

Die initialen PAK-Dioxygenasen von Bakterien

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Ralf Moser
aus München

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Buchholz

1. Bericht: Prof. Dipl.-Ing. Dr. U. Stahl

2. Bericht: Prof. Dr. Dr.-Ing. P. Kämpfer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 08. Mai 2001

Berlin 2001

D 83

„Die wirkliche Weite ist nicht für das Auge,
sie wird nur dem Geist offenbart.“
(Antoine de Saint-Exupéry)

Meinen Eltern
gewidmet

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Fachgebiet Mikrobiologie und Genetik im Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dipl.-Ing. Dr. U. STAHL im Zeitraum von 1996 bis 2001. Diese Arbeit wurde im Zeitraum 1996 bis 1999 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziell gefördert (STA 245/6-1 und 6-2).

Zum Gelingen dieser Arbeit haben eine Reihe von Personen beigetragen, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte:

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dipl.-Ing. Dr. U. STAHL für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Nicht nur seine stete Diskussionsbereitschaft in einer sehr persönlichen Gesprächsatmosphäre sondern auch sein grosses Interesse am Fortgang dieser Arbeit haben ganz wesentlich zu deren Gelingen beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. P. KÄMPFER, Institut für Angewandte Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen, möchte ich sehr für die Übernahme des Koreferats und die damit verbundene Mühe danken. In diesem Zusammenhang auch ein herzliches Dankeschön für die Überlassung von Bakterienstämmen und die gute Kooperation innerhalb des Projektes.

Mein sehr persönlicher Dank gilt Frau Dr. SVENJA MEYER für die sehr gute Zusammenarbeit, die angenehmen (arbeitsreichen) gemeinsamen Laborerfahrungen und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dipl.-Ing. STEFANIE THULKE, Frau Dipl.-Ing. KATHARINA WYZISK und Frau SABRINA MEINCKE für die wertvolle Hilfestellung und gewissenhafte Durchführung einer Reihe von Experimenten.

Herrn Dr. A. KECK, Herrn Dr. J. KLEIN und Herrn Prof. Dr. R. MATTES, Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart, sowie Herrn Prof. Dr. G. SCHULZ, Abteilung Mikrobiologie/Biochemie der Fachhochschule Lausitz (Senftenberg) danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese. Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. U. SZEWZYK und Frau Dipl.-Biol. M. ALEXANDRINO, Institut für Ökologie der Mikroorganismen der Technischen Universität Berlin, für die Unterstützung und die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Materialien zur DNA-Isolation aus Belebtschlamm-Proben. Bei Herrn Dr. M. MEIXNER möchte ich mich für die DNA-Sequenzierarbeiten und die hilfreichen Tips und Diskussionen bedanken. Der Leitung des Klärwerkes Ruhleben (Berlin) danke ich für die Überlassung von Belebtschlamm-Proben.

Bei Frau BIRGIT BERNHARDT und Herrn KLAUS SCHEIDE möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre im „Labor 3“ bedanken. Frau B. Soc. Sci. ROSLIN BENSMANN danke ich für die zahlreichen Englisch-Korrekturen. Im weiteren ein herzliches Dankeschön allen meinen namentlich nicht genannten KollegInnen für die gute Zusammenarbeit, die hilfreichen Ratschläge und die gute Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern danke ich ganz besonders für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen während der letzten Jahre. Nicht zuletzt danke ich auch Frau MAREIKE KURZ für viele wertvolle Hilfestellungen und Korrekturen des Manuskriptes.

