15	0,16	0,16	0,155
2,32	0,23	0,23	0,23	0,231	0,23	0,23	0,22	0,225
2,98	0,34	0,34	0,34	0,338	0,32	0,32	0,31	0,319
3,57	0,52	0,52	0,53	0,522	0,48	0,49	0,48	0,478
4,27	0,82	0,76	0,82	0,798	0,68	0,68	0,63	0,660
4,93	1,22	1,17	1,19	1,193	1,15	1,06	1,10	1,100
5,83	1,57	1,54	1,60	1,570	1,88	1,85	1,81	1,847
6,50	1,50	1,52	1,55	1,523	2,28	2,19	2,18	2,217
7,08					2,18	2,28	2,25	2,237
7,70					2,15	2,21	2,20	2,187

Zeit in h	10 mM				12,5 mM				15 mM			
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	σ	Nr. 1	Nr. 3	Nr. 3	σ	Nr. 1	Nr. 3	Nr. 3	σ
0,00	0,08	0,09	0,08	0,084	0,09	0,09	0,09	0,086	0,09	0,09	0,09	0,086
0,55	0,10	0,10	0,10	0,099	0,11	0,10	0,10	0,104	0,10	0,10	0,10	0,102
1,12	0,12	0,12	0,13	0,122	0,13	0,12	0,12	0,125	0,12	0,12	0,12	0,121
1,75	0,16	0,16	0,17	0,159	0,17	0,16	0,16	0,161	0,16	0,16	0,16	0,158
2,35	0,23	0,23	0,21	0,221	0,21	0,21	0,21	0,209	0,20	0,20	0,20	0,202
2,97	0,31	0,31	0,32	0,314	0,29	0,31	0,30	0,299	0,28	0,29	0,28	0,282
3,57	0,45	0,45	0,46	0,450	0,43	0,44	0,43	0,432	0,41	0,41	0,41	0,405
4,27	0,63	0,70	0,74	0,688	0,60	0,65	0,67	0,640	0,63	0,63	0,53	0,593
4,93	1,02	1,05	1,04	1,033	0,93	0,97	0,97	0,953	0,81	0,89	0,80	0,832
5,82	1,60	1,70	1,71	1,670	1,59	1,56	1,52	1,557	1,29	1,40	1,35	1,347
6,50	2,32	2,37	2,27	2,320	2,13	2,12	2,17	2,140	1,89	1,91	1,76	1,853
7,05	2,85	2,87	2,86	2,860	2,65	2,63	2,67	2,650	2,30	2,34	2,21	2,283
7,67	3,00	3,01	3,00	3,003	3,32	3,12	3,43	3,290	2,74	2,83	2,64	2,737
8,22	2,93	2,90	2,97	2,933	3,76	3,45	3,65	3,620	3,28	3,26	3,18	3,240
8,78					3,78	3,62	3,54	3,647	3,92	4,03	3,54	3,830
9,22									4,17	4,10	3,96	4,077

Die OD₅₄₆ von BOE100 beim Wachstums mit unterschiedlichen BET-Konzentrationen wurde in Dreifachbestimmung regelmäßig gemessen zur Ermittlung der Wachstumsparameter (s. Kapitel 4.6.2). Für die Berechnung von μ wurden die **fett** markierten Werte verwendet.

Tabelle 7-4 OD₅₄₆-Werte BOE100-Induktionstest

Zeit in h	Glc-Glc	Glc-BET	BET-Glc	BET-BET
0	0,087	0,086	0,091	0,092
0,47	0,102	0,087	0,092	0,105
1,25	0,143	0,09	0,106	0,138
1,95	0,194	0,093	0,128	0,183
2,97	0,278	0,102	0,191	0,254
3,58	0,353	0,109	0,230	0,338
4,37	0,467	0,120	0,285	0,479
5,30	0,628	0,139	0,359	0,618
6,65	0,642	0,184	0,620	0,628
7,23	0,636	0,197	0,646	0,6

Die OD₅₄₆ von BOE100 in 4 Ansätzen (jeweils 2 mM Substrat) wurde gemessen: Glc-Glc: Vorkultur (VK) Glucose, Substrat Glucose; Glc-BET: VK Glc, Substrat BET; BET-Glc: VK BET, Substrat Glc; BET-BET: VK BET, Substrat BET (s. Kapitel 4.6.3). Für die Berechnung von μ wurden die **fett** markierten Werte verwendet.

Anhang

Tabelle 7-5 OD₅₄₆-Werte Wachstumskurven BOE200

Zeit in h	2 mM				4 mM				6 mM			
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø
0,00	0,082	0,082	0,082	0,082	0,081	0,08	0,083	0,081	0,081	0,081	0,08	0,081
0,85	0,085	0,077	0,066	0,076	0,071	0,072	0,076	0,073	0,076	0,06	0,075	0,070
1,65	0,085	0,085	0,079	0,083	0,08	0,079	0,086	0,082	0,08	0,077	0,083	0,08
2,55	0,078	0,071	0,07	0,073	0,075	0,068	0,079	0,074	0,074	0,065	0,069	0,069
3,65	0,099	0,084	0,077	0,087	0,075	0,084	0,085	0,081	0,089	0,072	0,083	0,081
4,90	0,136	0,125	0,11	0,124	0,113	0,102	0,125	0,113	0,128	0,108	0,113	0,116
5,68	0,174	0,154	0,14	0,156	0,144	0,141	0,158	0,148	0,154	0,155	0,145	0,151
6,50	0,217	0,205	0,176	0,199	0,191	0,193	0,2	0,195	0,191	0,21	0,191	0,197
7,52	0,289	0,281	0,277	0,282	0,279	0,278	0,29	0,282	0,255	0,305	0,273	0,278
8,22	0,357	0,373	0,384	0,371	0,357	0,366	0,352	0,358	0,314	0,399	0,329	0,347
8,97	0,54	0,575	0,6	0,572	0,575	0,565	0,545	0,562	0,5	0,645	0,525	0,557
9,77	0,61	0,615	0,63	0,618	0,825	0,785	0,78	0,797	0,735	0,965	0,705	0,802
10,77					1,21	1,165	1,115	1,163	1,24	1,395	1,17	1,268
11,60					1,2	1,2	1,13	1,177	1,76	1,77	1,67	1,733
12,33									1,66	1,76	1,69	1,703
Zeit in h	8 mM				10 mM							
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø				
0,00	0,086	0,081	0,082	0,083	0,078	0,081	0,081	0,08				
0,85	0,09	0,088	0,082	0,087	0,079	0,091	0,092	0,087				
1,65	0,091	0,087	0,084	0,087	0,083	0,089	0,093	0,088				
2,55	0,091	0,09	0,086	0,089	0,083	0,091	0,093	0,089				
3,65	0,108	0,102	0,103	0,104	0,092	0,109	0,107	0,103				
4,90	0,155	0,149	0,145	0,150	0,14	0,146	0,143	0,143				
5,68	0,194	0,181	0,181	0,185	0,162	0,178	0,173	0,171				
6,50	0,256	0,245	0,231	0,244	0,215	0,231	0,228	0,225				
7,52	0,342	0,325	0,32	0,329	0,29	0,306	0,297	0,298				
8,22	0,48	0,455	0,435	0,457	0,354	0,363	0,359	0,359				
8,97	0,635	0,58	0,565	0,593	0,525	0,55	0,525	0,533				
9,77	0,92	0,815	0,805	0,847	0,705	0,74	0,73	0,725				
10,77	1,42	1,16	1,1	1,227	1,08	1,105	1,07	1,085				
11,60	1,89	1,78	1,73	1,8	1,59	1,63	1,66	1,63				
12,33	2,18	2,25	2,2	2,21	2,15	2,07	2,19	2,14				
12,92	2,23	2,28	2,28	2,26	2,57	2,61	2,7	2,63				
13,35					2,86	2,84	2,79	2,83				

