

**Biochemische und molekularbiologische
Untersuchung reduktiver Dehalogenasen aus
Dehalococcoides sp. Stamm CBDB1**

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Tina Hölscher

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. rer. nat. Roland Tressl

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Helmut Görisch

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Szewzyk

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 02.02.2005

Berlin 2005

D83

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Vorkommen und Eigenschaften von Chlorbenzolen	1
1.2 Mikrobielle Dechlorierung von Chlorbenzolen	2
1.2.1 Aerobe Dechlorierung.....	2
1.2.2 Anaerobe reduktive Dechlorierung.....	3
1.3 Dehalorespiration	4
1.4 <i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm CBDB1	6
1.5 Reduktive Dehalogenasen.....	8
1.5.1 Biochemie der reduktiven Dehalogenasen	8
1.5.2 Molekularbiologie der reduktiven Dehalogenasen.....	11
1.5.3 Elektronentransport	13
1.6 Ziel der Arbeit.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Chemikalien und Gase	15
2.2 Anaerobe Kultivierung	15
2.2.1 Verwendete <i>Dehalococcoides</i> -Stämme.....	15
2.2.2 Herstellung des Mediums.....	15
2.2.3 Kultivierung mit TCB	16
2.2.4 Kultivierung mit 1,2,3,4-TeCB und PeCB.....	17
2.2.5 Kultivierung mit 2,3-Dichlorphenol.....	17
2.2.6 Kultivierungsversuche mit Stamm FL2	17
2.2.7 Wachstums- und Kontaminationskontrollen.....	17
2.3 Herstellung von Zellsuspensionen und subzellulären Fraktionen.....	18
2.3.1 Präparation von Rohextrakt und Membranfraktionen	18
2.3.2 Solubilisierung von Membranproteinen.....	18
2.3.3 Zellpermeabilisierung.....	19
2.3.4 Probenherstellung für die native Gelelektrophorese.....	19
2.4 Säulenchromatographie	19
2.4.1 Anionenaustausch-Chromatographie	19
2.4.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie	20
2.5 Methoden zur gelelektrophoretischen Trennung von CBDB1- Proteinen.....	20
2.5.1 SDS-PAGE	20
2.5.2 Native Taurodesoxycholat-PAGE	21
2.5.3 Native PAGE nach Schägger und von Jagow	21
2.5.4 Präparation und Transfer von Protein aus Gelfragmenten.....	23
2.5.5 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	23

2.5.6 Isoelektrische Fokussierung unter nativen Bedingungen.....	24
2.6 Bestimmung der Dehalogenase-Aktivität	25
2.6.1 Dehalogenase-Aktivitätstest	25
2.6.2 Elektronendonoren.....	25
2.6.3 Bestimmung des pH-Optimums.....	25
2.6.4 Photometrischer Dehalogenase-Aktivitätstest.....	26
2.6.5 Reversible Hemmung der TCB-Dehalogenase.....	26
2.6.6 Dechlorierung von hochchlorierten Benzolen.....	27
2.7 Molekularbiologische Methoden.....	27
2.7.1 Präparation genomischer DNA.....	27
2.7.2 Amplifikation und Klonierung von RDH-Genen	27
2.7.3 Kolonie-PCR	28
2.7.4 Restriktionsanalyse	29
2.7.5 Sequenzierung der RDH-Gene	29
2.7.6 Zusätzliche RDH-Sequenzen	30
2.7.7 Sequenzanalysen	30
2.8 Analytik.....	31
2.8.1 GC-Analyse von Chlorbenzolen	31
2.8.2 HPLC-Analyse von Chlorphenolen.....	31
2.8.3 Proteinbestimmung	32
2.8.4 Massenspektrometrie von Peptiden	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Kultivierung von Stamm CBDB1	33
3.1.1 Chlorbenzole als Elektronenakzeptoren.....	33
3.1.2 Chlorphenole als Elektronenakzeptoren.....	34
3.1.3 Kultivierungstests mit Stamm FL2	34
3.2 Biochemische Charakterisierung der reduktiven Chlorbenzol- Dehalogenase	34
3.2.1 Dehalogenase-Aktivitätstests	34
3.2.2 Spezifische 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität in Rohextrakten und intakten Zellen.....	35
3.2.3 Elektronendonoren.....	35
3.2.4 Aerotoleranz und Stabilität der Dehalogenase-Aktivität.....	36
3.2.5 pH-Optimum und thermische Stabilität.....	37
3.2.6 Wirkung von Stabilisatoren auf die Dehalogenase-Aktivität.....	39
3.2.7 Hemmung der Dehalogenase-Aktivität durch Alkyljodide	39
3.2.8 Dechlorierung verschiedener Chlorbenzolkongenere	40
3.2.9 Tests mit Stamm FL2.....	46

3.2.10 Photometrische Bestimmung der Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCB und TCA.....	46
3.3 Aufreinigung der Dehalogenase-Aktivität	49
3.3.1 Quantifizierung von CBDB1-Protein.....	49
3.3.2 Lokalisierung der Dehalogenase-Aktivität.....	50
3.3.3 Direkte Solubilisierung der TCB-Dehalogenase-Aktivität aus intakten Zellen	51
3.3.4 Säulenchromatographie	53
3.4 Aufreinigung der Dehalogenase-Aktivität durch native PAGE	54
3.4.1 Native TDC-PAGE.....	54
3.4.1.1 Aufreinigung der 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität	54
3.4.1.2 Dechlorierung verschiedener Chlorbenzolkongenere durch TDC-Gelfragmente	56
3.4.1.3 Massenspektrometrische Analyse des Proteins	57
3.4.2 Native PAGE nach Schägger und von Jagow	59
3.4.3 Native isoelektrische Fokussierung.....	59
3.5 Detektion und Analyse Dehalogenase-homologer Gene in <i>Dehalococcoides</i>-Stämmen.....	60
3.5.1 Blast-Suche nach RDH-Genen im Genom von <i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	60
3.5.2 Amplifikation von RDH-Genen aus Stamm CBDB1 und Stamm FL2	60
3.5.3 Sequenzanalyse der RDH-Gene.....	62
3.5.3.1 Vergleich mit anderen Sequenzen aus der Datenbank	62
3.5.3.2 Phylogenetische Analyse.....	64
3.5.4 Bindungsmotive von Eisen-Schwefel-Clustern	66
3.5.5 Consensussequenzen zur Cobalaminbindung	67
3.5.6 N-terminale Region der RDH-Gene	68
3.5.7 orfB-Sequenzen.....	68
3.5.8 Theoretische Verteilung der RDH-Genprodukte im zweidimensionalen Gel.....	71
3.6 Untersuchungen zur Aufreinigung von Dehalogenasen über B-Protein/Dehalogenase-Interaktion	72
4. Diskussion	74
4.1 Zellfreie Dehalogenase-Aktivität mit 1,2,3-TCB und hochchlorierten Benzolen als Elektronenakzeptoren	74
4.2 Unterschiede in der Nutzung chlorierter Elektronenakzeptoren durch verschiedene <i>Dehalococcoides</i>-Stämme	74
4.3 Hinweise für die Beteiligung von Cob(I)alamin	77
4.3.1 Elektronendonoren	77

4.3.2 Lichtreversible Hemmung	78
4.3.3 TCA-Dechlorierung durch Stamm CBDB1	78
4.4 Lokalisierung der TCB-Dehalogenase und Elektronentransport.....	79
4.5 Methoden zur Reinigung der Chlorbenzol-Dehalogenase-Aktivität bei limitierten Proteinmengen.....	81
4.5.1 Native Gelelektrophorese-Systeme.....	82
4.5.2 Interaktion Dehalogenase/B-Protein.....	84
4.6 RDH-Gene in <i>Dehalococcoides</i>.....	85
4.6.1 Sequenzeigenschaften von RDH-Genen	85
4.6.2 Zur Phylogenie der reduktiven Dehalogenasen	86
4.6.3 Stammspezifische Unterschiede: RDH-Gene und Dechlorierungs- aktivitäten in <i>Dehalococcoides</i>	88
4.6.4 Funktionelle Domänen in RDH-Genen.....	89
4.7 Ausblick.....	92
4.7.1 Identifizierung der Chlorbenzol-Dehalogenase	92
4.7.2 Detektion von Dechlorierungspotentialen in der Umwelt	93
5. Zusammenfassung.....	95
6. Summary	97
7. Literaturverzeichnis	98
Abbildungsverzeichnis	114
Tabellenverzeichnis	116
Abkürzungen.....	117
Danksagung	118

1. EINLEITUNG

1.1 Vorkommen und Eigenschaften von Chlorbenzolen

Chlorierte Benzole sind hoch persistente Schadstoffe, die in allen Umweltkompartimenten anzufinden sind und ein bedeutendes Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen (29, 115, 123). Seit Mitte des letzten Jahrhunderts werden Chlorbenzole industriell hergestellt und finden bzw. fanden unter anderem Anwendung als Weichmacher für Kunststoffe, Stabilisatoren in der Farben- und Kunststoffindustrie, elektrische Isolierungen und Geruchstoffe (28, 59, 123). Seit den Achtziger Jahren ist eine Abnahme der Produktion von Chlorbenzolen festzustellen. So wurden Herstellung und Verwendung von Hexachlorbenzol (HCB) als Fungizid in vielen Ländern verboten (5, 59). Seit jüngerer Zeit werden Chlorbenzole vornehmlich als Ausgangsstoffe für die Herstellung anderer organischer Verbindungen wie z.B. Pestiziden produziert. Chlorbenzole fallen außerdem als unerwünschte Nebenprodukte in der chemischen Industrie an (59). Herstellung und Einsatz z.B. in der Landwirtschaft führten dazu, dass erhebliche Mengen an Chlorbenzolen in die Umwelt gelangten. Das natürliche Vorkommen von Chlorbenzolen ist im Vergleich zur industriellen Herstellung zu vernachlässigen (59). Während andere Chloraromaten wie Chlorphenole von verschiedenen Organismen gebildet werden, sind nur wenige Beispiele für eine natürliche Synthese anderer monozyklischer Aromaten bekannt (35). In einem Übersichtsartikel zur natürlichen Produktion chlorierter Verbindungen wird in Bezug auf Chlorbenzole lediglich der Nachweis von 1,2,3,4-Tetrachlorbenzol (TeCB) in einer Salzwiesenpflanze angeführt (35).

Chlorbenzole zeichnen sich durch eine geringe Reaktivität und biologische Abbaubarkeit aus. Die Wasserlöslichkeit von Chlorbenzolen ist sehr niedrig; sie liegt im Bereich von einigen hundert μM für Dichlorbenzole (DCBs) und nimmt mit zunehmendem Chlorierungsgrad bis auf Werte um $1 \mu\text{M}$ für Pentachlorbenzol (PeCB) und HCB ab (46). Aufgrund ihrer Lipophilie reichern sich Chlorbenzole im Gewebe von Organismen an, was zu einer Akkumulation innerhalb von Nahrungsketten und damit auch zu einer Exposition des Menschen führt. Eine Aufnahme von Chlorbenzolen kann auch über die Haut

oder die Atmungsorgane stattfinden (5). Chlorbenzole werden im Körper sehr langsam metabolisiert; sie können oxidativ über Cytochrom-Monooxygenasen oder durch Glutathion-Konjugation umgesetzt werden (59, 123). Hochchlorierte Benzole wie HCB, PeCB und Trichlorbenzol (TCB) werden als gesundheitsgefährdende Substanzen hoher Priorität eingestuft (29, 59, 115). Die akute Toxizität von Chlorbenzolen ist bei Kongeneren mit niedrigerem Chlorierungsgrad generell höher. Dagegen lässt sich in Bezug auf chronische Effekte wie z.B. Schädigungen von Leber oder Nervensystem eine Zunahme mit zunehmendem Chlorierungsgrad feststellen (123). Für HCB und 1,4-DCB konnte eine karzinogene Wirkung in Tierversuchen nachgewiesen werden (5, 19); andere Kongenere wie TeCB und PeCB stehen ebenfalls im Verdacht, karzinogen zu sein (88).

1.2 Mikrobielle Dechlorierung von Chlorbenzolen

1.2.1 Aerobe Dechlorierung

Mikroorganismen, die in der Lage sind, chlorierte organische Verbindungen abzubauen, sind für die Entwicklung von Maßnahmen zur Sanierung kontaminierter Standorte von großem Interesse. Unter aeroben Bedingungen können Chlorbenzolkongenere mit bis zu vier Chlorsubstituenten oxidativ abgebaut werden. Einige Bakterien, speziell *Pseudomonas* und verwandte Gattungen, sind in der Lage, chlorierte Benzole als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zum Wachstum zu nutzen. Eine metabolische Umsetzung konnte bisher für Monochlorbenzol (MCB), alle DCB-Isomere, 1,2,4-TCB, 1,2,3,4-TeCB und 1,2,4,5-TeCB gezeigt werden (89, 116). Die Abbauewege sind weitgehend bekannt und ähneln denen von nichthalogenierten Aromaten. Schlüsselenzyme sind eisenhaltige Dioxygenasen, die den ersten oxidativen Angriff auf den aromatischen Ring katalysieren. Chlorsubstituenten werden meist spontan oder enzymatisch nach Ringspaltung vom aliphatischen Kohlenstoffgerüst abgespalten (92, 116). Die Dioxygenierung des Benzolrings kann aber auch direkt mit der Elimination eines Chlorsubstituenten verbunden sein (10). Einige ligninolytische Pilze sind ebenfalls in der Lage, MCB und DCBs aerob abzubauen, allerdings wurden hier bisher nur cometabolische Reaktionen beschrieben (92, 126).