INHALTSVERZEICHNIS

I THEORETISCHER TEIL	1
ÄHNLICHKEIT IN STRUKTUR UND MECHANISMUS VON RINGHYDROXYLIERENDEN DIOXYGENASEN IN BAKTERIEN	
1 EINLEITUNG	1
2 ALLGEMEINER ÜBERBLICK ÜBER BAKTERIELLE OXYGENASEN	1
2.1 MONOOXYGENASEN	2
2.2 DIOXYGENASEN	3
2.2.1 EXTRADIOLE DIOXYGENASEN	3
2.2.2 INTRADIOLE DIOXYGENASEN	4
3 RINGHYDROXYLIERENDE DIOXYGENASEN	5
3.1 KLASSIFIZIERUNG	5
3.2 ELEKTRONENTRANSPORTSYSTEME – REDUKTASE- UND FERREDOXIN-KOMPONENTEN	6
3.2.1 REDUKTASEN	8
3.2.2 FERREDOXINE	10
4 DIE TERMINALEN KOMPONENTEN DER INITIALEN DIOXYGENASEN	11
5 DIE STRUKTUR DER NAPHTHALIN-DIOXYGENASE	13
5.1 KRISTALLISATION UND STRUKTURAUFKLÄRUNG	14
5.2 FUNKTIONELLE STUDIEN	15
6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	18
II PRAKTISCHER TEIL	19
DIE INITIALEN PAK-DIOXYGENASEN VON BAKTERIEN:	
1 EINLEITUNG	19
1.1 POLYZYKLISCHE AROMATISCHE KOHLENWASSERSTOFFE (PAK) – ENTSTEHUNG, TOXIKOLOGIE UND ABIOTISCHER ABBAU	19
1.2 PHYSIKALISCHE UND BIOGENE EINFLÜSSE AUF DIE PHYSIOLOGIE DES MIKROBIELLEN KATABOLISMUS	20
1.3 PAK-ABBAU DURCH MIKROORGANISMEN, PHYSIOLOGIE UND GENETIK	21
1.4 DETEKTION DES PAK-ABBAUPOTENZIALS	26
1.4.1 DIE INITIALEN PAK-DIOXYGENASEN	26
1.4.2 DIE CATECHOL 2,3-DIOXYGENASEN (C23O)	27
1.5 PROBLEMSTELLUNG	28
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 ORGANISMEN UND PLASMIDE	30
2.2 OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE	31
2.3 HÄUFIG VERWENDETE MEDIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER	33
2.4 GERÄTE UND CHEMIKALIEN	34
2.4.1 VERWENDETE GERÄTE	34