Die OD₅₄₆ von BOE200 beim Wachstums auf BET bei unterschiedlichen BET-Konzentrationen wurde in Dreifachbestimmung regelmäßig gemessen zur Ermittlung der Wachstumsparameter (s. Kapitel 4.6.4). Für die Berechnung von μ wurden die fett markierten Werte verwendet.

Anhang

Tabelle 7-6 OD₅₄₆-Werte Wachstumskurven der BOE-Stämme

Zeit in h	BOE1	BOE2	BOE4	BOE5	BOE6	BOE7	BOE10	BOE300
0,00	0,102	0,069	0,114	0,075	0,102	0,042	0,099	0,087
0,62	0,119	0,08	0,117			0,048		
0,67				0,088	0,16			
0,70							0,099	0,101
1,22	0,13	0,087	0,13			0,055		
1,30							0,098	0,106
1,35				0,094	0,208			
1,88	0,133	0,099	0,158			0,064		
1,95							0,09	0,114
2,00				0,103	0,248			
2,47	0,144	0,12	0,193			0,076		
2,62							0,091	0,124
2,67				0,11	0,296			
3,07	0,154	0,15	0,243			0,092		
3,15								0,133
3,50				0,121	0,359			
3,62	0,173	0,179	0,303			0,109		
3,70							0,145	0,149
4,12	0,199	0,209	0,356			0,124		
4,20							0,164	0,154
4,30				0,132	0,431			
4,65	0,213	0,246	0,442			0,146		
4,73							0,187	0,164
5,15	0,232	0,297				0,171		
5,23							0,242	0,173
5,37				0,146	0,618			
5,63	0,257	0,351	0,702			0,195		
5,73							0,298	0,189
6,03	0,29	0,412				0,214		
6,15								0,202
6,40					0,81			
6,62	0,335	0,529						
6,78								0,221
7,23	0,382					0,33		
7,25				0,164	0,99			
7,40							0,57	
7,60		0,754	1,485			0,402	0,604	0,258
8,13		0,88	1,65			0,484		0,274
8,57			1,738			0,578	0,902	0,304
9,15	0,608	1,078	1,76			0,668		0,336
9,27				0,205	1,47			
9,70	0,682	1,166	1,947			0,759		0,36
10,17				0,229				
10,20	0,748	1,177	2,002			0,836	1,111	0,388
11				0,245	1,65			

Jeweils 100 mL MM in 250 mL Schikanekolben wurden mit der jeweiligen Vorkultur angeimpft, mit 10 mM BET versehen und bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die OD₅₄₆ wurde in regelmäßigen Abständen gemessen (s. Kapitel 4.6.5).

Anhang

Tabelle 7-7 OD₅₄₆-Werte BET-Sensitivitätstest

Zeit in d	BOE3 20 mM				BOE3 30 mM				BOE3 40 mM			
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø
0	0,059	0,063	0,061	0,061	0,062	0,06	0,055	0,059	0,065	0,063	0,065	0,064
0,29	0,094	0,098	0,093	0,095	0,079	0,077	0,068	0,075	0,08	0,079	0,084	0,081
1,00	0,363	0,318	0,338	0,340	0,174	0,139	0,125	0,146	0,122	0,123	0,133	0,126
1,26	0,58	0,55	0,52	0,550	0,238	0,192	0,162	0,197	0,141	0,141	0,15	0,144
1,98	1	1,04	0,88	0,973	0,44	0,33	0,269	0,346	0,231	0,183	0,193	0,202
3,00	1,68	2,01	1,46	1,717	1,05	0,65	0,54	0,747	0,437	0,401	0,381	0,406
4,01	2,26	3,2	2,16	2,540	1,58	0,78	0,86	1,073	0,76	0,79	0,51	0,687
8,03	2,75	2,87	2,75	2,790	3,76	1,18	1,28	2,073	1,95	1,51	0,73	1,397
9,00	2,76	2,87	2,79	2,807	3,76	1,28	1,4	2,147	2,32	1,78	0,82	1,640
10,05	2,74	2,82	2,74	2,767	3,61	1,33	1,45	2,130	2,66	2,03	0,78	1,823
11,23					3,39	1,35	1,54	2,093	2,95	2,3	0,76	2,003
13,17					3,3	1,46	1,78	2,180	3,84	2,94	0,77	2,517
15,27					3,2	1,67	2,13	2,333	3,9	3,97	0,81	2,893
17,18					3,1	1,84	2,46	2,467	3,52	4,05	0,87	2,813
Zeit in d	BOE100 30 mM				BOE100 40 mM				BOE100 50 mM			
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø
0	0,094	0,091	0,097	0,094	0,097	0,093	0,092	0,094	0,097	0,092	0,096	0,095
0,29	0,8	0,755	0,79	0,782	0,465	0,465	0,47	0,467	0,26	0,242	0,254	0,252
1,00	2,17	2,41	2,02	2,200	1,41	1,42	1,41	1,413	0,86	0,81	0,82	0,83
1,26	2,22	2,46	1,98	2,340	1,46	1,5	1,52	1,493	0,94	0,9		0,92
1,98	3,08	3,3	2,49	3,190	1,87	1,85	1,83	1,850	1,33	1,24		1,285
3,00	4,91	3,76	2,83	4,335	2,15	2,02	2,14	2,103	1,66	1,7		1,68
4,01	4,84	4,12	2,99	4,480	2,43	2,73	2,51	2,557	2,22	2,1		2,16
8,03	2,99	2,92	1,82	2,955	1,28	1,41	1,28	1,323	1,14	1,06		1,1
9,00	2,96	2,81	2,28	2,885	1,75	1,5	1,35	1,533	1,16	1,14		1,15
10,05	2,88	2,72	2,91	2,837	1,99	1,44	1,37	1,600	1,15	1,23		1,19
11,23					2,21	1,45	2,08	1,913	1,65	1,92		1,785
13,17					2,28	1,54	2,13	1,983	1,87	2,08		1,975
15,27					2,42	2,03	2,41	2,287	1,94	2,27		2,105
17,18					2,83	2,07	2,56	2,487	2,17	2,35		2,26
Zeit in d	BOE200 20 mM				BOE200 30 mM				BOE200 40 mM			
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	ø
0	0,087	0,083	0,082	0,084	0,078	0,085	0,078	0,080	0,075	0,081	0,082	0,079
0,29	0,445	0,415	0,435	0,432	0,29	0,305	0,284	0,293	0,194	0,2	0,204	0,199
1,00	1,81	2,7	2,01	2,173	1,24	2,1	1,87	1,737	1,27	1,43	1,12	1,273
1,26	1,82	3,23	2,14	2,397	1,64	2,61	2,46	2,237	1,6	1,93	1,24	1,590
1,98	2,16	3,26	2,6	2,673	1,88	3,36	3,1	2,780	1,87	2,28	1,57	1,907
3,00	2,75	2,89	3,25	2,963	1,97	3,65	3,55	3,057	1,99	2,36	1,5	1,950
4,01	2,84	2,62	2,9	2,787	2,04	3,17	3,23	2,813	2,1	2,45	1,57	2,040
8,03	2,09	2,14	2,2	2,143	2,29	2,46	2,27	2,340	2,27	2,32	1,3	1,963
9,00	2,09	2,11	2,09	2,097	2,87	2,41	2,29	2,523	2,23	2,18	1,35	1,920
10,05	2	2,08	2,02	2,033	3,09	2,3	2,25	2,547	2,41	2,71	1,35	2,157
11,23					3,26	2,36	2,16	2,593	2,31	2,89	1,35	2,183
13,17					3,04	2,26	2,08	2,460	2,35	2,96	1,37	2,227
15,27					2,53	2,16	2,04	2,243	2,27	2,59	1,35	2,070
17,18					2,18	2,1	1,97	2,083	2,1	2,08	1,35	1,843