Die Abbaubarkeit von Chlorbenzolen nimmt unter aeroben Bedingungen mit zunehmendem Chlorierungsgrad ab, da der elektrophile Angriff auf den Benzolring durch die elektronenziehenden Eigenschaften der Chlorsubstituenten erschwert wird (112). Ein aerober Abbau von HCB, PeCB, 1,2,3,5-TeCB und 1,3,5-TCB durch natürlich vorkommende Mikroorganismen konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Die Oxidation von hochchlorierten Benzolen einschließlich PeCB und HCB gelang jedoch vor kurzem mit Hilfe einer durch gerichtete Mutagenese genetisch veränderten Monooxygenase von *Pseudomonas putida* (21).

1.2.2 Anaerobe reduktive Dechlorierung

Die einzige bekannte Möglichkeit zur natürlichen Transformation von hochchlorierten Benzolen stellt die reduktive Dechlorierung zu niedriger chlorierten Benzolen unter anaeroben Bedingungen dar (4). Bei der reduktiven Dechlorierung werden unter Abspaltung eines Chlorsubstituenten zwei Elektronen auf das Molekül übertragen. Während für aliphatische Chlorverbindungen auch die Dihaloelimination als Dechlorierungsmechanismus beschrieben wurde, bei der eine gleichzeitige Elimination von zwei vicinalen Chlorsubstituenten stattfindet, folgen reduktive Dechlorierungsreaktionen an Chloraromaten allgemein dem Mechanismus der Hydrogenolyse, bei dem der Chlorsubstituent durch ein Wasserstoffatom ersetzt wird. Generell ist zwischen einer cometabolischen Reaktion, die durch niedrige Dechlorierungsraten und den Bedarf weiterer als Energiequelle benötigter Substrate charakterisiert ist, und einer metabolischen Umsetzung, die mit einem Energiegewinn für den betreffenden Organismus verbunden ist, zu unterscheiden (4). Cometabolische Umsetzungen sind eher für chloraliphatische Verbindungen charakteristisch; sie werden meist von cofaktorhaltigen respiratorischen Enzymen katalysiert (32). Metallhaltige Tetrapyrrole wie Cobalamin sind jedoch auch in der Lage, Chlorbenzole reduktiv zu dechlorieren (33). Dem gegenüber steht die metabolische reduktive Dechlorierung, die in spezifischen *Batch*-Kulturen zu einer Transformation von Chlorbenzolen mit hoher Rate führt und mit mikrobiellem Wachstum verbunden ist. Eine reduktive Dechlorierung von Chlorbenzolen konnte in verschiedenen anaeroben Mischkulturen beobachtet werden, die aus Böden, Sedimenten oder Klärschlämmen angereichert wurden

(4). Über Ausmaß und Bedeutung einer in natürlichen Standorten ablaufenden reduktiven Dechlorierung von Chlorbenzolen ist bisher relativ wenig bekannt. Vergleiche zwischen kontaminierten Sedimenten unterschiedlichen Alters liefern Hinweise darauf, dass einerseits ein Abbau hochchlorierter Benzole stattfinden kann, andererseits Faktoren wie Adsorption an Bodenpartikel oder niedrige Temperaturen einem mikrobiellen Abbau entgegenstehen (4).

Da bei der reduktiven Dechlorierung ein nukleophiler Angriff auf den aromatischen Ring erfolgt, eignen sich höher chlorierte Substrate aufgrund der geringeren Elektronendichte am aromatischen Ring generell besser als Substrate als Benzole mit niedrigem Chlorierungsgrad. HCB, PeCB, alle TeCB-, TCB- und DCB-Isomere werden reduktiv dechloriert; für MCB ist bisher nur eine reduktive Dechlorierung mit sehr niedriger Rate nachgewiesen (4, 86). Eine Kombination von aeroben und anaeroben Verfahren wurde vorgeschlagen, um eine komplette Mineralisierung und damit Detoxifizierung hochchlorierter Benzole zu erreichen (30).

1.3 Dehalorespiration

Eine effektive und hoch spezifische reduktive Dehalogenierung wird von anaeroben Bakterien durchgeführt, die in der Lage sind, chlorierte organische Verbindungen als metabolische Elektronenakzeptoren zu nutzen. Die Kopplung der Dehalogenierungsreaktion an eine Gewinnung von Energie über Elektronentransportphosphorylierung wird als Dehalorespiration, Halorespiration oder Chlororespiration bezeichnet (47, 63, 107). Dehalorespiration konnte bisher mit verschiedenen chlororganischen Verbindungen wie z.B. Chlorethenen, Chlorbenzoaten, Chlorphenolen oder Chlorbenzolen gezeigt werden. Chlororganische Verbindungen besitzen ein Redoxpotential im Bereich von +260 und +480 mV und eignen sich somit aus thermodynamischer Sicht gut als Elektronenakzeptoren. Die reduktive Dechlorierung von Chlorbenzolen mit Wasserstoff als Elektronendonator ist unter umweltrelevanten Bedingungen (pH 7, 25°C) mit einer Änderung der freien Enthalpie G_o' von -171,4 kJ (HCB) bis -139,6 kJ (MCB) pro Mol freigesetztes Chlorid verbunden (26), was dem Energiegewinn bei einer Reduktion von Nitrat zu Nitrit mit Wasserstoff als Elektronendonator entspricht.

Im vergangenen Jahrzehnt ist die Anzahl von in Reinkultur verfügbaren anaeroben Bakterien, die chlorierte aromatische oder aliphatische Verbindungen als terminale Elektronenakzeptoren nutzen können, rasch angestiegen. Die Fähigkeit zur Dehalorespiration ist über viele verschiedene phylogenetische Gruppen der *Bacteria* verbreitet (Abb. 1). Bisherige Isolate stammen aus der δ - oder ϵ -Untergruppe der *Proteobacteria* (z.B. *Desulfomonile*, *Sulfurospirillum*), den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (z.B. *Desulfitobacterium*, *Dehalobacter*) oder den *Chloroflexi* bzw. „Grünen schwefelfreien Bakterien“ (*Dehalococcoides*). Der Nachweis einer Energiegewinnung über Dehalorespiration wurde erstmalig für *Desulfomonile tiedjei* erbracht (25, 77), einem Bakterium, das mit Wasserstoff als Elektronendonator und 3-Chlorbenzoat als Elektronenakzeptor wachsen kann. *Sulfurospirillum multivorans* (früher *Dehalospirillum multivorans*; [66]) nutzt chlorierte Ethene als Elektronenakzeptoren. Die Gattung *Desulfitobacterium* umfasst eine große Anzahl von Spezies, die chlorierte Ethene, Ethane und Phenole dechlorieren können. Ebenso wie *Desulfomonile tiedjei* und *Sulfurospirillum multivorans* zeichnen sich *Desulfitobacterium* spp. durch ein eher weites Spektrum an verwertbaren Elektronendonoren und Elektronenakzeptoren aus. Formiat oder Pyruvat dienen neben Wasserstoff als Elektronendonoren. *Desulfitobacterium dehalogenans* kann außer Chlorphenolen auch Fumarat, Nitrat oder Sulfid als Elektronenakzeptoren für eine anaerobe Respiration nutzen (67). Dagegen handelt es sich bei *Dehalococcoides* um eine hoch spezialisierte Gruppe von Bakterien, für die bisher ausschließlich ein Wachstum durch Dehalorespiration mit Wasserstoff als Elektronendonator beschrieben wurde. Die *Dehalococcoides*-Gruppe bildet einen separaten Cluster, der phylogenetisch weit entfernt von allen anderen reduktiv dechlorierenden Bakterien angesiedelt ist (Abb. 1; [3, 71]). Bisher sind vier Stämme in Reinkultur verfügbar. *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 (71), *Dehalococcoides* sp. Stamm FL2 (62, 63) und *Dehalococcoides* sp. Stamm BAV1 (39) wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, chlorierte Ethene als Elektronenakzeptoren zu nutzen, isoliert, wohingegen *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 chlorierte Benzole zum Wachstum nutzt (3). *Dehalococcoides* sp. Stamm VS (23) sowie zwei *Dehalococcoides*-ähnliche Stämme (24, 124) wurden in hoch angereicherten Mischkulturen charakterisiert.

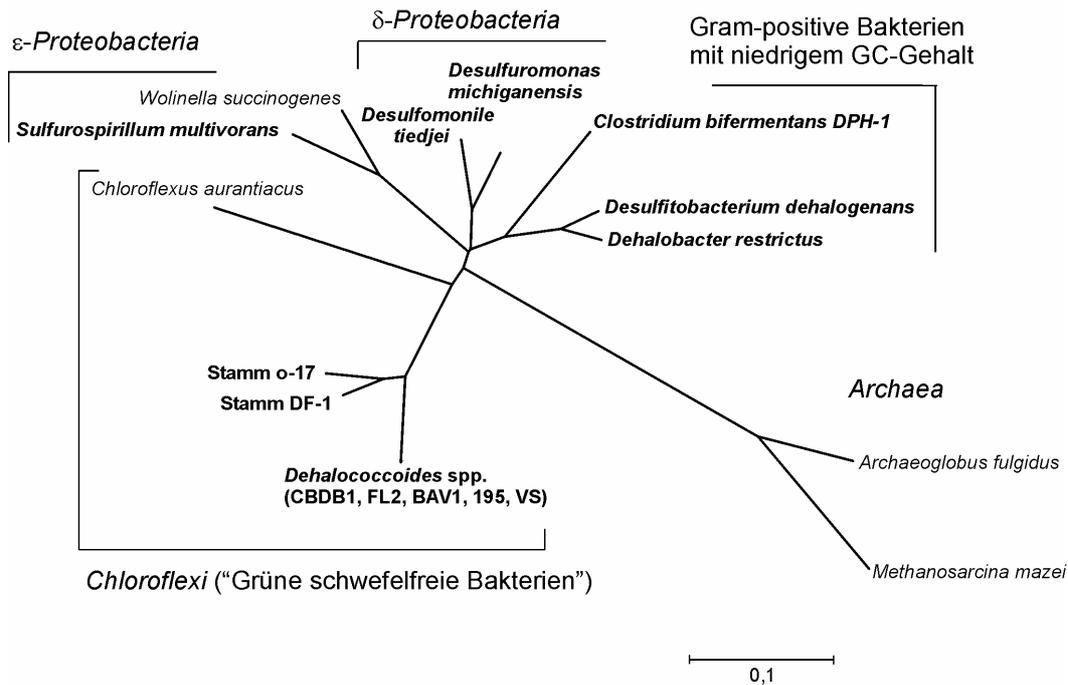


Abb. 1. Phylogenetische Einordnung von Dehalorespiration betreibenden Bakterien (fett gedruckt) entsprechend der 16S rRNA-Sequenzen. Der Maßstab entspricht 10% Sequenzunterschied.

1.4 *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1

Dehalococcoides sp. Stamm CBDB1 (Abb. 2) stellt das erste in Reinkultur gewonnene Bakterium dar, das chlorierte Benzole als terminale Elektronenakzeptoren zur Energiegewinnung nutzen kann (3). Stamm CBDB1 wurde aus einem hochangereicherten TCB dechlorierenden Konsortium isoliert, das einem mit Schlamm aus der Saale beimpften Wirbelbettreaktor entstammt (2, 3). Es handelt sich um ein strikt anaerobes Bakterium, das in einem vollständig definierten Medium mit TCB als Elektronenakzeptor, Wasserstoff als Elektronendonator und Acetat als Kohlenstoffquelle wächst. In Kultur werden 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB reduktiv zu 1,3-DCB und 1,4-DCB dechloriert (Abb. 3). Fermentierbare Substrate wie Zucker, Citrat oder Succinat werden von Stamm CBDB1 nicht verwertet. Ein Zusatz von Vitamin B₁₂ ist für das Wachstum notwendig. In Kulturen von CBDB1 werden bisher nur geringe Zelldichten erreicht. Eine Erhöhung der Zellzahlen von 10⁶/ml auf bis zu 10⁷/ml gelang durch Kultivierung in einem Zweiflüssigphasen-System mit einer 1,2,3-TCB enthaltenden Hexadecanphase, aus der TCB kontinuierlich in das Medium nachdiffundieren kann und die das entstehende 1,3-DCB aus dem Medium

entfernt (3). Wie auch die anderen Vertreter der *Dehalococcoides*-Gruppe ist Stamm CBDB1 durch eine ungewöhnliche Zelloberfläche gekennzeichnet. Diese weist anstelle einer typischen Zellwand eine *S-layer*-ähnliche Struktur auf. Stamm CBDB1 besitzt eine hohe Resistenz gegen die Antibiotika Vancomycin und Ampicillin, die mit der Zellwandsynthese interferieren (3).

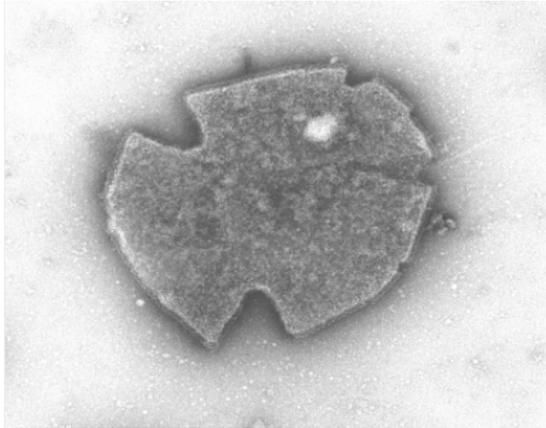


Abb. 2. Elektronenmikroskopisches Bild von Stamm CBDB1 (Adrian *et al.* [3]; Bild: J. Wecke, Robert-Koch-Institut Berlin).