2.4.2 VERWENDETE CHEMIKALIEN, ENZYME UND REAKTIONS-KITS	35
2.5 STAMMERHALTUNG	35
2.6 ZELLANZUCHTEN	35
2.6.1 ANZUCHT VON <i>E. COLI</i> -STÄMMEN	35
2.6.2 ANZUCHT VON NAPHTHALIN-, PHENANTHREN- UND TOLUOL-ABBAUENDEN BAKTERIEN IN FLÜSSIGKULTUR	36
2.6.3 NACHWEIS DER PHENANTHREN-, NAPHTHALIN- UND TOLUOL-ABBAU-AKTIVITÄT VERSCHIEDENER BAKTERIEN AUF FESTMEDIEN	36
2.6.4 DIFFERENZIELLE ANREICHERUNG VON NAPHTHALIN UND PHENANTHREN KATABOLISIERENDEN BAKTERIEN IN BELEBTSCHLAMM-BIOZÖNOSEN	36
2.7 BESTIMMUNG DES BAKTERIENWACHSTUMS	37
2.8 ISOLIERUNG VON DNA	37
2.8.1 PLASMID-PRÄPARATIONEN AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	37
2.8.2 PLASMID-PRÄPARATIONEN FÜR DEN NACHWEIS HOCHMOLEKULARER KATABOLER PLASMIDE	37
2.8.3 ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA FÜR PCR-VERSUCHE	38
2.8.4 ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA AUS GRAM-NEGATIVEN UND -POSITIVEN BAKTERIEN	38
2.8.5 ISOLIERUNG VON GESAMT-DNA AUS BELEBTSCHLAMM-PROBEN	38
2.9 BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION UND REINHEITSABSCHÄTZUNG	39
2.10 DNA-GELELEKTROPHORESEN	39
2.10.1 ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE AGAROSE-DNA-GELELEKTROPHORESE	39
2.10.2 CLAMPED-HOMOGENOUS-ELECTRIC-FIELD (CHEF)- PULSFELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE)	39
2.11 SOUTHERN-BLOT ANALYSEN	40
2.11.1 SOUTHERN-HYBRIDISIERUNGEN NACH AGAROSE-GELELEKTROPHORESEN	40
2.11.2 ENTFERNUNG EINER DNA- ODER OLIGONUKLEOTID-SONDE NACH HYBRIDISIERUNG (PROBE-STRIPPING)	40
2.11.3 KOLONIEFILTER-HYBRIDISIERUNGEN	41
2.11.4 DNA-SLOT-BLOT-HYBRIDISIERUNGEN	41
2.12 ENZYMATISCHE BEHANDLUNG VON NUKLEINSÄUREN (<i>IN-VITRO</i> -DNA-TECHNIKEN)	41
2.12.1 SPALTUNG MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	41
2.12.2 DEPHOSPHORYLIERUNG DURCH ALKALISCHE PHOSPHATASE	41
2.12.3 LIGATION	41
2.12.4 RADIOAKTIVE- UND NICHT-RADIOAKTIVE-MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	42
2.12.5 DNA-SEQUENZIERUNG	42
2.13 TRANSFORMATION VON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	42
2.14 ISOLATION DER GENE UND NACHWEIS DER AKTIVITÄT DER INITIALEN PAK-DIOXYGENASE DES STAMMES <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> H	42
2.14.1 NACHWEIS DER INITIALEN PAK-DIOXYGENASE DURCH SOUTHERN-ANALYSE	42
2.14.2 KONSTRUKTION EINER PARTIELLEN GENBANK VON <i>C. TESTOSTERONI</i> H	42
2.14.3 KLONIERUNG DER KODIERENDEN SEQUENZEN DER INITIALEN PAK-DIOXYGENASE AUS <i>C. TESTOSTERONI</i> H UND DER NAPHTHALIN-DIOXYGENASE AUS <i>P. PUTIDA</i> NCIB9816	43
2.15 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	43
2.17 MESSUNG DER GENTISAT 1,2-DIOXYGENASE (G12O)-AKTIVITÄT DER STÄMME <i>C. TESTOSTERONI</i> G UND H	43
2.17.1 HERSTELLUNG VON ZELLFREIEN EXTRAKTEN UND PROTEINBESTIMMUNG	43
2.17.2 PHOTOMETRISCHER NACHWEIS DER G12O-AKTIVITÄT	44
2.18 COMPUTER-ANALYSEN	44