Die OD₅₄₆ der Stämme BOE3, BOE100 und BOE200 beim Wachstum mit unterschiedlichen BET-Konzentrationen wurde regelmäßig gemessen zur Ermittlung der BET-Grenzkonzentration, bei der noch rekonstruierbar Wachstum und BET-Abbau erfolgt (s. Kapitel 4.7). Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 7-8 OD₅₄₆-Werte Wachstum BOE100, P13 F44 und P22 F29 mit Alkoholen

Zeit in d	<i>n</i> -Pentanol			<i>n</i> -Hexanol			<i>n</i> -Octanol		
	BOE100	P13 F44	P22 F29	BOE100	P13 F44	P22 F29	BOE100	P13 F44	P22 F29
0	0,027	0,014	0,014	0,019	0,017	0,019	0,012	0,012	0,013
5	2,98	1,88	1,732	1,73	0,045	0,031	1,6	0,03	0,022
7	1,43	1,636	1,47	1,48	0,042	0,031	1,47	0,049	0,039

BOE100 sowie dessen Mutanten P13 F44 (Δ pedF::Tn5) und P22 F29 (Δ pedR2::Tn5) wurden in MM mit *n*-Pentanol, *n*-Hexanol und *n*-Octanol 7 Tage lang bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert und die OD₅₄₆ bestimmt (s. Kapitel 4.14).

Tabelle 7-9 OD₅₄₆-Werte Überexpressionsversuch

Zeit in Stunden	0,05 % BES, 0,05 % DCPK			0,05 % BET, 0,05 % DCPK		
	pCom10. egeA	pCom10. egeABC	WT	pCom10. egeA	pCom10. egeABC	WT
0,0	0,1	0,1	0,106	0,1	0,1	0,108
2,3	0,149	0,105	0,115	0,146	0,16	0,179
5,1	0,164	0,11	0,117	0,192	0,225	0,251
22,0	0,162	0,155	0,114	0,184	0,548	0,225
24,1	0,167	0,212	0,118	0,187	0,57	0,228
25,1	0,166	0,224	0,116	0,186	0,57	0,225
26,9	0,164	0,254	0,117	0,184	0,57	0,223
29,3	0,165	0,33	0,115	0,182	0,57	0,222
45,8	0,147	0,42	0,107	0,174	0,5	0,201
47,3	0,151	0,415	0,103	0,173	0,485	0,201
69,0	0,1	0,515		0,127	0,495	0,183
70,5	0,1	0,53	0,107	0,114	0,47	0,177
72,4		0,515			0,51	

Je 50 mL MM (ggf. + Km) wurden mit der jeweiligen *Pseudomonas putida* KT2440-Vorkultur angeimpft (pCom10.egeA, pCom10.egeABC, WT), mit Substrat (0,05 % BES bzw. 0,05 % BET) und 0,05 % Induktor (DCPK) versetzt und bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die OD₅₄₆ wurde in regelmäßigen Abständen gemessen (s. Kapitel 4.19.2)

7.3 Nukleotidsequenz BOE3

```

1 gaattcgact acgccgcaca gagctggccg caccgagcggc gcgtgatcac gcggcttgaa
61 tggggcgcgc aaggctgcaa cccgcgcttc atcgtgacaa accttgccgg tgatccccag
121 gcgctgtacg acggcgtgta ctgccagcgc ggcgaggcgg agaaccggat caaggaagcg
181 caggtagggc tgttcgccac gcgcacgagc tgccatgtgc tgcgctccaa ccaactgcgc
241 atgctgttgg ccgcgctggg ctacgtgctg gtagagaggc tgcgcgcggt ggctttgcag
301 ggcacagagc tggccacggc gcagatcgac acgctgcgca tcaagctgct caaggtggcg
361 gcagtgggta cgcgcaacac gcggcgcac cgcctgtacc tggcctccaa ctggcccagt
421 gcgcagacct tcgcgcacgc catgagccag ctgcgctcac cctgaacaca ccagcagcgc
481 ctggccggcg cgatgacaca aaaacggccc gcaaccaag ccggggtagg ggccattgcg
541 acagcattgc gcatgccaac catcacacc atggctgcgg ccaacatcgt ggccttgctc
601 gctcaaatcc gcgcgcgat gccccgctgc gcacgccgtt ggctacatgc gtgaaatc
661 cgggctagct ttgcgtaccg tcaactattg cactgaaaac gaggagacc ctacctggaa
721 gccgataccg agtttgcccg ttacgcggtg gccagcaccg cagagcgcac cgagctgctc
781 aaggactggg tcgcaccgga cttgctcatc ctgatgacc tgttcttggc caggcgcac
841 agcgagcacg ccgccgaagt cctgcaggcc atcgtgcacc agcgtacaa gctgcgccga
901 gccatcgta tcaacttcaa ccgcgtggtg caggactggg gcaaatacct gggcgacgcc
961 accatggcca gcaccattct ggatgcctc atgcaccgct gcgcgatgct ggagttcgag
1021 ggcaagagct accgcctcaa agaggccgc gctcgcacgc ccatcacc ccagtcgtca