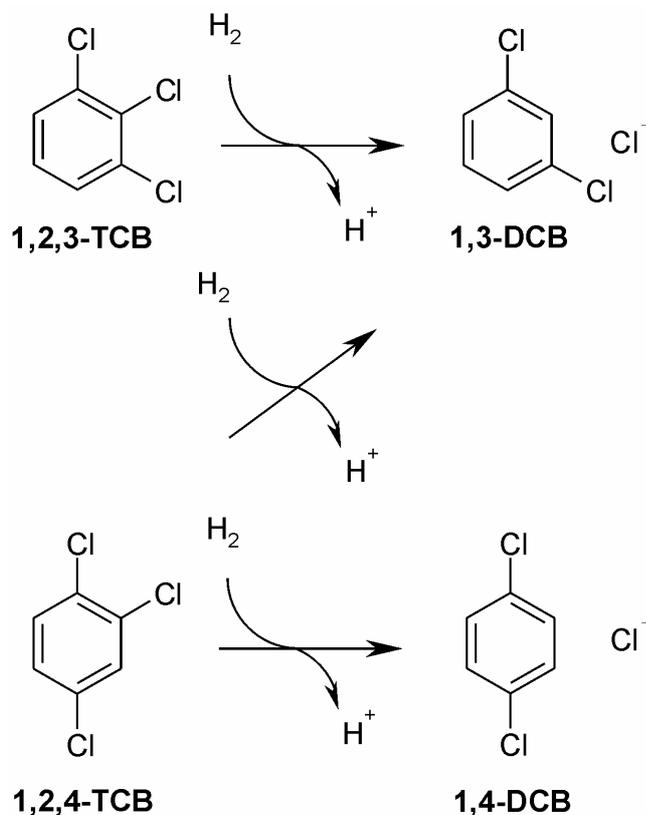


Abb. 3. Reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB durch Stamm CBDB1.

1.5 Reduktive Dehalogenasen

1.5.1 Biochemie der reduktiven Dehalogenasen

Schlüsselenzyme des respiratorischen Elektronentransports in Bakterien mit der Fähigkeit zur Dehalorespiration sind die reduktiven Dehalogenasen. Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurden reduktive Dehalogenasen, die chlorierte Ethene, Phenole oder Benzoate reduktiv dechlorieren, aus verschiedenen anaeroben Bakterien isoliert (Tabelle 1). Die erste isolierte reduktive Dehalogenase ist die 3-Chlorbenzoat-Dehalogenase aus *Desulfomonile tiedjei* (84). PCE-Dehalogenasen wurden in *Sulfurospirillum multivorans* (81), *Dehalobacter restrictus* (102) und *Desulfitobacterium* spp. (76, 111) identifiziert; sie katalysieren die reduktive Dechlorierung von Tetrachlorethen (PCE) über Trichlorethen (TCE) zu *cis*-Dichlorethen (DCE). Andere halogenaliphatische Verbindungen wie chlorierte Propene oder Ethane dienen zum Teil ebenfalls als Substrate für die PCE-Dehalogenasen (70, 82, 111). Chlorphenol-Dehalogenasen wurden aus verschiedenen *Desulfitobacterium* spp. isoliert. Die *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenasen von *Desulfitobacterium dehalogenans* (117) und *Desulfitobacterium chlororespirans* (55) katalysieren die *ortho*-Dechlorierung von 3-Chlor-4-hydroxyphenylacetat und verschiedenen Chlorphenolen.

Aufgrund der geringen Zellerträge in *Dehalococcoides*-Kulturen ist die Isolierung katalytisch aktiver Dehalogenasen aus *Dehalococcoides*-Stämmen sehr schwierig (43, 68). Die TCE-Dehalogenase und die PCE-Dehalogenase von Stamm 195 konnten jedoch aus einer Mischkultur über semipräparative Methoden isoliert werden, wodurch eine initiale Charakterisierung dieser interessanten Enzyme möglich wurde (68). Beide Enzyme zusammen katalysieren die komplette Detoxifizierung von PCE zu Ethen; die PCE-Dehalogenase dechloriert PCE zu TCE, während die TCE-Dehalogenase TCE über *cis*-DCE und Vinylchlorid (VC) zu Ethen dechloriert (68).

Fast alle bekannten reduktiven Dehalogenasen sind mehr oder weniger stark mit der Cytoplasmamembran assoziiert. Ausnahmen bilden die PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans*, die im Cytoplasma lokalisiert wurde (81), sowie die PCE-Dehalogenase von *Desulfitobacterium* sp. Stamm

Y51, die als prozessiertes Protein offenbar im Periplasma vorliegt (111). Biochemische Analysen ergaben, dass mit Ausnahme der 3-Chlorbenzoat-Dehalogenase von *Desulfomonile tiedjei*, die vermutlich einen Häm-Cofaktor enthält (84), alle reduktiven Dehalogenasen einen Corrinoid-Cofaktor besitzen (22, 55, 70, 76, 82, 102). Vor kurzem wurden reduktive Dehalogenasen als eine von drei B₁₂-abhängigen Enzymklassen neben den Isomerasen und Methyltransferasen beschrieben (9). Die Beteiligung von Cob(I)alamin an der reduktiven Dechlorierung konnte für verschiedene Spezies über eine lichtreversible Hemmung der Dehalogenase-Aktivität mit Alkyljodiden nachgewiesen werden (47, 55, 68, 75, 80). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung des sehr elektronegativen Cob(I)alamins an der Katalyse – das Standard-Redoxpotential von enzymgebundenem Cob(II)alamin/Cob(I)alamin liegt zwischen -350 mV und -600 mV (47) - lieferte auch der Befund, dass in *in vitro*-Versuchen ausschließlich Verbindungen mit einem sehr niedrigen Redoxpotential als Elektronendonoren für die reduktive Dehalogenasen dienten (74, 75, 80).

Offenbar liegen unterschiedliche Corrinoid-Spezies in den reduktiven Dehalogenasen vor. So scheint es sich bei dem spektroskopisch charakterisierten Cofaktor von *Dehalobacter restrictus* um Cobalamin zu handeln (70, 102), wohingegen der kürzlich durch Kristallstrukturanalyse identifizierte Corrinoid-Cofaktor der PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans* ein neuartiges Norpseudovitamin B₁₂ darstellt, das andere katalytische Eigenschaften als Cobalamin aufweist (54). Mit drei Ausnahmen enthalten alle bekannten reduktiven Dehalogenasen zusätzlich zu dem Corrinoid zwei Eisen-Schwefel-Cluster, die vermutlich Elektronen auf das den Corrinoid-Cofaktor enthaltende aktive Zentrum übertragen (81, 117). Die 3-Chlorbenzoat-Dehalogenase von *Desulfomonile tiedjei* (84), die 2,4,6-Trichlorphenol-Dehalogenase von *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 (14) und die PCE-Dehalogenase von *Clostridium bifermentans* DPH-1 (87) scheinen keine Eisen-Schwefel-Cluster zu besitzen und unterscheiden sich strukturell grundsätzlich von anderen reduktiven Dehalogenasen (siehe auch 1.5.2).

Tabelle 1. Eigenschaften reduktiver Dehalogenasen
(modifiziert nach Holliger *et al.*, 1999; Smidt 2001).

Organismus	<i>Desulfotomoniella tiepferi</i>	<i>Desulfotobacterium dehalogenans</i>	<i>Desulfotobacterium chlororespirans</i>	Stamm PCE-S	<i>Sulfurospirillum multivorans</i>	<i>Desulfotobacterium hafniense</i>	<i>Dehalobacter restrictus</i>	Stamm 195	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	<i>Desulfotobacterium frapperi</i> PCP-1
Name	3-Chlorbenzoat-Dehalogenase	<i>ortho</i> -Chlorphenol-Dehalogenase	3-Cl-4-OH-benzoat-Dehalogenase	PCE-Dehalogenase	PCE-Dehalogenase	3-Cl-4-OH-PA-Dehalogenase	PCE-Dehalogenase	PCE-Dehalogenase	TCE-Dehalogenase	2,4,6-Trichlorphenol-Dehalogenase
Substrate ^a	3-Chlorbenzoat	<i>ortho</i> -Chlorphenole, 3-Cl-4-OH-PA	3-Cl-4-OH-PA, <i>ortho</i> -Chlorphenole, <i>ortho</i> -Chlorbenzoate	PCE, TCE	PCE, TCE, Chlorpropene	3-Cl-4-OH-PA	PCE, TCE, Chlorethane, Tetrachlormethan	PCE	TCE, <i>cis</i> -1,2-DCE, 1,2-DCE, 1,2-Dibromethan, 1,2-Dichlorethan	<i>ortho</i> -Chlorphenole, Pentachlorphenol
Größe (SDS-PAGE)	64 & 37 kDa	48 kDa	50 kDa	65 kDa	58 kDa	47 kDa	60 kDa	51 kDa	61 kDa	37 kDa (33,8 kDa ⁹)
Cofaktoren	Häm ^c (Fe/S: n. n.)	1 Cobalamin 1 [3Fe-4S] ₂ 1 [4Fe-4S] ₂ ^d	1 Cobalamin 2 [Fe-S]	1 Cobalamin 8Fe/8S	Norpseudo-B ₁₂ , 8Fe/8S	1 Cobalamin 12Fe/13S	1 Cobalamin 2 [4Fe-4S] ₂ ^d	1 Cobalamin ^e (Fe/S: n. n.)	1 Cobalamin ^e (Fe/S: n. n.)	1 Cobalamin
spezifische Aktivität (nkat/mg) ^b										
• Rohextrakt	2,5 (3-Chlorbenzoat)	2,5 (3-Cl-4-OH-PA)	1,4 (3-Cl-4-OH-benzoat)	4 (PCE)	25 (PCE)	9,1 (3-Cl-4-OH-PA)	10 (PCE)	4,5 ^f (PCE)	8,5 ^f (TCE)	1,9 ^h (2,4,6-Trichlorphenol)
• gereinigtes Enzym	300	167	257	650	2640	103,2	227	342	202	6,3
Literatur	Ni <i>et al.</i> , 1995	van de Pas <i>et al.</i> , 1999	Löffler <i>et al.</i> , 1996; Krasotkina <i>et al.</i> , 2001	Miller <i>et al.</i> , 1998	Neumann <i>et al.</i> , 1996, 2002; Kräutler <i>et al.</i> , 2003	Christiansen <i>et al.</i> , 1998	Schumacher <i>et al.</i> , 1997; Maillard <i>et al.</i> , 2003	Magnuson <i>et al.</i> , 1998	Magnuson <i>et al.</i> , 1998; Magnuson <i>et al.</i> , 2000	Boyer <i>et al.</i> , 2003

^a Substratspektrum nicht vollständig dargestellt

^b mit Methyloviologen als Elektronendonator

^c durch UV-Vis-Spektroskopie ermittelt

^d durch EPR-Spektroskopie nachgewiesen

^e nachgewiesen über lichtreversible Hemmung durch Alkyljodide

^f Membranfraktion

^g Durch Massenspektrometrie bestimmte Größe

^h solubilierte Fraktion

Abkürzungen: 3-Cl-4-OH-PA, 3-Chlor-4-hydroxyphenylacetat; 3-Cl-4-OH-benzoat, 3-Chlor-4-hydroxybenzoat; n. n., im Protein nicht nachgewiesen.

1.5.2 Molekularbiologie der reduktiven Dehalogenasen

Gene, die reduktive Dehalogenasen kodieren, konnten infolge einer (partiellen) Reinigung der dechlorierenden Enzyme und einer N-terminalen Peptidsequenzierung in verschiedenen Spezies identifiziert werden. Beispiele sind die PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans* (83), die PCE-Dehalogenase von *Desulfitobacterium* sp. Stamm Y51 (111), die ortho-Chlorphenol-Dehalogenase von *Desulfitobacterium dehalogenans* (117) und die TCE-Dehalogenase aus Stamm 195 (69). Anhand eines Vergleichs der Sequenzen der identifizierten Dehalogenase-Gene konnten einige konservierte Motive ermittelt und spezifischen Funktionen zugeordnet werden (Abb. 4; siehe Übersichtsartikel [104]). Der offene Leserahmen (*open reading frame*, orf), der die katalytische Untereinheit der Dehalogenase kodiert, als orfA bezeichnet, ist jeweils mit einem zweiten orf, orfB, verbunden. orfB kodiert ein kleines hydrophobes „B-Protein“, das möglicherweise als Membrananker für die Dehalogenase fungiert (83). Bei allen bekannten Chlorethen-Dehalogenasen befindet sich orfB stromabwärts von orfA, wohingegen orfB bei den Chlorphenol-Dehalogenasen von *Desulfitobacterium* stets stromaufwärts von orfA zu finden ist (Abb. 4). Für die kodierenden Gene der PCE-Dehalogenase (*pceA*) von *Sulfurospirillum multivorans* und der Chlorphenol-Dehalogenase (*cprA*) von *Desulfitobacterium dehalogenans* wurde eine Cotranskription von orfA und orfB nachgewiesen (83, 105). Die N-Termini charakterisierter reduktiver Dehalogenasen enthalten eine Twin-Arginin-Signalsequenz, die das Consensusmotiv RRXFVK, gefolgt von einem Abschnitt aus hydrophoben Aminosäureresten, beinhaltet. Solche Signalsequenzen sind an einem Transport von cofaktorhaltigen Proteinen über die cytoplasmatische Membran beteiligt und werden während der Proteinreifung proteolytisch entfernt (13). Zwei Bindungsmotive von Eisen-Schwefel-Clustern, die für bakterielle Ferredoxine charakteristisch sind (16), befinden sich in der Nähe des C-terminalen Endes der Dehalogenasen. Weiterhin enthalten reduktive Dehalogenasen hochkonservierte Tryptophan- und Histidin-Reste, die möglicherweise an der Katalyse beteiligt sind (104); andere konservierte Motive mit bisher unbekannter Funktion (91) wurden ebenfalls gefunden. Obwohl fast alle reduktiven Dehalogenasen offenbar Corrinoid-Cofaktoren besitzen, wurden bisher noch keine Consensus-Sequenzen für die Bindung von Corrinoiden in

den kodierenden Genen beschrieben (70, 83, 111, 117). Die Gene der oben erwähnten 2,4,6-Trichlorphenol-Dehalogenase von *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 (14) und der PCE-Dehalogenase von *Clostridium bifermentans* DPH-1 (87) weisen keinerlei Sequenzverwandtschaft mit der beschriebenen Gruppe von Dehalogenase-Genen auf und zeigen auch keine Ähnlichkeit zueinander. Die N-termini beider Gene enthalten Signalsequenzen, allerdings nicht vom Twin-Arginin-Typ (14, 87). Das Gen der 3-Chlorbenzoat-Dehalogenase von *Desulfomonile tiedjei* (84) wurde bisher nicht beschrieben.