3	ERGEBNISSE	45
3.1	NACHWEIS DES PHENANTHREN-ABBAUS DURCH DIE BAKTERIEN-ISOLATE AUF FESTMEDIEN	45
3.2	DIE INITIALEN PAK-DIOXYGENASEN DER <i>PSEUDOMONAS</i> -STÄMME	47
3.2.1	PRIMERENTWICKLUNG UND NACHWEIS DER FÜR DIE INITIALE PAK-DIOXYGENASE CODIERENDEN GENE MIT PCR- UND OLIGONUKLEOTID-SONDEN-TECHNIK	47
3.2.2	SEQUENZIERUNG VON PCR-FRAGMENTEN UND PHYLOGENETISCHE ANALYSE VON DIOXYGENASE ALPHA-UNTEREINHEITEN	48
3.3	DIE INITIALEN PAK-DIOXYGENASEN DER <i>COMAMONAS</i> -ISOLATE	50
3.3.1	ISOLATION DER CODIERENDEN SEQUENZ DER INITIALEN PAK-DIOXYGENASE AUS <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> H	50
3.3.1.1	IDENTIFIZIERUNG DES PAK-ABBAU-GENCLUSTERS AUS <i>C. TESTOSTERONI</i> H MITTELS HETEROLOGER HYBRIDISIERUNG	50
3.3.1.2	ISOLATION UND SEQUENZIERUNG VON TEILEN DES PAK-ABBAU-GENCLUSTERS AUS <i>C. TESTOSTERONI</i> H	51
3.3.2	NACHWEIS DER GENTISAT 1,2-DIOXYGENASE (G12O) DER STÄMME <i>C. TESTOSTERONI</i> G UND H	53
3.3.3	SUBKLONIERUNG UND NACHWEIS DER AKTIVITÄT DER INITIALEN PAK-DIOXYGENASE VON <i>C. TESTOSTERONI</i> H	54
3.3.4	PLASMIDNACHWEIS UND LOKALISIERUNG DER ABBAUGENE MITTELS PULSFELD GEL-ELEKTROPHORESE (PFGE) UND SOUTHERN-ANALYSE	56
3.4	ENTWICKLUNG EINES DIFFERENTIELLEN PCR UND OLIGONUKLEOTIDSONDEN GESTÜTZTEN NACHWEISSYSTEMS ZUR DETEKTION DER INITIALEN PAK-DIOXYGENASEN FÜR VERTRETER DER GATTUNGEN <i>PSEUDOMONAS</i> , <i>COMAMONAS</i> UND <i>RHODOCOCCUS</i>	58
3.4.1	PRIMERENTWICKLUNG FÜR INITIALE PAK-DIOXYGENASEN DER GATTUNGEN <i>COMAMONAS</i> UND <i>RHODOCOCCUS</i>	59
3.4.2	NACHWEIS DER INITIALEN PAK-DIOXYGENASEN AUS STÄMMEN DER GATTUNGEN <i>PSEUDOMONAS</i> , <i>COMAMONAS</i> UND <i>RHODOCOCCUS</i> MITTELS PCR UND OLIGONUKLEOTID-SONDEN	61
3.4.3	SEQUENZIERUNG DER PCR-FRAGMENTE VON ALPHA-UNTEREINHEITEN INITIALER PAK-DIOXYGENASEN VON VERTRETERN DER GATTUNGEN <i>COMAMONAS</i> UND <i>RHODOCOCCUS</i> UND REKONSTRUKTION EINES ERWEITERTEN DENDROGRAMMS	64
3.5	ALTERNATIVE DETEKTIONSMETHODEN ZUM NACHWEIS DER INITIALEN PAK-DIOXYGENASEN VON VERTRETERN DER GATTUNGEN <i>PSEUDOMONAS</i> , <i>COMAMONAS</i> UND <i>RHODOCOCCUS</i> UND ANDERER PAK-METABOLISIERENDER BAKTERIEN	66
3.5.1	RESTRIKTION UND SOUTHERN-ANALYSE GENOMISCHER DNA	66
3.5.2	SLOT-BLOT HYBRIDISIERUNG GENOMISCHER DNA	67
3.6	NACHWEIS INITIALER DIOXYGENASEN IN BELEBTSCHLAMM-BIOZÖNOSEN	69
3.6.1	NACHWEIS DES <i>PSEUDOMONAS</i> -ALLELS <i>NAHAC</i> IN BELEBTSCHLAMM-DNA (NACH CTAB-EXTRAKTION)	69
3.6.2	DIFFERENTIELLER NACHWEIS INITIALER PAK-DIOXYGENASEN IN BELEBTSCHLAMM	70
3.6.3	SEQUENZBESTIMMUNG DER PCR-FRAGMENTE AUS BELEBTSCHLAMM UND EINORDNUNG IN DEN STAMMBAUM VON ALPHA-UNTEREINHEITEN INITIALER PAK-DIOXYGENASEN	72
4	DISKUSSION	75
4.1	PHENANTHREN-ABBAU AUF FESTMEDIEN DURCH BAKTERIELLE UMWELTISOLATE UND REFERENZSTÄMME	75
4.2	DIE INITIALEN PAK-DIOXYGENASEN DER <i>PSEUDOMONAS</i> -STÄMME	79
4.2.1	NACHWEIS DER GENE DER ALPHA-UNTEREINHEITEN INITIALER PAK-DIOXYGENASEN IN <i>PSEUDOMONAS</i> -STÄMMEN MIT PCR- UND OLIGONUKLEOTID-SONDEN	79
4.2.2	SEQUENZIERUNG UND SEQUENZ-ANALYSE INTERNER DNA-FRAGMENTE DER <i>NAHAC</i> -ALLELE DER GATTUNG <i>PSEUDOMONAS</i>	80