```

Anhang

1081 taatctgacc ggtcctgcct gggggaatth ggggtggcca aggggtgggg aatttgacct
1141 ggccatcggg gctcaaacag cggcaggtcc cgtacacgcc gcgtcgtcgt ctcttggact
1201 tgatggcacg gcgctccata ctgttcgcag tgcatttccc ggcccatggc cttgaggtgc
1261 accgccagcg ttcggcgggg ctctgcggc cactccactc gctctaccga atagccttcc
1321 caaccttcca acagcttgcc atcggccatc tgctttgctc tccaacgcac acttcaaagc
1381 catcagagta caaaaccaca acgcatctag ccacgggtatt ccgtgatgaa ccccaggtgc
1441 atgcgtcgtg ctgatcgccc ggtatgcgtg ttcttgatcg cataacgccc gcttcatgat
1501 cagtgaggcc gtcgcgccag gcgcacaaag ctgtcgttga ccagcggtac gccttttctt
1561 gcttcgthtt cttgctgttc cggcaaccct ttgtatgcgg tgagcatgac ctggtcttag
1621 caaccaaatt acgggttttc cctatgtatg catcatatat atatgtcgca tactacacat
1681 acatthttatg taaatgcatg caatcatgta gacattcagg agatgaccat ggaacttgth
1741 cacagcccaa tggggctacg ccagcgtaaa taccgggaaa tctaccgctc gcgctgagc
1801 ggcttctaca acggctatta ccacgccttc ctgattttcg ggggtgggtct gtacgagatc
1861 tattttgcga cgcgtcacat cagcaatgtg ttgtgggtggg aatggcttht tgtgccagcg
1921 gtgtthttat ttgcccagtg ggtgaggtac ctgtthcatc gcttcttagc acatcggctt
1981 tcgaaatccc cgttctggcg cctggcctat gtgcgtcaca ccctgatgca tcaccagttc
2041 thtacggcgg aggagccacg attcggcagc cataaggact ggctgtcac gatatttccg
2101 ccgttcaccc tcgtgtthtt cacgctgacc acaataccat ttgcctthct ggctgggata
2161 atcattthctg tgaatgttgg ctggctcatc cttgcaaccg ccattggaag ctatgtgttc
2221 tatgagctac tgcatthctt gtgccatgtg gacgataatt ggtthctgcg ccactgcccc
2281 atcgtgaaca ccgctaggcg gcatcacacc gcacaccacg attcttccgt gatgatggaa
2341 tacaacatga gcattgtatt tccgtthtgg gactgggtct acggcacttc cgacctggat
2401 cgtggcctgt tcggacattt gthtaatggt tacagcacca agtatgtgaa gaaggacctt
2461 cgcaaaaccc gcaagacgcc ggtcgaaaca ccgatcgaca ccaagcctga thtccggtga
2521 ggctcaatg thtaacaaac tctgagaatt ctaggagatg agcgtgcct gtgggtaaga
2581 aagttatgth ctccgtgctg cthttatgct caggagtact gggctattgg atcgaagtag
2641 cgatgggtat ggagcgcaac attccctatc tcattgtatt ggttgtattt ctgatgctcg
2701 gcctthggtc catgtcggcg gtgcagaaaa aagacgaggg taacaaatga tcaaatcgc
2761 acaggagcag ccactctgcg gtatctacag cggagagcgc accatcgacg gtctgggtgg
2821 catgtacaaa ggggtcctc tgacgaagct gctcgcctc gacgagcgt cgaacgatga
2881 cttcgaatgg ggtatgaa ggtactcgc ggcaagactg gcccatgctc gctctgtgca
2941 tcgtactggc gaccccgcg ttgctgatgc cthttccatt cgtctgatgg tgcagthtgt
3001 cgcaaaatta gacaacgaat gggaggtcgc ggaagaccaa ttggatcgtc tgattgaaga
3061 gatccagcaa tccacaccgg cattgtcctg acgttcgtgg aagcgaggaa acgatatgtt
3121 gtcaccgaat gccgttggct cgategatgc catcgagtac ctgtctggcg cgagcatcga
3181 agthcggctc gagggthcag gtccaccact gatcctgctg catggthtgc agagcgtatc
3241 gactatctgg gatggtgtth gcgagcatct tcgcagtgtg gagcgcattc ggctgaatth
3301 tcttggcaga ggaaaatctg ccagagggag cgacacatgg cattcgttgg agtatttcta
3361 thcaatagga aggtthgctg agctgcttca thcgttgggt caaaagctgg atcgtcgtgt
3421 atccattgct ggttggagca tgggggcaat ggtcgcactg gagtatgtca aacgttacgg
3481 caccgatgac atccgatcgc tgggtcgtgt ctccggattg tcgaaagtgg cgggggtggc
3541 aaacatattt cagtccatga atgatgaagg gctcctgatg gaaatatccg aacgctccga
3601 gaaggcggga ttgaaggggt cgacggatcc cttggctgtg ctcaattgct ggaaatccat
3661 gctgcattth gattgcaggg aggtacttht taaaattgat atcccacat tgatcgtgca
3721 tggatcagag gatctggatt gccgtthttc ggatgccatg ctggtthccc agcgaatthc
3781 gtgttcggaa cthgttgcgc tggatggatg cggccatctg atcctgtctg aaaggcccgg
3841 ggcagtgggt ttagctatth cagaaggtat gaaaaggtht ggctgaatgg ccagggatth
3901 gtcgggttgg thtcatcagg gtaatgtgtc attggtcggg tthttattgc thttthtgaa
3961 atgaaggaga cagctgtgcg cctgaaggc aaagtggctt tggtaacggg tggtcaggt
4021 ggcattggtg ctgccatctg caagtgttc acgcaagaag gggctaccgt atacatctgc
4081 gatctgcatg tgcaggatgg cgagacgtt gctcagaagt acatcgtgga agacaagaag
4141 gtgtatthcc tacctctgga cgtggcggat gcacatgcat ggcagtgggt actggctcgc
4201 gtcgaggcgt cggagggccc cctggacgtg ctggtcaaca acgcccgat cagcggatcg
4261 gtgcccgacc ggatggacct ggactatthc gacaagcaat gggagatcaa cgcacgggg
4321 actthcttgg ggatgaagct ggcccgcgat ctgctggcca agagtggcg ggggtcgate
4381 gtcaacatgt catccgtgct ggggttgate gcccatgaaa tcacgcacat gggctacaac
4441 gcctccaagg gcgctgtgcg cctcatgtcc aaggcagcgg cgggtcagtt cgccgatcag
4501 ggcattccgc tcaactccgt tcaccctggg tggatgtccg ccatgcgcac atcggtcagc
4561 agcgcggatc ccgaacagcg caagaagctc aacgccgaag tgcctctcaa gcgctccggc
4621 acggcagagg aagccgccc ggtgtgtctg thtctcctt cgcagattc atcgtatgtg
4681 acaggttccg aacttgtcgt tgatggcggc ttgtccgccc gatagcccgc agcaagtgc
4741 cgaaggcatc gacgggcttg catcgggtgc aacctaaaa gccgggaaaa agatgcccc