In der letzten Zeit sind zahlreiche neue Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu bekannten Dehalogenase-Genen (reduktive Dehalogenase-homologe Gene, RDH-Gene) aus verschiedenen Reinkulturen, Mischkulturen oder Umweltproben über PCR amplifiziert worden (z.B. 93, 106, 121). Der Zugang zu kompletten Genomsequenzdaten von *Desulfitobacterium hafniense* (<http://www.jgi.doe.gov/>) und *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>) ermöglichte eine systematische Suche nach RDH-Genen. Zusätzlich zu dem Gen, das die biochemisch charakterisierte *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase (22) kodiert, wurden sechs RDH-Gene im Genom von *Desulfitobacterium hafniense* gefunden (119). Im Genom von Stamm 195 wurden neben dem die TCE-Dehalogenase kodierenden *tceA*-Gen 17 verschiedene RDH-Gene identifiziert, die ebenfalls alle Dehalogenase-spezifischen Charakteristika besitzen (107, 119).

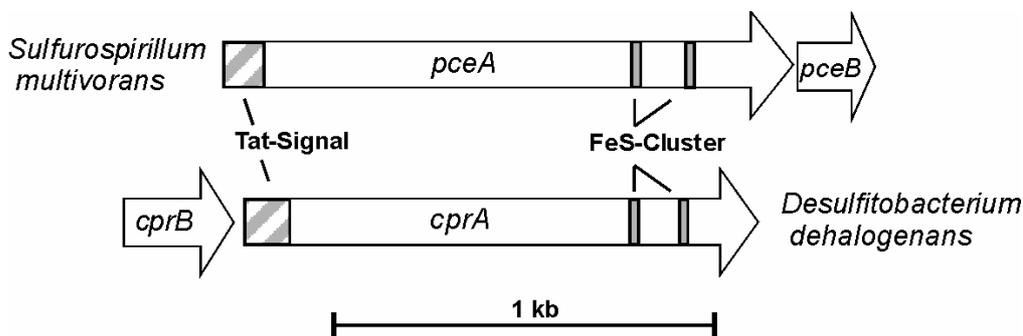


Abb. 4. Organisation der Dehalogenase-Operons von *Sulfurospirillum multivorans* und *Desulfitobacterium dehalogenans* (Abbildung modifiziert nach Smidt [106]). *pceA*, PCE-Dehalogenase-Gen (mit korrespondierendem orfB-Gen *pceB*); *cprA*, Chlorphenol-Dehalogenase-Gen (mit korrespondierendem orfB-Gen *cprB*); Tat-Signal, Twin-Arginin-Signalsequenz; FeS-Cluster, Bindungsmotive von Eisenschwefel-Clustern (siehe Text für weitere Erläuterungen).

1.5.3 Elektronentransport

Die meisten Bakterien mit der Fähigkeit zur Dehalorespiration können Wasserstoff als Elektronendonator nutzen. Hydrogenasen, die an der Außenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert sind, wurden in verschiedenen Dechlorierern charakterisiert (siehe z.B. [75]). Die durch Wasserstoffspaltung an der Hydrogenase freigesetzten Elektronen können über bisher noch nicht identifizierte Elektronencarrier entlang der Membran transportiert und auf eine membranassoziierte reduktive Dehalogenase übertragen werden, die die reduktive Dechlorierung chlorierter Elektronenakzeptoren katalysiert. In einem respiratorischen Prozess ist dieser Vorgang mit der Ausbildung eines chemiosmotischen Gradienten und einer dadurch angetriebenen ATP-Synthese verbunden (47). Für *Dehalobacter restrictus* und *Desulfomonile tiedjei* gibt es Hinweise, dass Chinone bei der Dehalorespiration als Elektronenmediatoren fungieren (64, 101). Dagegen muss eine Beteiligung von Chinonen am Elektronentransport in *Sulfurospirillum multivorans* und *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 angezweifelt werden (74, 85). Cytochrome als weitere Klasse potentieller Elektronencarrier wurden in verschiedenen Spezies identifiziert (47), eine Beteiligung an der Dehalorespiration ist bisher jedoch nicht nachgewiesen.

Für die Dechlorierungsreaktion wurde ein Radikalmechanismus vorgeschlagen. In einem Dechlorierungsmodell, das für die PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans* entworfen wurde (47), reagiert PCE unter Abspaltung eines Chloridions mit Cob(I)alamin, wobei ein Alkylradikal sowie Cob(II)alamin entstehen, die ein Addukt bilden (Alkylcob(III)alamin). Nach Freisetzung des dechlorierten Produkts entsteht Cob(III)alamin, das durch zwei einzelne Elektronentransfers über jeweils einen moderat elektronegativen und eine stark elektronegativen Eisen-Schwefel-Cluster zu Cob(I)alamin reduziert wird. Basierend auf dem Befund, dass nach einer Oxidation der PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans* und der Chlorphenol-Dehalogenase von *Desulfitobacterium dehalogenans* Cob(III)alamin nicht nachweisbar war, wurde für die Chlorphenol-Dehalogenase von *Desulfitobacterium dehalogenans* ein abweichender Reaktionsmechanismus vorgeschlagen. Hiernach bildet das dechlorierte Arylradikal kein Addukt mit Cob(II)alamin aus; hingegen wird das zweite für die Reduktion des Substrats

benötigte Elektron direkt von dem Eisen-Schwefel-Cluster mit moderatem Redoxpotential auf das Substrat übertragen. Der zweite stark elektronegative Eisen-Schwefel-Cluster reduziert anschließend Cob(II)alamin zu Cob(I)alamin (106, 117).

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung der reduktiven Chlorbenzol-Dehalogenase aus dem anaeroben Bakterium *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1. Über die Biochemie und Genetik der Dehalorespiration mit Chlorbenzolen lagen zu Beginn der Arbeit keinerlei Veröffentlichungen vor. Da in den meisten bisher charakterisierten reduktiven Chlorethen- und Chlorphenol-Dehalogenasen Corrinnoide und Eisen-Schwefel-Cluster nachgewiesen wurden, sollte insbesondere untersucht werden, ob die Chlorbenzol-Dehalogenase diese Cofaktoren ebenfalls besitzt. Zunächst sollte ein sensitiver *in vitro* Test zur Bestimmung der Chlorbenzol-Dehalogenase-Aktivität etabliert werden. Für die Aufreinigung der Dehalogenase sollten aufgrund des geringen Wachstums der Kulturen von Stamm CBDB1 (10^7 Zellen/ml; Proteingehalt unterhalb 1 mg/l) Trennmethoden erarbeitet werden, die mit niedrigen Proteinmengen funktionieren. Parallel sollte versucht werden, das die Chlorbenzol-Dehalogenase kodierende Gen in Stamm CBDB1 nachzuweisen. Es sollte untersucht werden, ob die Genome aller *Dehalococcoides*-Stämme ähnlich wie das Genom von *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 multiple RDH-Gene enthalten, die dem individuellen Spektrum der von den einzelnen Stämmen genutzten chlorierten Elektronenakzeptoren entsprechen. Daher war ein weiteres Ziel der Untersuchungen, RDH-Gene aus Stamm CBDB1 und anderen *Dehalococcoides*-Stämmen über PCR-Amplifikation nachzuweisen und zu vergleichen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Gase

Alle Lösungen wurden mit MilliQ-Wasser hergestellt. Chlorbenzole wurden von Merck-Schuchard (Hohenbrunn), Aldrich (Steinheim), Riedel-de Haën (Seelze) oder Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Viologene und Anthrachinon-2,6-disulfonsäure (AQDS) stammten von Aldrich. Lösungsmittel wurden von Roth (Karlsruhe) und Merck-Schuchard bezogen. Alkyljodide stammten von Acros (Nidderau) und Aldrich. Puffer und andere Chemikalien waren von AppliChem (Darmstadt), Fluka und Merck-Schuchard. Die verwendeten Gase besaßen eine Reinheit von 99,999% (N₂, H₂) oder 99,8% (CO₂) und stammten von Messer-Griesheim (Berlin).

2.2 Anaerobe Kultivierung

2.2.1 Verwendete *Dehalococcoides*-Stämme

Reinkulturen von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 mit TCB als Elektronenakzeptor (3) standen im Labor zur Verfügung und wurden als Inokulum verwendet. Reinkulturen von *Dehalococcoides* sp. Stamm FL2 mit TCE als Elektronenakzeptor (62, 63) wurden von F. E. Löffler (Atlanta, USA) bezogen.

2.2.2 Herstellung des Mediums

Zur Kultivierung von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 wurde ein Bicarbonat-gepuffertes Mineralmedium eingesetzt. Die Herstellung des Mediums erfolgte grundsätzlich wie von Adrian 1999 (2) beschrieben; einige Vitamine sowie die Spurenelemente Wolframat und Selenit wurden wegen fehlender wachstumsfördernder Wirkung (2) nicht mehr eingesetzt (Tabelle 2). Das synthetische Mineralmedium enthielt eine Mischung von Vitaminen einschließlich 50 ng/l Vitamin B₁₂, Spurenelemente, 5 mM Acetat als Kohlenstoffquelle, 0,5 mg/l Resazurin als Redoxindikator sowie Chlorbenzole oder Chlorphenole als Elektronenakzeptoren (siehe 2.2.3, 2.2.4, 2.2.5). Als Reduktionsmittel wurde Titan(III)citrat eingesetzt. Die Herstellung der 0,1 M

Stammlösung von Titan(III)citrat (alle für Titan(III)citrat angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Konzentration von Ti(III)) erfolgte grundsätzlich wie von Zehnder und Wuhrmann (128) beschrieben; abweichend wurde kristallines Natriumcarbonat zur Neutralisation der Lösung benutzt (2).

Tabelle 2. Bestandteile des Mediums zur Kultivierung von Stamm CBDB1 (Adrian [2]).

Puffersystem	$\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$
Kohlenstoffquelle	Acetat
Elektronendonator	H_2
Elektronenakzeptoren	Chlorbenzole (Chlorphenole)
Mineralsalze	KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KCl , NH_4Cl , MgCl_2 , CaCl_2
Spurenelemente	Fe, B, Co, Cu, Ni, Mn, Mo, Zn
Vitamine	Cyanocobalamin, 4-Aminobenzoat, D(+)-Biotin, Ca-D(+)-pantothenat, Pyridoxol-hydrochlorid, Thiaminchloridhydrochlorid, Nicotinsäure
Reduktionsmittel	Titan(III)citrat
Redoxindikator	Resazurin

2.2.3 Kultivierung mit TCB

Für die Kultivierung mit TCBs wurde Medium eingesetzt, das je etwa 15 μM 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB enthielt. TCBs wurden als äquimolare Lösung von 1,2,3-TCB (kristallin) in 1,2,4-TCB (flüssig) über Nacht eingerührt (1). *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 wurde unter strikt anaeroben Bedingungen kultiviert. Für Ansätze mit 30 ml bzw. 60 ml Medium wurden 60 ml- bzw. 120 ml-Serumflaschen verwendet, die mit Teflon-beschichteten Butylgummisepten (Ochs Laborbedarf, Bovenden) und Aluminiumkappen verschlossen wurden. Die Kultivierung in 250 ml bzw. 500 ml Medium erfolgte in 500 ml- bzw. 1000 ml-Schottflaschen, die mit Teflon-beschichteten Gummisepten (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) und Schraubverschlüssen verschlossen wurden. Das Medium wurde durch 0,8-1,5 mM Titan(III)citrat reduziert. Die Gasphase wurde gegen ein N_2/CO_2 -Gemisch (80%/20%) ausgetauscht und Wasserstoff in einem Volumen von 8%

der Gasphase zugegeben. Das Medium wurde mit 1% Kultursuspension inokuliert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte statisch im Dunkeln bei 29°C. Zwei Wochen nach Inokulation wurden die Kulturen zusätzlich mit 10 mM 1,2,3-TCB (nominelle Konzentration) in Form einer Hexadecanphase überschichtet (3, 46).

2.2.4 Kultivierung mit 1,2,3,4-TeCB und PeCB

Für die Kultivierung mit 1,2,3,4-TeCB oder PeCB wurde chlorbenzolfreies Medium eingesetzt, dem vor Verschließen der Kulturgefäße die entsprechenden Chlorbenzole in kristalliner Form zugesetzt wurden, wie von Jayachandran *et al.* (48) beschrieben.

2.2.5 Kultivierung mit 2,3-Dichlorphenol

Für die Kultivierung mit 2,3-Dichlorphenol (DCP) wurde chlorbenzolfreies Medium eingesetzt, dem vor der Inokulation 20 µM 2,3-DCP aus einer 10 mM-Stammlösung in Wasser zugegeben wurde. Als Inokulum diente 1% Kultursuspension aus mit 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB als Elektronenakzeptoren gewachsenen Kulturen.