19	Agarose-Gelelektrophorese (A1) und Southern-Analyse (A2) von PCR-Fragmenten, die aus Belebtschlamm-DNA (BS-DNA) mit dem Primerpaar PSE1 (PSE1for/PSE1rev) amplifiziert wurden	70
20	Agarose-Gelelektrophorese und Southern-Analyse von PCR-Fragmenten aus Belebtschlamm (BS) unterschiedlicher Probenahmestellen und verschiedener Inkubationsbedingungen mit dem Primerpaar PSE1 (A1), COM1 (B1) und RHO1 (C1).....	72
21	Erweitertes Dendrogramm von Alpha-Untereinheiten initialer PAK- und aromatischer Dioxygenasen mit DNA-Sequenzen von Belebtschlamm-PCR-Fragmenten	74
22	Anordnung der <i>nah</i> -Gene und Regulation des oberen (<i>nahABCFDE</i> , Naphthalin bis Salicylat) und des unteren (<i>nahGHINLJK</i> , Salicylat bis 2-Oxo-4-hydroxypentonoat) Abbauweges durch den Induktor Salicylat und das Genprodukt NahR (nach Houghton & Shanley 1994)	77
23	Genanordnung der vier Untereinheiten der initialen Naphthalin-Dioxygenase des Stammes <i>P. putida</i> G7 (nach Simon <i>et al.</i> 1993)	79
24	Dendrogramm der Alpha-Untereinheiten bakterieller initialer aromatischer Dioxygenasen.....	89

TABELLENVERZEICHNIS

A	Ringhydroxylierende Dioxygenasen.....	8
1A	Verwendete Bakterienstämme	30
1B	Verwendete Plasmide und deren Derivate.....	31
2	Oligonukleotide für PCR, direkte Amplikon-Sequenzierung und Detektion der Alpha-Untereinheiten initialer PAK-Dioxygenasen.....	31
3	Stammlösungen und Arbeitskonzentrationen verwendeter Antibiotika	36
4	Bakterieller Abbau von kristallinem Phenanthren	45
5	Identität (%) der abgeleiteten Proteine des PAK-Abbau-Genclusters <i>pah</i> aus <i>C. testosteroni</i> H mit repräsentativen ähnlichen Proteinen	52
6	Hochmolekulare Plasmid-DNA in Stämmen der Gattungen <i>Pseudomonas</i> und <i>Comamonas</i>	57
7	Nachweis der Alpha-Untereinheiten initialer PAK-Dioxygenasen von PAK-abbauenden Bakterien mittels PCR und Southern-Hybridsierung	62
8	BS-Feuchtmasse- (BS-FM) und BS-Trockenmasse- (BS-TM) Bestimmung der in die FastDNA (BIO101)- Extraktion eingesetzten BS-Proben.....	71
9	Isolationsstandorte der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme (nach Meyer 1999)	76