Anhang

4801 cgctggcgtg tggcgggtggg cgaacttgcc tgaactctac agaaggagac aagacatgac
4861 tgcagcgaga cagctattga aagcggggcgc tttggggcgt accgcatcgt tcaactacggg
4921 cgcttacgcc cagacgcagc cgtcgggttcg atggcggatg gccgcgctct atccccgaag
4981 tctcgatacc tgctacggtt ccaccgaaca gatgtgcaag cgcgtggccg aactcaccaa
5041 cggcaagttc actatcacc ttcaccctcc gggtgacctg gtgccaccgc tgcaagtact
5101 ggacgcggtg agtgccggca cggttgaggc cgggcagggt agcggcacgt tctactttgg
5161 caagaaccgg gcgttgatgt tcgagtcggg tctgcccgttc ggcatgaacg cacggcaaca
5221 gaatgcttgg ctgtatgagg ccggtgggct caaagagggt cagaagggtg tcgccggatt
5281 caattgccac tcggtgccc tgggcaactt tggcaccag atgggggggt ggttccgcaa
5341 agaaatcaac agccttaagg atctctccgg gttgaagatg cggattggcg gattcggcgg
5401 acaggtgatc agccgtctag gcgtcgtgcc tcagatgatc ccgggaggag acctctatgc
5461 tgcgctcgag aaaggcgtaa tcgacgcggc cgagttcgtc ggtccctatg acgatgaaaa
5521 gcttggactt gccaaaggta cgcagtatta ctactcggcc ggttgggtggg aggggtggcag
5581 cgcgcaagtc tcggcaatcg cgaatcagaa agcttggggc gcattgccga aggactatca
5641 ggccgcgctt gaggtggcgg cgttcgaatc caacatgcgc atgctggcga tctacgactc
5701 caagaatccg gacgccattc agcggattct gtcgtcgggc gtcaagttgc ggtggtttcc
5761 caaggaaatt ctggacgtcg cttacgacac gacgatcagc atgctggagg aaatttcac
5821 caaggacgcy gacttcaagg cgatttacca gcactaccgg aatttcatga acaagcagtc
5881 ttcctggtac cgggtggcag accatttctc cgacagctat tcgctgtcga ggcgtggacg
5941 ctgaggcaga aagaagcctc tgattcaggg gcacaggcc agcgggcatc tgatgggtg
6001 cctactggca tcacttgaag gcacgttatg ttgaagatta ctcatggcat cgaccggctg
6061 agcgaatggg ttggtatcac ggtaagggtg tttttgtgg tcgcggtggg gatcagtgtc
6121 ggaaatgcca tcagtcgtcg cgtgttcgac atcagctcga atgccttctt ggaactgcag
6181 tggtaacctg tcgctgccc agtgctgctg ggcgctgcct atgtgctgct caaggacggc
6241 cacgtgcgcy ttgatttctg tccacgaag ctgagcgcac gaaccaacgc aactgtggat
6301 gcggtggccc tgtcgtgttt tgctatccc tttgcctaa tgctgatctg gtattcctgg
6361 ccgatgttct agatcgccct gcgaactggg gagatgagct cgaacgcggg ggggctgacc
6421 cgctggcctg tgcttctgtg cttaccggta gggtttgcac tgctgctgct gcagggtgtg
6481 gcggaaattg ccaaaagaat gctcgtggtc ctccgcaaag aagggggggg gggcgtgggtg
6541 ggccgggtcg aggatcgag cggctccaag ggggggtgct atgcttgaag ggttctgtgt
6601 ggcgaaattt gtcccactca tgtttgtcgg gcttctggtg tcttgttga cggcatttcc
6661 cgttgccctt gccttgattg gaacagact gacgttcggg gtactcggca tggaaactggg
6721 gcttttccagc ccgagcctct tcagtgccct ttcgtaccgg atttatggaa tcgtacaaaa
6781 tgaaaccttg ctggcggctc ctttttttac cttgatgggg ctactgctgg aacgttcgcy
6841 aatggcggaa gacctgctcy aggtggctcg ccacgtattc ggcccgatcc gcggtggctt
6901 tgcggtggct gtcgtgctcy tcggcgccat gctggctgca accaccggag tgattgcagc
6961 ggcggtgatt tcgatggggc tgatatccct gccatcatg ctacgttacg ggtacaaccg
7021 gccatcgca gcgggcgtga tcgcccgtc cggcacgctg gcgcagatcy taccgccctc
7081 gctggtgctg atcgttctcy ctgatcaact gggccgatcy gtgggggaca tgtatgctgg
7141 tgccatgctg ccacggtaa tcctgatcgg gttgttctt gtattcatcy cattcgtcgc
7201 tgtgattcgg cctcactggg tgccggcaat gcccggtcc gctcgcaccc accgcgagcc
7261 ctcgggctcc agcggccatg cttcgtgctc cgttctgctg atcttggcgc ttttggctcg
7321 attgggctgg gcacatttcc atgaccgat cgtcagcgc ctgatcggg gggaggggat
7381 tgcggcaacc gatgaggttgc tcacatcag cttgatggta gccacggat tcgcttacct
7441 gctggcctgc gtcgacctgt ggctcagact gaactggctt tctcgtctgg caaagcaggt
7501 gacgttctg atgataccgc cgatcgttct catcttctc gtgctcggaa cgatttctc
7561 aggcattgcc acgcccacc agggcggggc aatgggagcy gtgggtgcat tcgtgatggg
7621 agttgccaga aggcggctca acctcccgtc gttgacgag gctgtggatt cgatgccag
7681 gctaaccgct tctgtgctgt tcattctgat tgggtctacg gtgttttct tccgcttcaa
7741 tgcggcggat gggcatgagt gggtagaagc ctttttcaa cagttgccgg gtggacagac
7801 gggctttttg attgctgttt gcgattggt atttgtgtt ggcatgttta tcgatgtgtt
7861 tgaaatcgca ttcatgtgta ttccggttct cactccgggt gcggtcagta tggaaagtca
7921 cctgctctgg tttggcgtca tcattggcat gatcttgcag acgtcgttct tgacgccacc
7981 gttcggctcy gcgcttctc atctgcgag cgtggcacc aaaacagatg gtgtcgaccg
8041 aaagagcggg ctggatgtga aggggtgtgag taccgcgag atctatcgg ggtgtattcc
8101 attcattgcy ctgcagattt tggcgacagc gttcgtcatc tacgatccgt cgttcttct
8161 cgtccggtc aacagcggaa aggtgcgccc ggttgccgta gatgcggat ccctgatgcc
8221 cccttcgatg gatacactga tgccgcccat gctgacttg agcaactgat cgtcctggag
8281 cgaagcaggg tcggggtggc atttgccgtg cttgctgctc ggcatagaat ggcccggatg
8341 cttgatttcc agaacctgca taacaatgtc tgaagacatc atgggaaaa aaaccggtt
8401 ggcatttggg gcggggaagg ctgggtacct gccgcttcgg aagagtctcy ccgagcgtgc
8461 gtacgatatt ctggaagagg ccatcatcac gcttggcttg gcgccgggca gcattatttc