2.2.6 Kultivierungsversuche mit Stamm FL2

60 ml-Serumflaschen mit 30 ml Stamm FL2-Standardmedium ([38]; Reduktionsmittel Na₂S, L-Cystein und Dithiothreitol [DTT]) oder Stamm CBDB1-Standardmedium (2.2.2) wurden mit TCB (2.2.3) oder PeCB (2.2.4) angesetzt. Die Medien wurden mit 1% einer auf TCE gewachsenen Kultur von Stamm FL2 (62) inokuliert und bei 29°C im Dunkeln inkubiert.

2.2.7 Wachstums- und Kontaminationskontrollen

CBDB1-Kulturen wurden mikroskopisch auf Kontaminationen untersucht. Hierzu erfolgte eine Anfärbung der Zellen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI), einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert. Kultursuspension wurde mit 6% einer DAPI-Stammlösung (1 µg/ml) versetzt. 18 µl der Suspension wurden auf einen Agarose-beschichteten Objektträger (2) aufgetropft und mit einem Deckgläschen (20x20 mm)

abgedeckt. Zur mikroskopischen Untersuchung diente ein Axioskop 2 plus Mikroskop (Zeiss, Jena). Nach Anregung mit einer Wellenlänge von 356 nm wurde bei 1000facher Vergrößerung eine Epifluoreszenz der Zellen bei ca. 420 nm beobachtet. Eine zusätzliche Kontrolle der Proben erfolgte über Phasenkontrastmikroskopie. Zur Prüfung einer Kontamination mit fakultativ anaeroben Mikroorganismen wurde Kultursuspension auf LB-Agarplatten unter aeroben Bedingungen bei 29°C im Dunkeln für 3-5 Tage inkubiert.

2.3 Herstellung von Zellsuspensionen und subzellulären Fraktionen

2.3.1 Präparation von Rohextrakt und Membranfraktionen

Alle Präparationsschritte wurden unter weitgehend anaeroben Bedingungen in mit Stickstoff begasten Gefäßen durchgeführt. Zellen wurden durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 20 min bei 4°C geerntet. Das kaum sichtbare Sediment (Pellet) wurde in Standardpuffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 mM Titan(III)citrat; 0,5 mg/l Resazurin als Redoxindikator) resuspendiert. 5 – 10 ml der resultierenden Zellsuspension (0,5 – 1 µg Protein/ml) wurden durch drei French Press-Zyklen bei 28 MPa lysiert und das Lysat bei 10.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) enthielt 0,3 – 0,5 µg Protein. Nach Ultrazentrifugation des Rohextrakts bei 120.000 x g für 1 h bei 4°C wurde der Überstand entfernt und das die Membranfraktion enthaltende Pellet in Standardpuffer 1 resuspendiert.

2.3.2 Solubilisierung von Membranproteinen

Zur Solubilisierung von Membranproteinen wurden intakte Zellen ohne vorhergehenden Zellaufschluss für 30 min mit Triton X-100 (0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%), CHAPS (10 mM, 20 mM) oder 1 M NaCl bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Lösliche und durch die Detergenzbehandlung solubilisierete Proteine wurden durch Ultrazentrifugation bei 120.000 x g für 1 h bei 4°C von intakten Zellen, Zelltrümmern und Membranen getrennt. In einem weiteren Experiment wurde Triton X-100 in Konzentrationen zwischen 0,00001% und 0,01% für die Solubilisierung eingesetzt. Vor der Ultrazentrifugation wurde die Integrität der mit Detergenz behandelten Zellen über Phasenkontrastmikroskopie untersucht.

2.3.3 Zellpermeabilisierung

Zur Zellpermeabilisierung für Lokalisierungsstudien wurden intakte Zellen vor Bestimmung der Dehalogenase-Aktivität für 10 min mit 0,4% Toluol vorinkubiert.

2.3.4 Probenherstellung für die native Gelelektrophorese

Zur Herstellung solubilisierter Membranproteine für die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde ein anfängliches Volumen von 200-300 ml Zellsuspension aus 250 ml- oder 500 ml-Kulturen eingesetzt, das über zwei Zentrifugationsschritte bei 10.000 x g und Resuspension des Pellets in Standardpuffer 2 (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM DTT) auf 5 ml reduziert wurde. Der Zellaufschluss mit 5 ml Zellsuspension wurde mit 3 Zyklen Ultraschall (Branson sonifier 250; 5 min bei Pulstärke 4, Pulsfrequenz 20%) im Eisbad durchgeführt. Das Lysat wurde bei 10.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand (Rohextrakt) anschließend bei 100.000 x g für 1 h bei 4°C ultrazentrifugiert, um die Membranfraktion zu pelletieren. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde die Membranfraktion mit 2,5 ml Standardpuffer 2 plus 0,01% Triton X-100 oder 10 mM CHAPS resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde bei 100.000 x g für 1 h bei 4°C ultrazentrifugiert. Der die solubilisierten Membranproteine enthaltende Überstand wurde über Membranfilter mit einem *cut-off* von 50 kDa (Centricon YM-50; Millipore, Bedford, USA) bei 5000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert, einmal mit Standardpuffer 2 gewaschen und auf ein Volumen von ca. 150 µl reduziert. Die so gewonnenen Proben wurden mit nativem Elektrophoresepuffer versetzt (siehe 2.5.2, 2.5.3) und bei -80°C gelagert.

2.4 Säulenchromatographie

2.4.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Zur Auftrennung von CBDB1-Proteinen über Anionenaustausch-Chromatographie wurde eine 1 ml-MonoQ-Säule (Econo Pac Q, Bio-Rad Laboratories, München) verwendet. Um zu vermeiden, dass es durch

Adsorption von Proteinen an Schlauchoberflächen zu Proteinverlusten kommt, wurde ein System aufgebaut, das besonders kurze Verbindungsschläuche enthielt. Um anaerobe Bedingungen zu erzeugen, wurde das Chromatographiesystem (Komponenten der Firma Bio-Rad) mit Stickstoffgas gespült, das gleichzeitig zur Einstellung der Flussrate diente. Die Chromatographie erfolgte mit einer Flussrate von ca. 0,2 ml/min (N_2 -Absolutdruck 1,15 bar). 1 ml solubilisierte Membranproteine in Solubilisierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 mM Titan(III)citrat; 10 mM CHAPS) wurden auf eine mit Puffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM CHAPS) äquilibrierte MonoQ-Säule aufgetragen und anschließend über einen linearen NaCl-Gradienten (0-1 M) mit Puffer B (Puffer A plus 1 M NaCl) eluiert. Der NaCl-Gradient wurde über einen Leitfähigkeitsdetektor (Bio-Rad) verfolgt. Eluierte 1 ml-Fractionen wurden über eine mit dem Schlauchsystem verbundene Kanüle in 2 ml-Injektionsgefäße mit N_2 -Gasphase übertragen und auf Dehalogenase-Aktivität überprüft.

2.4.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Um CBDB1-Proteine über Hydrophobe Interaktionschromatographie zu trennen, wurden eine 1 ml-Methyl-Säule (Econo Pac Methyl HIC, Bio-Rad Laboratories) sowie eine handgegossene 1 ml-Phenylsepharose-Säule (Phenylsepharose von Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Chromatographie-Bedingungen waren mit Ausnahme der Puffer wie unter 2.4.1 beschrieben. Puffer A enthielt 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM CHAPS oder 0,01% Triton X-100 sowie 0,5-1,5 M $(NH_3)_2SO_4$. Puffer B enthielt dieselben Komponenten mit Ausnahme von $(NH_3)_2SO_4$.

2.5 Methoden zur gelelektrophoretischen Trennung von CBDB1-Proteinen

2.5.1 SDS-PAGE

Für die Herstellung der Gele wurde eine Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung mit einer Gesamtmonomerkonzentration von 30% und einem Anteil von 0,8% Bisacrylamid an der Acrylamid-Gesamtkonzentration (30%T; 30,8%C; Rotiphorese Gel 30, Firma Roth) verwendet. Die SDS-PAGE wurde entsprechend des diskontinuierlichen Lämmli-Systems (58) durchgeführt. Es

wurden Gele mit 10%igem Trenngel und 4%igem Sammelgel mit den Maßen 10x10,5 cm (Stärke 0,7 mm) hergestellt (Tabelle 3). Proben wurden mit SDS-Elektrophoreseprobenpuffer (70% 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 30% Glycerol; 0,1% SDS; 0,01% Bromphenol) versetzt. Als Größenmarker wurden Markerproteine (*Protein ladder* 20-100 kDa, SDS-behandelt, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur für 3-4 h bei 100-150 V.

2.5.2 Native Taurodesoxycholat-PAGE

Die native Taurodesoxycholat-PAGE wurde entsprechend des diskontinuierlichen Lämmli-Systems (58) durchgeführt, wobei SDS in allen Puffern durch 5 mM Taurodesoxycholat (TDC) ersetzt wurde, wie von Schrattenholz vorgeschlagen (100). Es wurden Gele mit 10%igem Trenngel und 4%igem Sammelgel mit den Maßen 10x10,5 cm (Stärke 0,7 mm) hergestellt (Tabelle 3). Alle Proteinproben einschließlich der SDS-behandelten 20-100 kDa-Markerproteine wurden mit TDC-Elektrophoreseprobenpuffer (70% 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 30% Glycerol; 5 mM TDC; 0,01% Bromphenol) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TDC-Laufpuffer (25 mM Tris/250 mM Glycin, pH 8,3; 5 mM TDC) für 3-4 h bei 100-150 V, 8-10°C und unter aeroben Bedingungen.

2.5.3 Native PAGE nach Schägger und von Jagow

Native Gradientengele wurden entsprechend der Angaben von Schägger und von Jagow (99) angefertigt, mit folgenden Modifikationen: Anstelle der speziellen Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung mit einer Gesamtmonomerkonzentration von 49,5% und einem Anteil von 3% Bisacrylamid an der Acrylamid-Gesamtkonzentration (49,5%T; 3%C) wurde eine herkömmliche Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (30%T; 0,8%C) eingesetzt. Der Konzentrationsgradient der verwendeten Trenngele wurde zwischen 5-20% und 14-16% variiert. Es wurden Gele mit entsprechendem Trenngel und 4%igem Sammelgel mit den Maßen 10x10,5 cm (Stärke 0,7 mm) hergestellt. Die höherprozentige Gellösung enthielt 17% (vol/vol) Glycerol (Tabelle 4). Der Kathodenpuffer enthielt je 0,05% Taurodesoxycholat und Triton X-100. Proteinproben wurden mit Schägger-Elektrophoreseprobenpuffer (70%

4x Gelpuffer [200 mM Bistris, pH 7,0; 0,5 M Aminocaprinsäure]; 30% Glycerol; 0,05% TDC; 0,01% Bromphenol) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffern nach Schagger und von Jagow (Anodenpuffer: 50 mM Bistris, pH 7,0; Kathodenpuffer: 50 mM N-tris-(hydroxymethyl)-methylglycin (TRICIN); 15 mM Bistris, pH 7,0; 0,05% TDC; 0,05% Triton X-100) für 16 h bei 200 V, 8-10°C und unter aeroben Bedingungen.

Tabelle 3. Herstellung der SDS- und TDC-Lämmli-Gele ^a.

verwendete Lösungen/Stoffe	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%T; 0,8%C)	6 ml	1 ml
H ₂ O	7,45 ml	4,55 ml
4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)		1,9 ml
4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	4,5 ml	
10% SDS (10% TDC)	150 (470) µl	75 (187) µl
TEMED	21 µl	10 µl
10% APS	72 µl	30 µl

^a Rezept für 2 Gele.

Tabelle 4. Herstellung der nativen Gradientengele (modifiziert nach Schagger und von Jagow [99]). Konzentrationsgradient des Trenngels: 12,5-17,5% ^a.

verwendete Lösungen/Stoffe	Trenngel (12,5%)	Trenngel (17,5%)	Sammelgel (4%)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%T; 0,8%C)	1,05 ml	1,5 ml	0,25 ml
H ₂ O	0,8 ml	175 µl	1,14 ml
4x Gelpuffer (200 mM Bistris, pH 7,0; 0,5 M Aminocaprinsäure)	0,6 ml	0,6 ml	0,47 ml
Bromphenol		+	
Glycerol		0,45 ml	
10% APS	13,5 µl	5 µl	15 µl
TEMED	0,9 µl	0,9 µl	5 µl

^a Rezept für 1 Gel.

2.5.4 Präparation und Transfer von Protein aus Gelfragmenten

Nach der TDC-PAGE bzw. nativen PAGE nach Schägger und von Jagow wurde das Gel vertikal in zwei Teile geschnitten. Ein Teil des Gels, der mit CBDB1-Extrakt oder Markerproteinen beladene Spuren enthielt, wurde mit Silber gefärbt. Der andere Gelteil enthielt Gelspuren mit CBDB1-Extrakt, die horizontal in Fragmente (2-5 mm Ausdehnung in vertikaler Richtung) geschnitten wurden. Die Fragmente wurden einzeln in 10-ml Gefäße mit Teflondeckel und Aluminiumcrimpverschluss überführt und mit 2 ml Dehalogenase-Reaktionslösung unter N₂-Gasphase auf Dehalogenase-Aktivität getestet (siehe 2.6.1). Die Proteinbanden der mit Silber gefärbten Gelspuren wurden anschließend mit der Dehalogenase-Aktivität der ungefärbten Gelfragmente korreliert.