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

A	Zusammensetzung der Untereinheiten ausgewählter bakterieller ringhydroxylierender Dioxygenasen [erweitert nach Powlowski & Shingler (1994) und Butler & Mason (1997)]	7
B	Aminosäuresequenzvergleich von Alpha-Untereinheiten ringhydroxylierender Dioxygenasen	12
C	Struktur und vermuteter Elektronentransfer zwischen zwei benachbarten α -Untereinheiten der NDO (nach Kauppi <i>et al.</i> 1998)	15
D	Hypothetischer Reaktionszyklus der NDO (nach Wolfe <i>et al.</i> 2001)	17
1	Chemische Strukturformeln von sechs nach TVO zu bestimmenden hochmolekularen (HM)-PAK	20
2	Metabolite des Benzo[<i>a</i>]pyren-Abbaus (nach Schneider <i>et al.</i> 1996)	23
3	Allgemeines Abbauschema von Naphthalin, Anthracen und Phenanthren über die zentralen Metabolite Catechol, Protocatechuat und Gentisat durch Bakterien	25
4	Reaktionsmechanismus der initialen Naphthalin-Dioxygenase aus <i>P. putida</i> NCIB9816-4	27
5	Agarose-Gelelektrophorese (A1) und Southern-Analyse (A2) von PCR-Fragmenten der Alpha-Untereinheit initialer PAK-Dioxygenasen aus PAK-katabolisierenden Stämmen der Gattung <i>Pseudomonas</i>	47
6	Dendrogramm der Alpha-Untereinheiten initialer aromatischer Dioxygenasen aus Stämmen der Gattung <i>Pseudomonas</i>	49
7	Agarose-Gelelektrophorese (A1) und Southern-Analyse (A2) von PstI-verdauter genomischer DNA der drei PAK-metabolisierenden <i>Comamonas</i> Stämme G, H und M7 im Vergleich mit dem PAK-katabolisierenden Stamm <i>P. putida</i> NCIB9816 und den negativ-Kontrollstämmen <i>P. putida</i> F1 und <i>E. coli</i> SURE	50
8	Genanordnung des partiell sequenzierten PAK-Abbaucusters aus <i>C. testosteroni</i> H (rekombinantes Plasmid pCORM1)	51
9	Bildung von Maleylpyruvat aus Gentisat (2,5-Dihydroxybenzoesäure) durch Zellextrakte der, mit Salicylat als Kohlenstoff- und Energiequelle, gewachsenen Stämme <i>C. testosteroni</i> G (A) und H (B)	54
10	Auflösung kristalliner Phenanthren-Schichten durch initiale PAK-Dioxygenasen aus <i>P. putida</i> NCIB9816 (pDIOX1.36) und <i>C. testosteroni</i> H (pCDIOX1 – 3) kloniert in <i>E. coli</i> DH5 α	55
11	Bildung von Indigo aus Indol durch initiale PAK-Dioxygenasen aus <i>P. putida</i> NCIB9816 (pDIOX1.36) und <i>C. testosteroni</i> H (pCDIOX1) kloniert in <i>E. coli</i> DH5 α	56
12	Pulsfeld Gelelektrophorese und Southern-Analyse von in Agarose-Blöckchen eingebetteten und lysierten Bakterienzellen zur Detektion von katabolen Plasmiden	58
13	Sequenzvergleich von Alpha-Untereinheiten initialer PAK-, Toluol- und Benzol-Dioxygenasen von <i>Pseudomonas</i> -, <i>Comamonas</i> - und <i>Rhodococcus</i> -Stämmen	60
14	Primerentwicklung für den PCR-Nachweis der initialen PAK-Dioxygenasen aus den Stämmen der Gattungen <i>Pseudomonas</i> , <i>Comamonas</i> und <i>Rhodococcus</i>	61
15	Agarose-Gelelektrophorese und Southern-Analyse von PCR-Fragmenten (0,9 kb), die mit den Primerpaaren PSE1 (A1), COM1 (B1) und RHO1 (C1) amplifiziert und mit Hilfe der P32-markierten Oligonukleotidsonden PSE/COM1 α (A2, B2) und RHO1 α (C2) hybridisiert wurden	62
16	Erweitertes Dendrogramm der Alpha-Untereinheiten initialer aromatischer Dioxygenasen aus Stämmen der Gattungen <i>Pseudomonas</i> , <i>Comamonas</i> und <i>Rhodococcus</i>	65
17	Agarose-Gelelektrophorese (A1 und A2) und Southern-Analysen mit unterschiedlichen Sonden (B1A-C und B2A-C) von PstI-restringierter genomischer DNA aus PAK-katabolisierenden Umweltisolaten und entsprechenden Referenzstämmen	66
18	Quantitative Slot-Blot-Analyse unterschiedlicher genomischer DNA-Mengen mit dem 32P-markierten Oligonukleotid PSE/COM α zur Ermittlung der Nachweisgrenze der Alpha-Untereinheit initialer PAK-Dioxygenasen aus Vertretern der Gattungen <i>Pseudomonas</i> , <i>Comamonas</i> und <i>Rhodococcus</i> im Vergleich mit den Referenzstämmen <i>P. putida</i> F1 und <i>E. coli</i> DSM1576	68