Anhang

8521 cgagcaggaa ctgagcagagt tgaccggcat cgggcgcacg cccacgcgcg agggcattca
8581 gcggctttcc agggatcgtt tgattcaggt gctgcccaag cggggtctga tggtttcgcc
8641 actggatctg gtgggcccagc tgaacctgct tgagctaagg agagaggtcg agggctttgt
8701 ttgtcgttcc gccgcccggc gcgcaacgct tgatcagcga gtgcggtttt cttccatagc
8761 tgtcgttttt cgctcatgta tcgtaagcaa cgaccagatc aattttgccc gcttgacaaa
8821 ggagttcggg gaactttgcc tagaggctgc gcagaacgaa tatgccgagg cgcgatgagc
8881 accgattctg ggtttggcgc ggcgctcctg gcaactcac caaaggcgcg gaggctcgat
8941 gtcagaaatg gcgttgctgc acgcccgtgc ggccgatcgc atagtcagcg gtgacgaaga
9001 tctgacggat gccgcattga ctaatttgct cgattacgct gagcgatatg cgaagtccac
9061 attgaatgct ccattgtcgc gcaagagtta aggcttgtgt gacacctgcc cagccgcaca
9121 agcggtagag caccctcact gctgtcgggc aggtgttgca taagcctcga gggaggaaac
9181 cgcggcgacc gccacggtag atgtcagcgc cgggtgctat ggcgattgct ctacgcgcgg
9241 gtcgcgagtg ggacgctgc gactgagcat cgacacctca tcgatgaccg caggcgcaca
9301 tccgtgtgcc gcttcgatac ggcaggagct cttggccgat cctgcgcaga cctgaccag
9361 gcgacgcacg cagaagccca ccgggcgcca tgtccagcgt cgagttgatc ggtgggttcc
9421 gagcgtggtc atggtgcccg cggcggcccga atcgagcagt cgcgcaagaa gacctgcagc
9481 accaccatcg cgtggccgca gtgcgcgag acgaaggctg gacgtggcga gtccaagcca
9541 tcggcggccg gcgtttgcgg cgatgacggc gccacctgca acaactggcg cgcagcgc
9601 aggttgtccc gccggttgct gttggccaac aggcctgtag gccggatccg gtggaagccg
9661 cccggcagca catgcagcag gaagcggcgc atgaactcct gcgggctcag cgtcatcgcc
9721 ttgtgacgcg tcttgccctt ggcgcccgtc ttggtcgtat agtccttcca ggggtctcct
9781 cgttttcagt gcaataagtg acggtacgaa aagctagcac tggcgcggag gtgggtgttg
9841 tagatcgttg atttcattga ctttcctggt cactttcaa tctgcgattc gtggcgtcaa
9901 accgtggtcg gtttcatcca ttggtgccag ttatcgatgc atttggccgc gaaggcagga
9961 tttggtcagc atagcggta accgggaagc gaaacacacc ccgcaagttg atgctctcca
10021 gcctgggtgg cgcaatcttc ccgatcagtt ccggtggaat gacctggcgg cggttcgacc
10081 agcgatccag gaccgcctgc atctgtgagg tattccacgc catcacgatg ttggccatca
10141 ggctcaacgc atcggccaca gcctgcattt catcgacacg tttggcctgc gccgggctga
10201 tccggccggt ataaatggcg cgcttgaggg cgtaacagc ctgcgccga ttgagcacc
10261 ggcgcaactc gttcctgaaa cgcctctga caaagtagtc agccaaaaac gccgtaccca
10321 gcaaccgccc aattgcaac ccagcctcat agattggatc gccctgggcg gcagaaccga
10381 accgcgaag agatgcccac gcaatggcat gtccgctcat gaccgaggct gccaggtgca
10441 ccagactatc ccaatgcttt tcgatcaaag cgacgtcgac attggcttcg cacaccgag
10501 cgattttctg gggcactttg gtgcccgtg gcacaaagag gtggcgtgtt ttgagttcct
10561 tcaaccgcg gcaaagatca aaaccaagca aacgggcatg tgacatggca aagtcggtgt
10621 agccatgggt atccacagca agctggctgg tctccagctt ttcttggcgg atgacacctt
10681 caatggccac gccgcctgg cgctcattga gcacaaagg ctgcgatgg aagatgcccc
10741 accggtcttt tacatgggag tagattccaa tggagggtgt gttgcgccga ggatcaagcc
10801 gggcttgcca caccgctttg gtggtctcca tgctcatcat gtcagaagat gccaaatcgg
10861 accgccccca ggtggcggca atcgggtgtc gctgatgaa ttccagcaca gcctggcagg
10921 cctggctcag acgcccctc tcccgcgcc agcgcagtc ccgcagtcag actggtgccc
10981 acaattgccc aatcatgccc gcgattcga ccgcagtcag actggtgccc tgggcatga
11041 tgcccgcata gaccatcagc agctcgtcgg tagagcgcgg ctacgtccg agcatgatcc
11101 agctaaaagc cacctgggcg tcaacggcca gaatacttc cggcaattga acctaccga
11161 tgccgtgatc caaagccgcg cgcagcttgg tcaacttctg gtcttcgtcc tctgcccga
11221 atggcgacaa atggagttca tcatccacgc gcagtacgc actgcgggct gcagcggcca
11281 ccgcatcgac accggcagtt actctggcca gcaaaggctt caagaaagtg gcagccttgc
11341 tgggtaacga tagacgggca tagtgtttct tggactctgc ctgccaacgc tcgtccgtga
11401 agaacaagcg cgcacgacc cgaagctca gctgtgctc aatccagacc gagccattgc
11461 gcaaccgccc gcgcagggca aacagggtgg ccacctcaa cgcctgaaac gcccttccc
11521 ggtctgggct ggagatcgaa acctgccaga tcattcccag acttggtgcc accacttcaa
11581 ctggcagctt tctggatcct ttgagatata aagcttgag cttggcaagg tactcgatgg
11641 caggatgctc gccgggtggc tgccagggca gctttgcaat ggcgacgagc aacgaccgca
11701 cggggcgaat tccatcaatc aatccctcgc ggaccagga ggcctgctc ggtggtttgc
11761 gtttctgggt ttcggtgatc aaggcttcaa gacgggcag caactcagca tctggcaccg
11821 caccttgccc gctcaaggca acaagttcgc cgagcagcgt tttgtaca