Weiterführende Versuche wurden mit den TDC-Lämmli-Gelen durchgeführt. Für die erste TDC-PAGE wurden mehrere Gelspuren mit CBDB1-Extrakt beladen. Je eine Spur wurde für eine Silberfärbung bzw. für Dehalogenase-Aktivitätstests eingesetzt (siehe oben). Die verbleibenden Gelspuren wurden für eine zweite TDC-PAGE oder eine SDS-PAGE eingesetzt. Dazu wurden die Gelspuren wie beschrieben horizontal fragmentiert und die einzelnen Fragmente in getrennten Ansätzen weiter in 1 mm²-Stücke geschnitten. Diese Gelstücke wurden in Eppendorff-Gefäße mit 1 ml TDC-Elutionspuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5 mM TDC) oder 1 ml SDS-Elutionspuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS) überführt. TDC-Elutionsansätze wurden bei 800 rpm für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. SDS-Elutionsansätze wurden bei 1300 rpm für 30 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde der gelfreie Überstand entnommen und mit Hilfe von Membranfiltern mit einem *cut-off* von 30 kDa (Centricon YM-30, Millipore) 20-fach konzentriert. Die erhaltenen 50 µl-Proben wurden mit TDC- oder SDS-Elektrophoreseprobenpuffer versetzt und über SDS-PAGE oder native TDC-PAGE analysiert.

2.5.5 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Zur Darstellung der Proteinbanden wurde eine Silberfärbung der Polyacrylamid-Gele nach Nesterenko *et al.* (79) durchgeführt. Die einzelnen Färbeschritte sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5. Silberfärbung der Polyacrylamid-Gele (Nesterenko *et al.* [79]).

	Inkubationslösung	Inkubationszeit
1.	50% Aceton, 1,2% Trichloressigsäure, 0,015% Formaldehyd	5 min
2.	MilliQ-H ₂ O	3 x 5 s
3.	MilliQ-H ₂ O	5 min
4.	MilliQ-H ₂ O	3 x 5 s
5.	50% Aceton	5 min
6.	0,02% Natriumthiosulfat	1 min
7.	MilliQ-H ₂ O	3 x 5 s
8.	16 mM AgNO ₃ , 0,09% Formaldehyd	8 min
9.	milliQ-H ₂ O	2 x 5 s
10.	0,5% Na ₂ CO ₃ , 0,004% Natriumthiosulfat, 0,016% Formaldehyd	30 – 60 s
11.	1% Eisessig	30 sec
12.	MilliQ-H ₂ O	3 x 10 s

2.5.6 Isoelektrische Fokussierung unter nativen Bedingungen

Für die native isoelektrische Fokussierung wurden Gelstreifen mit immobilisierten pH-Gradienten (Immobilin-DryStrips, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. DryStrips mit einer Länge von 24 cm und einem pH-Gradienten pH 3-10 oder pH 4-7 wurden über Nacht in 450 µl nativem Rehydratisierungspuffer (10 mM Tris-Base; 1 mM DTT; 0,01% oder 0,1% Triton X-100; 0,8% Carrierampholin-Lösung pH 3,5-9,5 [Amersham Biosciences]; 0,05% Bromphenol) inkubiert. Zu Beginn der isoelektrischen Fokussierung wurden 100 µl einer Probe von mit Triton X-100 solubilisierten Membranproteinen über ein *sample cup* auf die rehydratisierten Strips aufgetragen. Als Probenauftragsort wurde entweder das basische oder das saure Ende des Strips gewählt. Die Bedingungen für die isoelektrische Fokussierung waren nacheinander 30 V für 12 h, 200 V für 30 min, 600 V für 30 min, 2000 V für 1 h und 8000 V für 5 h. Der Lauf fand unter aeroben Bedingungen bei 20°C statt. Nach Beendigung des Laufs wurden die Strips in 1 cm breite Stücke geschnitten und auf 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität getestet (2.6.1 bzw. 2.6.6).

2.6 Bestimmung der Dehalogenase-Aktivität

2.6.1 Dehalogenase-Aktivitätstest

Dehalogenase-Aktivität wurde standardmäßig mit reduziertem Methylviologen als artifiziellem Elektronendonator gemessen (68, 80). Methylviologen wurde durch Titan(III)citrat reduziert. Die Zugabe von 1,2,3-TCB erfolgte aus einer 5 mM-Stammlösung von 1,2,3-TCB in Aceton. Die Reaktionslösung enthielt 100 mM Kaliumacetat pH 6,1 (in wenigen Fällen 100 mM Tris-HCl, pH 7,5), 1 mM Methylviologen, 2 mM Titan(III)citrat und 50 μ M 1,2,3-TCB (Endkonzentrationen im Test). 2 ml-Injektionsgefäße wurden in einem Anaerobzelt, das eine N₂/H₂ (95%/5%)-Atmosphäre enthielt, mit je 800 μ l Reaktionslösung befüllt und mit Teflon-beschichteten Gummisepten und Aluminium-Crimpverschlüssen verschlossen. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μ l Rohextrakt (dies entspricht etwa 100 ng Protein) mit einer Spritze gestartet. Die Beendigung der Reaktion erfolgte nach 30–120 min Inkubation bei 25°C durch Extraktion der Reaktionslösung mit Hexan. Wenn nötig, wurde die Inkubationszeit entweder auf 5 min verkürzt oder auf bis zu 24 h verlängert. Die 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität von Suspensionen aus intakten Zellen wurde mit demselben Testsystem bestimmt.

2.6.2 Elektronendonoren

Zur Bestimmung der Dehalogenase-Aktivität mit verschiedenen Elektronendonoren wurde Methylviologen in der Reaktionslösung durch 1 mM Ethylviologen, 1 mM Benzylviologen, 1 mM AQDS oder 1 mM NADH ersetzt. Die Aktivitätsmessung mit Wasserstoff als Elektronendonator erfolgte mit dem in der Gasatmosphäre des Anaerobzelts enthaltenen Wasserstoff. Negativkontrollen ohne Elektronendonator wurden außerhalb des Anaerobzelts hergestellt und enthielten lediglich Stickstoff als Gasphase nach Begasen mit einer Kanüle.

2.6.3 Bestimmung des pH-Optimums

Das pH-Optimum der TCB-Dehalogenase-Aktivität wurde in Reaktionslösungen bestimmt, die folgende Puffer in einer Konzentration von

100 mM enthielten: Kaliumacetat pH 4,71 bis 6,10; Kaliumcitrat pH 5,29 bis 5,64; 2-(N-morpholino)ethan-sulfonsäure (MES) pH 5,47 bis 6,21; Kaliumphosphat pH 5,70 bis 7,53; Tris-HCl pH 7,54 bis 8,36 und 3-(Cyclohexylamino)propan-sulfonsäure (CAPS) pH 8,84 bis 9,72. Der ursprüngliche pH-Wert der Reaktionslösung wurde nach Zugabe des Rohextrakts leicht erhöht. Die angegebenen pH-Werte stellen die in Parallelansätzen gemessenen pH-Werte nach Zugabe des Rohextrakts dar.

2.6.4 Photometrischer Dehalogenase-Aktivitätstest

Die photometrischen Aktivitätstests wurden aufgrund der schwer zu handhabenden luftdichten Verschlüßung der Küvetten außerhalb des Anaerobzells vorbereitet. Je 880 µl Reaktionslösung (Endkonzentrationen im Test: 100 mM Kaliumacetat, pH 6,1; 0,5 mM Methylviologen) ohne Elektronenakzeptor wurden in 3 ml-Küvetten vorgelegt, 10 µl Titan(III)citrat unter die Lösungsoberfläche pipettiert und die Küvetten luftdicht mit Gummistopfen verschlossen. Zwei 0,4 mm-Kanülen wurden jeweils durch einen Gummistopfen gestochen und eine Kanüle mit einem N₂-Gasanschluß verbunden. Die Küvetten wurden für 5 min mit N₂ begast und die Reaktionslösung anschließend mehrmals geschwenkt. Danach wurde die Absorption im Spektrophotometer (Uvikon 923 Double Beam UV/VIS, Kontron Instruments) bei 578 nm für ca. 30 min gemessen, bis die Absorption konstant blieb. Mit einer Spritze wurden 100 µl Zellsuspension zugegeben und die Reaktionslösung gut gemischt. Die Absorption wurde weiterverfolgt, bis sich wieder ein konstanter Wert einstellte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 Tropfen einer 5 mM-Stammlösung von 1,2,3,4-TeCB in Aceton bzw. einer 5 mM-Stammlösung von Trichloracetat (TCA) in Wasser (Endkonzentration im Test jeweils ca. 50 µM) durch eine Spritze gestartet.

2.6.5 Reversible Hemmung der TCB-Dehalogenase

Zur Untersuchung einer Beteiligung von Cob(I)alamin an der TCB-Dehalogenierung wurden sechs Aliquots von je 500 µl Rohextrakt mit Alkyljodiden (Ethyljodid oder Propyljodid) und 2 mM Titan(III)citrat für 30 min in mit Aluminiumfolie umhüllten 2 ml-Injektionsgefäßen inkubiert. Die Folie wurde von drei Gefäßen entfernt, die dann auf Eis gestellt und mit einer 250 Watt-

Lampe für 10 min beleuchtet wurden. Alkyljodid-behandelte, im Dunkeln inkubierte Extrakte, Alkyljodid-behandelte, belichtete Extrakte sowie belichtete Kontrolleextrakte ohne Alkyljodid wurden auf TCB-Dehalogenase-Aktivität überprüft. Um eine Lichteinwirkung während der Dechlorierungsreaktion zu vermeiden, wurden die Reaktionsgefäße für die Alkyljodid-behandelten Extrakte ebenfalls mit Aluminiumfolie umhüllt. Entsprechende Hemmstudien wurden auch mit intakten Zellen durchgeführt.

2.6.6 Dechlorierung von hochchlorierten Benzolen

TCB- und TeCB-Isomere (1,2,3-TCB; 1,2,4-TCB; 1,3,5-TCB; 1,2,3,4-TeCB; 1,2,3,5-TeCB; 1,2,4,5-TeCB), PeCB und HCB wurden als 5 mM-Stammlösungen in Aceton hergestellt und als Elektronenakzeptoren im Dehalogenase-Aktivitätstest in einer nominellen Konzentration von 50 μ M (TCBs, 1,2,3,4-TeCB, 1,2,3,5-TeCB) oder 15 μ M (Chlorbenzole mit sehr geringer Löslichkeit in Wasser: 1,2,4,5-TeCB, PeCB, HCB) eingesetzt. Die Dechlorierung aller Chlorbenzolkongenerie wurde mit Rohextrakt und als Kontrolle mit hitzeinaktiviertem Rohextrakt, der 10 min bei 95°C inkubiert wurde, sowie mit einer sterilen Lösung von Vitamin B₁₂, dessen Konzentration der des Kultivierungsmediums (50 ng/l) entsprach, getestet.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Präparation genomischer DNA

Genomische DNA von Stamm CBDB1 wurde aus einer 30-ml Kultur mit Hilfe des Qiagen Mini Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend des Protokolls für Zellkulturen extrahiert. Genomische DNA von Stamm FL2 wurde aus 50 ml Kulturlösung gewonnen wie beschrieben (38).

2.7.2 Amplifikation und Klonierung von RDH-Genen

Die eingesetzten degenerierten Primer (Vorwärtsprimer RRF2, Rückwärtsprimer B1R; Tabelle 6) wurden aus Alignments der RDH-Gene von *D. ethenogenes* Stamm 195 abgeleitet (53). Die PCR-Ansätze (30 μ l) enthielten 0,05-3 ng *Template*-DNA (genomische DNA von Stamm CBDB1 oder FL2), je 0,5 μ M Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM jedes

Desoxynukleotids (ATP, CTP, GTP, TTP), 0,13 mg/ml BSA und 0,4 U Taq DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, USA) in 1x konzentriertem GeneAmp PCR-Puffer (Applied Biosystems). Die PCR wurde mit einem GeneAmp PCR-System 9700 (Applied Biosystems) mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 130 s anfängliche Denaturierung bei 94°C; 30 Zyklen von jeweils 30 s Denaturierung bei 94°C, 45 s *Annealing* bei 48°C und 130 s Elongation bei 72°C; sowie eine abschließende Extension von 6 min bei 72°C. Die Amplikons aus fünf PCR-Ansätzen wurden zusammengeführt und mit dem Qiagen PCR Purification Kit entsprechend der Angaben des Herstellers gereinigt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TA Cloning Kits (Invitrogen, Carlsbad, USA) in TOP10 *E. coli* Zellen kloniert wie vom Hersteller angegeben.

Tabelle 6. Zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung von RDH-Genen eingesetzte Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Literatur	Target
Vorwärtsprimer RRF2	SHMGBMGWGATTTYATGAARRS	Krajmalnik-Brown <i>et al.</i> (53)	Twin-Arginin-Signalsequenz
Rückwärtsprimer B1R	CHADHAGCCAYTCRTACCA	Krajmalnik-Brown <i>et al.</i> (53)	Internes Motiv des B-Proteins
Vorwärtsprimer fdehal	CARGGXACXCCXGARGA	U. Lechner, Halle; Hölscher <i>et al.</i> (45)	internes Motiv der Dehalogenase
Rückwärtsprimer rdehal	RSXCCRAARTCXATXGG	U. Lechner, Halle; Hölscher <i>et al.</i> (45)	internes Motiv der Dehalogenase
Vorwärtsprimer mern2	NNNTTYCAYGAYYTNGAYGAM	Mern (73), Hölscher <i>et al.</i> (45)	Twin-Arginin-Signalsequenz
Rückwärtsprimer mern5	NCCNGCRTCDATNGGNNNNNN	Mern (73), Hölscher <i>et al.</i> (45)	internes Motiv der Dehalogenase
Vorwärtsprimer mintF	GCCGGGTGTATTTTCAGGG	Hölscher <i>et al.</i> (45)	internes Motiv der Dehalogenase
5'end primer	GCCAGTGTGCTGGAATT	Zhou <i>et al.</i> (129)	TA Klonierungsvektor
3'end primer	GCCGCTCGAGCATGCATCTA	Zhou <i>et al.</i> (129)	TA Klonierungsvektor
„M13-reverse“	CAGGAAACAGCTATGAC	TA Cloning Manual (Invitrogen)	TA Klonierungsvektor

Bezeichnungen der degenerierten Basenpositionen: R = A/G; Y = C/T; M = A/C; S = G/C; W = A/T; H = A/C/T; B = G/C/T; D = A/G/T; X = Inosin; N = A/T/G/C.