19	Agarose-Gelelektrophorese (A1) und Southern-Analyse (A2) von PCR-Fragmenten, die aus Belebtschlamm-DNA (BS-DNA) mit dem Primerpaar PSE1 (PSE1for/PSE1rev) amplifiziert wurden	70
20	Agarose-Gelelektrophorese und Southern-Analyse von PCR-Fragmenten aus Belebtschlamm (BS) unterschiedlicher Probenahmestellen und verschiedener Inkubationsbedingungen mit dem Primerpaar PSE1 (A1), COM1 (B1) und RHO1 (C1).....	72
21	Erweitertes Dendrogramm von Alpha-Untereinheiten initialer PAK- und aromatischer Dioxygenasen mit DNA-Sequenzen von Belebtschlamm-PCR-Fragmenten	74
22	Anordnung der <i>nah</i> -Gene und Regulation des oberen (<i>nahABCFDE</i> , Naphthalin bis Salicylat) und des unteren (<i>nahGHINLJK</i> , Salicylat bis 2-Oxo-4-hydroxypentonoat) Abbauweges durch den Induktor Salicylat und das Genprodukt NahR (nach Houghton & Shanley 1994)	77
23	Genanordnung der vier Untereinheiten der initialen Naphthalin-Dioxygenase des Stammes <i>P. putida</i> G7 (nach Simon <i>et al.</i> 1993)	79
24	Dendrogramm der Alpha-Untereinheiten bakterieller initialer aromatischer Dioxygenasen.....	89

TABELLENVERZEICHNIS

A	Ringhydroxylierende Dioxygenasen.....	8
1A	Verwendete Bakterienstämme	30
1B	Verwendete Plasmide und deren Derivate.....	31
2	Verwendete Plasmide und deren Derivate.....	31
3	Stammlösungen und Arbeitskonzentrationen verwendeter Antibiotika	36
4	Bakterieller Abbau von kristallinem Phenanthren	45
5	Identität (%) der abgeleiteten Proteine des PAK-Abbau-Genclusters <i>pah</i> aus <i>C. testosteroni</i> H mit repräsentativen ähnlichen Proteinen	52
6	Hochmolekulare Plasmid-DNA in Stämmen der Gattungen <i>Pseudomonas</i> und <i>Comamonas</i>	57
7	Nachweis der Alpha-Untereinheiten initialer PAK-Dioxygenasen von PAK-abbauenden Bakterien mittels PCR und Southern-Hybridsierung.....	62
8	BS-Feuchtmasse- (BS-FM) und BS-Trockenmasse- (BS-TM) Bestimmung der in die FastDNA (BIO101)- Extraktion eingesetzten BS-Proben.....	71
9	Isolationsstandorte der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme (nach Meyer 1999)	76