7.4 Nukleotidsequenzen der Gene *egeA*, *egeB* und *egeC*

Nukleotidsequenz *egeA*(B3) aus BOE3

```

1 atggaacttg ttcacagccc aatgggggcta cgccagcgtg aataccggga aatctaccgc
61 tcgcgctga gcggttctca caacggctat taccacgcct tcctgatttt cgggggtgggt
121 ctgtacgaga tctatTTTTGc gacgcgtcac atcagcaatg tgttgTggTg ggaatggctt
181 tttgtgccag cggTgTTTTt atttgcccag tgggtggagt acctgtttca tcgcttctta
241 gcacatcggc cttcgaaatc cccgttctgg cgcctggcct atgtgcgtca caccctgatg
301 catcaccagt tctttacggc ggaggagcca cgattcgcca gccataagga ctggcgtgTc
361 acgataatttc cgccgttcac cctcgtgttt ttcacgctga ccacaatacc atttgccttt
421 ctggctggga taatcatttc tgtgaatgTt ggctggctca tccttgcaac cgccattgga
481 agctatgtgt tctatgagct actgcatttc ctgtgccatg tggacgataa ttggTTTTctg
541 cgccactgcc ccatcgtgaa caccgctagg cggcatcaca ccgcacacca cgattcttcc
601 gtgatgatgg aatacaacat gagcattgta tttccgTTTTt gggactgggt ctacggcact
661 tccgacctgg atcgtggcct gttcggacat ttgtttaaTg gttacagcac caagtatgtg
721 aagaaggacc ttcgcaaaac ccgcaagacg ccggtcgaaa caccgatcga caccaagcct
781 gatttccggt ga

```

Nukleotidsequenz *egeA*(P) aus BOE200

```

1 atggagatac ataatagccc gatgaatgaa cggcagcgcg gatatcgcga agtttaccgt
61 tcgcgcacga gcggttgGta taatggatat gtgcacgcat tcttgatctt cgggaattggT
121 ctctacgcaa tctttttttt caccatgaac ctaagtgagg ttttgTggTg ggagtggTtg
181 acgataaccgg tagtattctt agggcgacag tgggtcgaat attataccca ccgcttctcTc
241 ttgcacaggc caaagaagTc cggcatgggg cgccttttat atgtacgtca cacactcatg
301 caccaccagt tttttacagc tgaagagcca cgatatgcga atcatcgaga ttggcgagTc
361 acgcttttcc caccatttac tctcaccatc tctacgctga tgatgttacc gtcggcgctc
421 gtagcagggTt gggtaatatc cggcaatgTc ggctggctac tcatggcttc gactatcggt
481 acctacctat tctacgaggt tctgcacttt ctttgccacg tcggtgacaa ttggTtctgTg
541 cggcattgcc ctatcgtcaa taccgcgagg cgcaccaca ccgccatca caaccactcg
601 atcatgatgg aaaccaacat gagcatcgtg ttcccgttct gggattgggt ctacggTact
661 tctgaccttg atcgggggtt gatcggTcat ttattcaacg gttacagcac caagcatatt
721 aaaaaggatc tacgtcagac ggcaagact ccgcacctgc tgccacatgt ttcaaaagct
781 tcttcgaagc ccggtccgga acctgcaaat cgttga

```

Nukleotidsequenz *egeB*(B3) aus BOE3

```

1 atgcctgtgg gtaagaaagt tatgttctcc gtgctgcttt tatgcgcagg agtactgggc
61 tattggatcg aagtagcgat gggTatggag cgcaacattc cctatctcat tgtattggTt
121 gtatttctga tgctcggcct ttggTccatg tcggcggTgc agaaaaaga cgagggtaac
181 aaatga

```

Nukleotidsequenz *egeB*(P) aus BOE200

```

1 atgccggcct caaaaaaatt agtattctct gcgctacttc ttatcgctgg agtgatcgga
61 tatctaattg agataaaaac cgggcgagag gacctgctcg gacacctggg cgcactcgtg
121 gtgctgctga tggTcgggct gtgggcgTta tctccggtag atcgtgagga gttgactcca
181 gccaaagcga ggcgcgaaTg a

```

Nukleotidsequenz *egeC*(B3) aus BOE3

```

1 atgatcaaaa tcgcacagga gcagccatct gcgggtatct acagcggaga gcgcaccatc
61 gacggTctgg tggTcatgta caaaggggct cctctgacga agctgctcgc gctcgacgag
121 acgtcgaacg atgacttcga atggggctat gaaggTgact cgccggcaag actggccat
181 gctctgctgt tgcacgtac tggcgacccc gcggTggctg atgccttttc cattcgtctg
241 atggTgcagt ttgtcgcaaa attagacaac gaatgggagg tgcgggaaga ccaattggat
301 cgtctgattg aagagatcca gcaatccaca ccgcatTgt cctga