2.7.3 Kolonie-PCR

Die Klone wurden durch Kolonie-PCR auf das Vorhandensein eines Inserts mit der zu erwartenden Größe untersucht: Eine kleine Menge Zellmaterial

wurde mit einem sterilen Zahnstocher in ein Gefäß mit 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) übertragen und bei 95°C 10 min inkubiert. Drei µl dieser Suspension wurden anschließend als *Template* für eine PCR mit Primern gegen den Polylinker des Klonierungsvektors (5'end primer, 3'end primer; Tabelle 6) eingesetzt. Die PCR-Ansätze wurden wie oben beschrieben hergestellt, und die Amplifikation wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 130 s bei 92°C; 30 Zyklen von jeweils 30 s bei 94°C, 1 min bei 68°C, 2 min bei 72°C; und eine abschließende Extension von 6 min bei 72°C. Insgesamt wurden 99 Klone mit 1,7 kb-Inserts für ein Screening über Restriktionsanalyse ausgewählt.

2.7.4 Restriktionsanalyse

Alle 1,7 kb-PCR-Produkte wurden jeweils getrennt mit den Restriktionsenzymen *MspI* und *HhaI* für 4 h bei 35°C verdaut. Die Restriktionsansätze (20 µl) enthielten 10 µl PCR-Produkt, 0,25 U Restriktionsendonuklease (Promega Biosciences, Inc., San Luis Obispo, USA) und 0,1 mg/ml Acetyl-BSA (Promega) in Restriktionspuffer (Promega). Die entstehenden Fragmente wurden durch zweistündige Elektrophorese auf Agarosegelen (*low-melting* Agarose) aufgetrennt. Plasmide, die Inserts mit verschiedenen Restriktionsmustern enthielten, wurden mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) gemäß der Angaben des Herstellers aus den entsprechenden *E. coli*-Klonen extrahiert.

2.7.5 Sequenzierung der RDH-Gene

Die Sequenzierung der RDH-Gene wurde mit einem ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) unter Verwendung des ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kits durchgeführt (B. Lynch, Department of Biology, Georgia Institute of Technology, Atlanta/USA). Zur Einzelstrangsequenzierung der Termini der 1,7 kb-Fragmente wurden Primer gegen den Polylinker des Klonierungsvektors (M13-reverse, 3'end primer; Tabelle 6) eingesetzt. Die erhaltene Sequenzinformation wurde für ein Design zweier weiterer Primer für jedes Fragment benutzt, um die komplette Sequenz des jeweiligen Inserts zu erhalten.

2.7.6 Zusätzliche RDH-Sequenzen

Drei Fragmente mit einer Länge von ca. 500 bp wurden mit Primern, die gegen konservierte Motive im Bereich stromaufwärts der Bindungsregion von Eisen-Schwefel-Clustern in *orfA* gerichtet waren (Vorwärtsprimer *fdehal*, Rückwärtsprimer *rdehal*; Tabelle 6), aus Stamm CBDB1 amplifiziert. Ein anderes Paar degenerierter Primer (Vorwärtsprimer *mern2*, Rückwärtsprimer *mern5*; Tabelle 6) wurde für eine PCR mit genomischer DNA von Stamm CBDB1 als *Template* eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit dem TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) in INVaF' *E. coli* Zellen kloniert. Die Sequenzierung der Inserts erfolgte durch den Sequenzierservice der Arbeitsgruppe für Genetik, M. Meixner (Biologie, HU Berlin). Ein Klon, dessen Insert mit dem Primerpaar *mern2/mern5* gewonnen wurde, wurde für weitere Versuche ausgewählt. Um die Sequenzinformation des Inserts am 3'Ende zu erweitern, wurde ein neuer, gegen eine interne Region des Inserts gerichteter Primer (*mintF*; Tabelle 6) zusammen mit dem Rückwärtsprimer B1R für eine neue PCR mit genomischer DNA eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde direkt sequenziert.

Alle Sequenzierdaten wurden mit Hilfe des Programms Chromas 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>) überprüft und ggf. manuell korrigiert.

2.7.7 Sequenzanalysen

Die Nummerierung der RDH-Gene von *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 entspricht derjenigen von Villemur *et al.* (119). Sequenzen reduktiver Dehalogenase-Gene aus anderen Bakterien stammen von GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). RDH-Sequenzen von *Dehalococcoides* sp. Stamm BAV1 wurden von Krajmalnik-Brown *et al.* (53) zur Verfügung gestellt (GenBank *accession numbers* AY553222-AY553228) und in die Analyse einbezogen. Ein Vergleich der PCR-amplifizierten Sequenzen mit anderen publizierten Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Webtools NCBI *blastx search*. Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm TRANSLATE (<http://us.expasy.org/tools/dna.html>) abgeleitet. Die Erstellung von Aminosäuresequenz-Alignments erfolgte mit ClustalW von der European Bioinformatics Institute Website (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) oder mit Qalign

(98). Phylogenetische Bäume (Neighbor-Joining [97], Maximum Parsimony) wurden aus fast vollständigen *orfA*-Genen (beginnend ab unmittelbar stromabwärts der Twin-Arginin-Signalsequenz und am 3'-Ende endend) mit MEGA Version 2.1 (57) generiert.

Spaltstellen der Twin-Arginin-Signalsequenzen wurden mit Hilfe des Programms SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) vorhergesagt. Nach entsprechendem *in silico* Verdau der Sequenzen wurden die Größe und der isoelektrische Punkt der theoretischen Proteine über das *pi* tool von ExPASy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) berechnet.

2.8 Analytik

2.8.1 GC-Analyse von Chlorbenzolen

Die Konzentrationen von DCBs und TCBs in Kulturen wurden nach Extraktion von 1 ml Kultursuspension in 1 ml Hexan bestimmt. 1 ml 2,4-Dichlortoluol-Lösung (10 mg/ml) wurde als interner Standard coextrahiert (1). Zur Bestimmung von 1,3-DCB und 1,2,3-TCB in Aktivitätstests wurde die gesamte Reaktionslösung (1 ml) mit Hexan extrahiert. Für die Analyse von Proben, die 1,3,5-TCB enthielten, konnte 2,4-Dichlortoluol nicht als interner Standard verwendet werden, da die Retentionszeit dieser Substanz mit der von 1,3,5-TCB übereinstimmte. Daher wurde eine Lösung von 1,2-DCB (10 mg/l) als interner Standard eingesetzt. Die Extrakte wurden durch einen Gaschromatographen GC-14A (Shimadzu, Kyoto, Japan) mit Flammenionisationsdetektor analysiert wie beschrieben (3). Die für die Analysen eingesetzten Temperaturprogramme sind in Tabelle 7 dargestellt.

2.8.2 HPLC-Analyse von Chlorphenolen

Zur Bestimmung der Konzentrationen von 3-MCP und 2,3-DCP wurden etwa 100 µl Kultursuspension entnommen und bei 11.000 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt oder im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt über HPLC bei Raumtemperatur analysiert. Eingesetzt wurde ein HPLC-System von Waters (Waters 590 programmable pump, Waters 486 tunable absorbance detector) mit einer *Reversed Phase*-Säule (Multospher

100 RP 18, 5 μ M Partikeldurchmesser; CS-Chromatographie Service GmbH). Als mobile Phase diente ein Gemisch aus 65% Methanol, 35% Wasser und 0,1% Essigsäure. Unter den gegebenen Bedingungen eluierte 3-MCP bei etwa 2,6 min und 2,3-DCP bei etwa 3,6 min.

Tabelle 7. Temperaturprogramme für die gaschromatographische Analyse von Chlorbenzolen.

DCBs, TCBs	DCBs, TCBs, 1,2,3,4- TeCB	alle Kongenere einschließlich HCB
55°C für 1 min; 6°C/min bis 160°C; 30°C/min bis 200°C	55°C für 1 min; 6°C/min bis 160°C; 30°C/min bis 225°C	55°C für 1 min; 6°C/min bis 225°C; 225°C für 2 min

2.8.3 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden fluorimetrisch mit dem NanoOrange Protein Quantitation Kit (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) entsprechend der Angaben des Herstellers bestimmt. Die Fluoreszenzmessung (Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 590 nm) erfolgte mit Hilfe eines Spektrofluorometers Typ RF-5001PC von Shimadzu (Tokio, Japan). Für die Quantifizierung wurde Zellmaterial aus Kultursuspension 25-fach durch Zentrifugation konzentriert.

2.8.4 Massenspektrometrie von Peptiden

Eine mit Silber gefärbte Proteinbande wurde aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorff-Gefäß überführt. Die im Gelfragment enthaltenen Proteine wurden tryptisch verdaut und die entstehenden Peptide nach chromatographischer Trennung („*nano-LC*“) über *Electrospray Tandem Mass Spectrometry* (nanoLC-ESI-MS/MS) durch die Proteome factory (S. Thies, Berlin) analysiert. Zur Vermessung wurden zwei verschiedene Geräte, QSTAR Pulsar XP und Bruker Esquire 3000, eingesetzt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Kultivierung von Stamm CBDB1

3.1.1 Chlorbenzole als Elektronenakzeptoren

Stamm CBDB1 wurde mit TCB als Elektronenakzeptor im Zwei-Flüssigphasensystem mit Hexadecan kultiviert (3). Die erste Kultivierungsphase erfolgte hierbei in Medium, das 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB in gelöster Form enthielt. Nach etwa zwei Wochen waren die zugesetzten TCBs vollständig zu einer Mischung aus 1,3-DCB und 1,4-DCB dechloriert (3). Die Kulturen wurden dann mit einer 1,2,3-TCB enthaltenden Hexadecanphase überschichtet (3, 46). Etwa eine Woche später erreichten die Kulturen ihre maximale Dechlorierungsaktivität, wie anhand von Dehalogenase-Aktivitätstests mit Methylviologen als Elektronendonator festgestellt wurde. Die Gesamtprotein-konzentration der Kulturen war sehr niedrig und lag bei 0,5 – 1 µg/ml, was einer Zellzahl von 10^7 /ml entspricht (3). Größere Kulturen (250 ml oder 500 ml Medium) benötigten teilweise einige Tage länger, um ähnliche Dechlorierungsraten wie die kleinen Kulturen (30 ml, 60 ml) zu erreichen. Alle im Folgenden beschriebenen Versuche wurden mit Kulturen, die TCBs als Elektronenakzeptoren enthielten, durchgeführt.

Des Weiteren wurde Stamm CBDB1 mit PeCB als Elektronenakzeptor, das in Form von Kristallen zugesetzt wurde, kultiviert (48). In 250 ml- oder 500 ml-Kulturen erreichten die Dechlorierungsraten nicht ganz die Werte von Kulturen, die im Zwei-Flüssigphasensystem mit TCB kultiviert wurden. Diesen PeCB-Kulturen konnte jedoch ebenfalls TCB in Form einer Hexadecanphase zugesetzt werden. Nach etwa einer Woche erreichten die Kulturen ebenso hohe Dechlorierungsraten wie die TCB-Kulturen.

In Medien mit kristallin zugesetztem 1,2,3,4-TeCB als Elektronenakzeptor fand kein Wachstum von Stamm CBDB1 statt (eine detaillierte Diskussion dieser Ergebnisse findet sich in [50]).

3.1.2 Chlorphenole als Elektronenakzeptoren

Stamm CBDB1 wurde mit 2,3-DCP als Elektronenakzeptor in 500 ml-Schottflaschen mit 250 ml Medium kultiviert. Nach etwa 10-14 Tagen war die anfänglich zugegebene Dosis von 20 μM 2,3-DCP vollständig zu 3-Monochlorphenol (MCP) dechloriert, und die Kulturen wurden mit 50 μM 2,3-DCP versetzt. Weitere Zugaben von jeweils 50-100 μM 2,3-DCP erfolgten im Abstand von 2-8 Tagen. Bei Zufütterung von etwa 50-70 μM 2,3-DCP konnte jeweils eine relativ schnelle Dechlorierung in 2-3 Tagen beobachtet werden, wohingegen die Dechlorierungsgeschwindigkeit bei Zugaben von 100 μM deutlich niedriger war, so dass eine vollständige Umsetzung von DCP zu MCP bis zu 8 Tage dauerte. Innerhalb einer Kultivierungsdauer von 4 Monaten wurde ein Gesamtumsatz von etwa 1 mM DCP nachgewiesen.

3.1.3 Kultivierungstests mit Stamm FL2

In Medien mit 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB oder mit PeCB als Elektronenakzeptor, die mit einer auf TCE gewachsenen Kultur von Stamm FL2 inokuliert wurden, konnten innerhalb von 6 Monaten keine Dechlorierungsprodukte nachgewiesen werden.