ABKÜRZUNGEN

[2Fe-2S] _{Fd}	Ferredoxin [2Fe-2S]-Zentren
[2Fe-2S] _R	Rieske [2Fe-2S]-Zentren
[v/v]	Volumen / Volumen
[w/v]	Gewicht / Volumen
°C	Grad Celsius
1,2-CTD	Catechol 1,2-Dioxygenasen
2NTDO	2-Nitrotoluol-Dioxygenase
3,4-PCD	Protocatechuat 3,4-Dioxygenasen
4,5-PCD	Protocatechuat 4,5-Dioxygenase
Å	Angström
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Acc.-Nr.	Accession-Nummer (GenBank)
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
BaA	Benzo[a]anthracen
BaP	Benzo[a]pyren
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
BphC	2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase
BS	Belebtschlamm
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CAM	Campher
CAS	Chemical Abstracts Service, USA
CHEF	Clamped Homogenous Electric Fields
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
d.h.	das heisst
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxigenin
Dit	Diterpenoid
DitA	Diterpenoid-Dioxygenase
DMS(Z)	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTDO	2,4-Dinitrotoluol-Dioxygenase
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat
Dxn	Dioxin
E	Extinktion
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EPA	Environmental Protection Agency, USA
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
<i>et al.</i>	lat.: <i>et alii</i> , und andere
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	lat.: <i>et cetera</i> , und weitere
ε	Extinktionskoeffizient
FAD	Flavinadenin-dinukleotid

Fer	Ferredoxin
FM	Feuchtmasse
FMN	Flavin-mononukleotid
g, mg	Gramm, Milligramm
G12O	Gentisat 1,2-Dioxygenase
GenBank	Genetic Sequence Data Bank
h	lat.: <i>hora</i> , Stunde
HM	Hochmolekular
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HppB	2,3-Dihydroxyphenylpropionat 1,2-Dioxygenase
html	Hypertext Markup Language
http	Hypertext Transfer Protocol
IARC	International Agency for Research on Cancer
i.d.R.	in der Regel
inkl.	inklusive
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
Konz.	konzentriert
l, ml	Liter, Milliliter
LB	Luria-Bertani-Medium
LfU	Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg
LMW	Light Molecular Weight
M, mM	Molar, Millimolar
MG	Molekulargewicht
mind.	mindestens
MM	Mineralsalzmedium
MO	Mikroorganismen
mol	Stoffmenge
MP	Maleylpyruvat
MPC	Metapyrocatechase (Catechol 2,3-Dioxygenase)
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinukleotid(phosphat), reduziert
Nah	Naphthalin
NB	Nutrient Broth
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Salz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCI(M)B	National Collections of Industrial (and Marine) Bacteria
NDO	Naphthalin-Dioxygenase
NM	Niedermolekular
OD	Optische Dichte
orf	open reading frame
p.a.	per analysis
PAK	Polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pers.	persönliche
PFGE	Pulsfeld Gelelektrophorese
PFG-Marker	Pulsfeld-Gelelektrophorese-Marker
Phd	Phenanthren-Dioxygenase
Phe	Phenanthren
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PNK	Polynukleotidkinase
<i>p</i> -Xyl	<i>p</i> -Xylol
Red	Reduktasen

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Sal	Salicylat
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TetC	Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase
TM	Trockenmasse
Tol	Toluol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	Trypticase-Soy-Medium
TVO	Trinkwasserverordnung
U	Internationale Enzymeinheit (Unit; $\mu\text{mol}/\text{min}$)
u.a.	unter anderem
ÜN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
URL	Uniform Resource Locator
V, mV	Volt, milli Volt
vgl.	vergleiche
WWW	World Wide Web
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl-- β -D-galactopyranosid

PROTEINNOMENKLATUR

α	α -Helix (Sekundärstruktur von Proteinen) oder α -Untereinheit
β	β -Faltblatt (Sekundärstruktur von Proteinen) oder β -Untereinheit
C-Terminus	Carboxyterminus der Polypeptidkette
N-Terminus	Aminoterminus der Polypeptidkette

BUCHSTABENKODIERUNG DER NUKLEINSÄUREN UND AMINOSÄUREN:

NUKLEINSÄUREN:

A	Adenin	
C	Cytosin	
G	Guanin	
T	Thymin	
U	Uracil	
R	G oder A	Purine
Y	T oder C	Pyrimidine
K	G oder T	K eto
M	A oder C	A mino
S	G oder C	s trong
W	A oder T	w weak
B	G oder T oder C	
D	G oder A oder T	
H	A oder C oder T	
V	G oder C oder A	
N	A oder G oder C oder T	

AMINOSÄUREN:

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