```

Anhang

Nukleotidsequenz *egeC*(P) aus BOE200

```
1 atgaataacc cagctaaaag caatcacct gcggaccact acgcaggcga gcgaacaatc
61 gatgggcttt gcgtgacggt caatggcaaa gcactgccga cctttgatga tcttggttac
121 tactccaaaag gaggtttcga atggggttac gaggtgcgg aaccggtgca actggcattc
181 gcgcttctgt actcgaggct acgagatggt gaggtgcgt gtgagctggc gccggtccta
241 atgaagcgca tcgttgcca cttgcgaat gagggggata tctcggggga ccaacttgac
301 gaaaccattg caatcctgca aggcaagcat tacgcgaggg caggtcatgt cacagaagca
361 ctttga
```

7.5 Aminosäuresequenzen von EgeA, EgeB und EgeC

Aminosäuresequenz EgeA(B3) aus BOE3

```
MELVHSPMGLRQRKYREIYRSRLSGFYNGYYHAFLIFGVGLYEIYFATRHSNVLWWEWLFVPAVFLFAQWVEYL
FHRFLAHRPSKSPFWRLAYVRHTLMHHQFFTAEEPRFASHKDWRVTIFPPFTLVFFTLTTIPFAFLAGIISVNV
GWLILATAIGSYVFYELLHFLCHVDDNWFLRHCPVNTARRHHTAHHDSSVMMEYNMSIVFPFWDWVYGTSDLDR
GLFGHLFNGYSTKYVKKDLRKRKTPVETPIDTKPDR
```

Aminosäuresequenz EgeA(P) aus BOE200

```
MEIHNSPMNERQRRYREVYRSRTSGWYNGYVHAFLIFGIGLYAIFFFTMNLSEVLWWEWLTIPVVFLGGQWVEYY
THRFLHRPKKSGMGRLLYVRHTLMHHQFFTAEEPRYANHRDWRVTLFPPFTLTISTLMMLPSALVAGWVISGNV
GWLLMASTIGTYLFYEVHLHFLCHVGDNWFVRHCPVNTARRHHTAHNHHSIMMETNMSIVFPFWDWVYGTSDLDR
GLIGHLFGYSTKHIKKDLRQTAKTPHLLPHVSKASSKPGPEPANR
```

Aminosäuresequenz EgeB(B3) aus BOE3

```
MPVGKKVMFVLLLCAGVLGYWIEVAMGMERNIPYLIVLVVFLMLGLWSMSAVQKKDEGNK
```

Aminosäuresequenz EgeB(P) aus BOE200

```
MPASKKLVFSALLLIAGVIGYLIEIKTGREDLLGHLGALVVLLMVGLWALSPVDREELTPAKARRE
```

Aminosäuresequenz EgeC(B3) aus BOE3

```
MIKIAQEQPSAGIYSGERTIDGLVVMYKGAPLTKLLALDETSNDDFEWGYEGDSPARLAHALLLHRTGDPVADA
FSIRLMVQFVAKLDNEWEVREDQLDRLIEEIQOSTPALS
```

Aminosäuresequenz EgeC(P) aus BOE200

```
MNNPAKSNHPADHYAGERTIDGLCVTVNGKALPTFDDLVTYSKGGFEWGYEGAEFPVQLAFALLYSRLRDVEAACE
LAPVLMKRIVANLANEWDISGDQLDETIAILQGKHYARAGHVTEAL
```

7.6 Aminosäuresequenz von SCS7

```
MSTNTSKTLELFSKKTQEHNTANDCWVTYQNRKIYDVTRFLSEHPGGDESILDYAGKDI TEIMKDSVDVHEHSDS
AYEILEDEYLI GYLATDEEAARLLTNKNHKVEVQLSADGTEFDSTTFVKELPAEEKLSIATDYSNDYKHKHFLDL
NRPLLMOILRSDFKDFYVDQIHRPRHYGKGSAPLFGNFLEPLTKTAWVVVPVAVLPVVVYHMGVALKNMNQLFA
CFLFCVGVFVWTLIEYGLHRFLFHFDWLPESNIAFATHFLLHGCHHYLPMDKYRLVMPPTLFLVILCAPFYKLVF
ALLPLYWAYAGFAGGLFGYVCYDECHFFLHHSKLPPFMRKLLKYYHLEHHYKNYQLGFGVTSWFWDEVFGTYLGPD
APLSKMKYESGLEVLFO
```

7.7 Lebenslauf

Beruflicher Werdegang

- 09/10–heute **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft (ISWA), Abteilung Biologische Abluftreinigung (ALR)
- Forschung**
Biologische Abluftreinigung
bakterieller Abbau von Ethern, Isophoron, Furan, *tert*-Butanol
- Lehre**
Vorlesung: Methodiken des umweltmikrobiologischen Arbeitens
Praktikumsleitung: Mikrobiologie für Ingenieure I + II
Praktikumsleitung: Mikrobiologie für Ingenieure III
Betreuung von Abschlussarbeiten (Bachelor und Master)
- Projekte**
- 05/16–heute Sensormodul zur mobilen Emissionsüberwachung von Klärschlämmen („Sensor“)
- Entwicklung eines Sensormodules zur Detektion von verschiedenen Gasen, die aus Klärschlamm emittieren (Projektträger: AiF Projekt GmbH)
- 11/17–02/18 Biosynthese von Lävulinsäure-Derivaten als Plattformchemikalie aus Abfällen der Holz-, Papier- und Zuckerindustrie („BioLäv“)
- Isolierung und Charakterisierung von Bakterienstämmen, die Furan abbauen, zur Herstellung von Lävulinsäure-Derivaten (PTKA-BWP)
- 04/13 – 08/16 Verfahren zur Behandlung und stofflichen/thermischen Wiederverwertung industrieller Abluftströme („String“)
- Entkeimung von Abluft, die mit einem Biotricklingfilter behandelt wurde (BMW über AiF)
- 02/11–03/13 Anti-Clogging Maßnahmen PU-Schaum („ACM PUSch“)
- Vergleich, Bewertung und Optimierung unterschiedlicher Verfahren, um Clogging in Biotricklingfiltern zu vermeiden (BMBF über PT-DLR)

Akademischer Werdegang

- 09/10 – 07/18 **Promotion**
Universität Stuttgart, ISWA, Abteilung ALR
Titel: „Der biologische Abbau von hydroxylierten Alkylethern“
- 09/10 – 08/13 Promotionsstipendium der Landesgraduiertenförderung
- 10/04 – 06/10 **Studium**
Universität Stuttgart, Studiengang: Umweltschutztechnik
Diplomarbeit am ISWA, Abteilung ALR
Titel: „Der Abbau von Butoxyethanol und dessen biotechnologische Anwendung in einem Biowäscher“