3.2 Biochemische Charakterisierung der reduktiven Chlorbenzol-Dehalogenase

3.2.1 Dehalogenase-Aktivitätstests

Zur Bestimmung der Dehalogenase-Aktivität mit Chlorbenzolen wurde ein *in vitro* Aktivitätstest aufgebaut. Als Standard-Elektronenakzeptor für Dehalogenase-Aktivitätstests diente das als Elektronenakzeptor in Kultur gut untersuchte Kongener 1,2,3-TCB (17). Ein Problem für die Standardisierung der Testbedingungen stellte die geringe Löslichkeit von Chlorbenzolen in Wasser dar (1,2,3-TCB: 66 μM bei 22°C [46]). Durch Zugabe der Chlorbenzole als Lösung in Aceton wurde eine homogene Chlorbenzolkonzentration in Reaktionslösungen verschiedener Aliquots erreicht. Die Bestimmung der Dehalogenase-Aktivität erfolgte in Reaktionslösungen mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator (Abb. 5). Mit Hilfe dieses Testsystems und

anschließender gaschromatographischer Analyse der Chlorbenzole konnte die Dehalogenase-Aktivität in intakten Zellen oder Rohextrakt von Stamm CBDB1 sensitiv (Nachweisgrenze $<1 \mu\text{M}$) und reproduzierbar bestimmt werden.

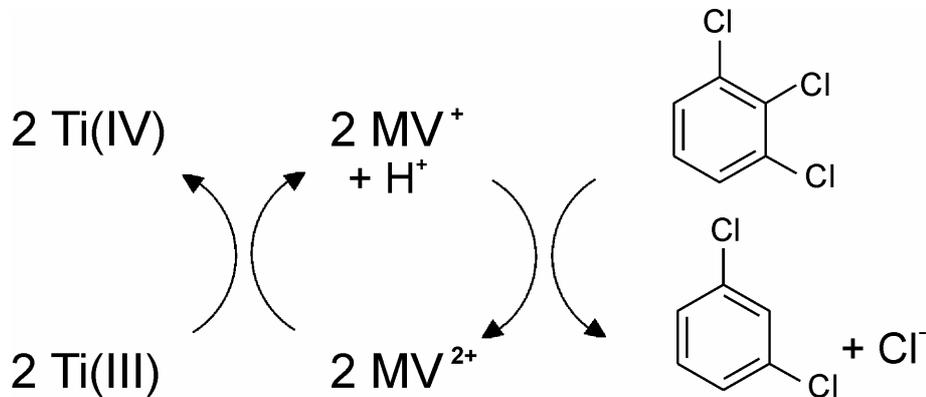


Abb. 5. Reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TCB mit Methylviologen als Elektronendonator.

3.2.2 Spezifische 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität in Rohextrakten und intakten Zellen

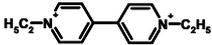
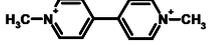
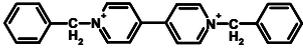
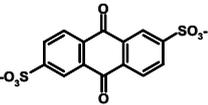
Die spezifische Dehalogenase-Aktivität intakter Zellen und Rohextrakte aus fünf Kulturansätzen wurde bestimmt. Intakte Zellen aus verschiedenen Kulturen katalysierten die reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TCB zu 1,3-DCB je nach Kultur mit einer spezifischen Aktivität von 17-34 nkat/mg Protein mit Methylviologen als Elektronendonator. Die spezifische 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität in Rohextrakten lag zwischen 11 und 20 nkat/mg Protein.

3.2.3 Elektronendonoren

Viologene mit verschiedenen Redoxpotentialen, NADH, AQDS und Wasserstoff wurden auf ihre Eignung als Elektronendonator für die TCB-Dehalogenase in Rohextrakten überprüft (Tabelle 8, [43]). Alle drei getesteten Viologene dienten als Elektronendonator für die reduktive Dechlorierung. Die höchste Dehalogenase-Aktivität wurde mit Methylviologen erreicht. Bei Einsatz von Ethylviologen und Benzylviologen wurden jeweils 89% und 12% der mit Methylviologen erreichten Aktivität gemessen. Mit den anderen getesteten Elektronendonoren bzw. ohne zugesetzten Elektronendonator konnte innerhalb

einer Inkubationszeit von 24 h keine Dehalogenase-Aktivität nachgewiesen werden.

Tabelle 8. TCB-Dehalogenase-Aktivität in zellfreiem Rohextrakt mit verschiedenen Elektronendonoren.

Elektronendonor	chemische Struktur	E'_0 [mV] ^a	Spezifische Aktivität \pm SD [nkat /mg Protein] ^b
Ethylviologen		-480	9,77 \pm 0,44
Methylviologen		-448	10,98 \pm 1,10
Benzylviologen		-360	1,32 \pm 0,44
H ₂		-414	<0,05
NADH		-320	<0,05
AQDS		-184	<0,05
kein Donor			<0,05

^a Daten aus Benz *et al.* (12) und Neumann *et al.* (80).

^b Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen \pm Standardabweichung (in Kaliumacetatpuffer, pH 6,1).
1 nkat ist definiert als 1 nmol gebildete Dechlorierungsprodukte pro Sekunde bei 25°C.

3.2.4 Aerotoleranz und Stabilität der Dehalogenase-Aktivität

Die Wirkung von Sauerstoff und erhöhtem Redoxpotential auf die Stabilität der TCB-Dehalogenase wurde untersucht. Hierzu wurden Rohextrakte bei 4°C unter folgenden Bedingungen gelagert: a) anaerobe Gasphase, Extrakte mit Titan(III)citrat reduziert (anaerobe Bedingungen; $E_h < -200$ mV; [128]); b) anaerobe Gasphase, Extrakte ohne Titan(III)citrat (anoxische Bedingungen; $E_h \geq 0$ V); c) aerobe Gasphase, Extrakte ohne Titan(III)citrat. Alle Rohextrakt-Proben verloren den überwiegenden Anteil ihrer anfänglichen Dehalogenase-Aktivität innerhalb einer Inkubationszeit von 48 h. Anoxische und in noch stärkerem Maße anaerobe Lagerungsbedingungen erhöhten die Stabilität des Enzyms signifikant (Abb. 6).

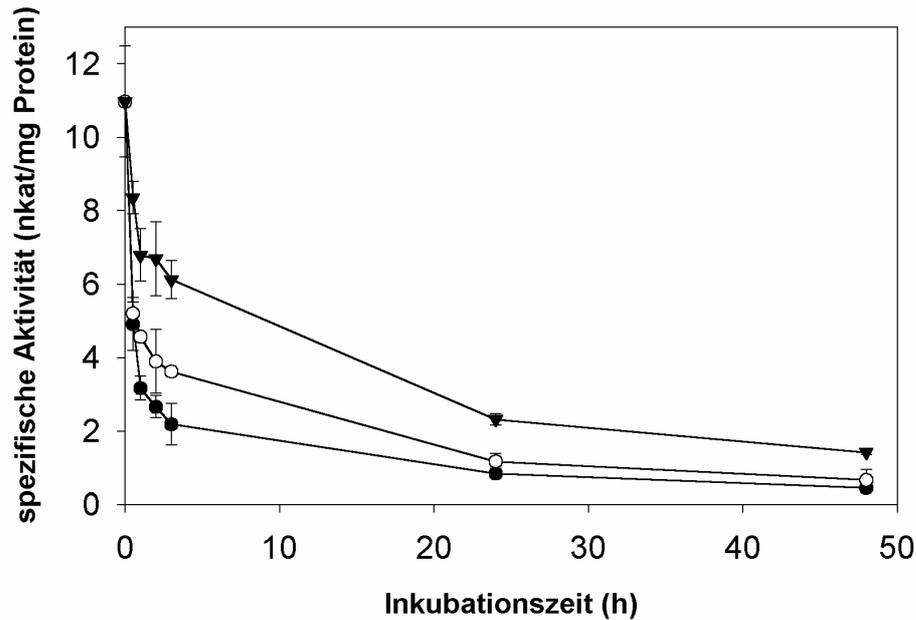


Abb. 6. Aerotoleranz und Stabilität der TCB-Dehalogenase-Aktivität in Rohextrakt. Symbole: (▼) reduziert-anaerobe, (○) anoxische, (●) aerobe Lagerungsbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen \pm Standardabweichung (in Kaliumacetatpuffer, pH 6,1).

3.2.5 pH-Optimum und thermische Stabilität

Das pH-Optimum der 1,2,3-TCB-Dehalogenase in Rohextrakt lag bei pH 6,1 (Abb. 7). Die Dechlorierungsaktivität war in Kaliumacetatpuffer mit pH 6,1 höher als in anderen Puffern (Kaliumcitrat, Kaliumphosphat, MES), die einen pH-Bereich von 5,4 – 6,5 abdeckten (Abb. 8). Alle an die pH-Optimierung anschließenden Aktivitätsmessungen wurde in Kaliumacetatpuffer mit pH 6,1 durchgeführt.

Zur Prüfung der Temperaturstabilität der TCB-Dehalogenase wurden reduziert-anaerobe Rohextrakte für 1 h bei Temperaturen zwischen -20°C und $+80^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend die Aktivität bei Raumtemperatur gemessen (Abb. 9). Die Aktivität der Rohextrakte nahm bedingt durch die einstündige Lagerung ab (siehe oben). Die höchste Dehalogenase-Aktivität wurde nach Inkubation bei 4°C festgestellt. Eine Inkubation bei 60°C oder darüber war mit einem vollständigen Verlust der Aktivität verbunden. Extrakte, die für 1 h bei -20°C gelagert wurden, wiesen 50% der Aktivität der bei 4°C inkubierten Extrakte auf.

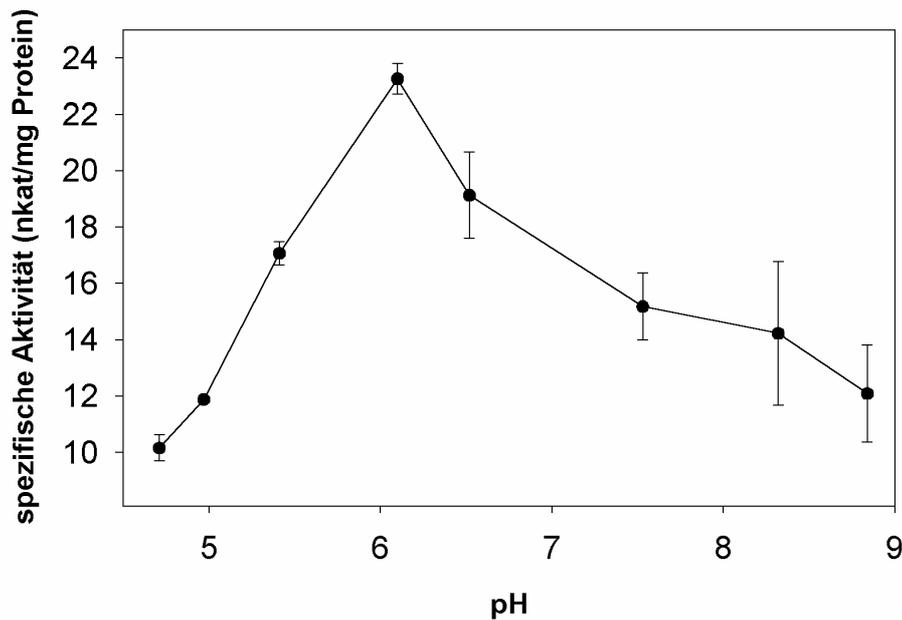


Abb. 7. pH-Abhängigkeit der TCB-Dehalogenase-Aktivität in Rohextrakt. Die Messung erfolgte in Kaliumacetat (pH 4,71 - 6,10), Kaliumphosphat (pH 6,52 und 7,53), Tris-HCl (pH 8,36) und CAPS (pH 8,84). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen \pm Standardabweichung.

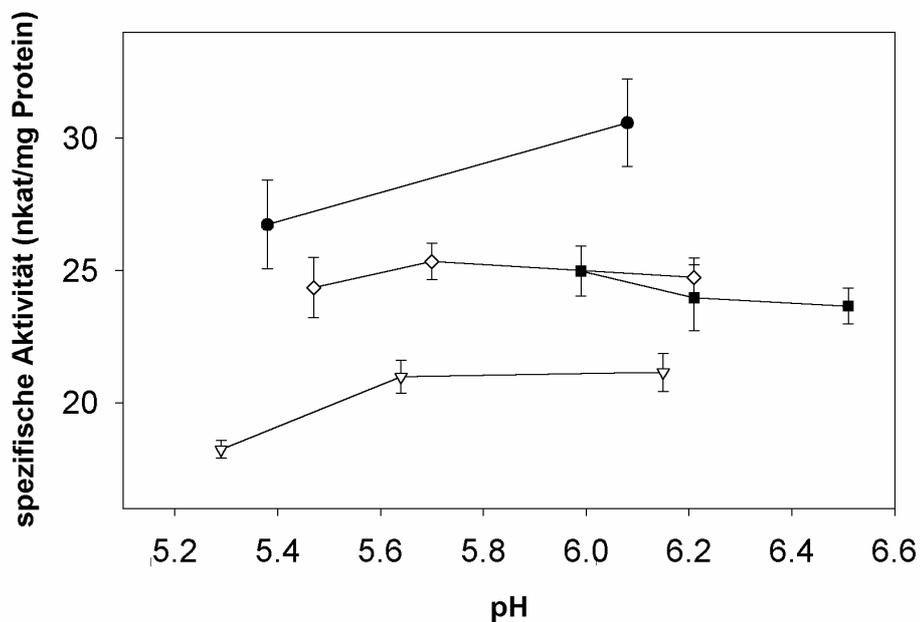


Abb. 8. Abhängigkeit der TCB-Dehalogenase-Aktivität von verschiedenen Pufferspezies. Symbole: (●) Kaliumacetat, (◇) MES, (■) Kaliumphosphat, (▽) Kaliumcitrat. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen \pm Standardabweichung.

3.2.6 Wirkung von Stabilisatoren auf die Dehalogenase-Aktivität

Rohextrakte wurden mit verschiedenen Stabilisatoren versetzt und unter anaeroben Bedingungen bei 4°C gelagert. Eine Inkubation mit 1 mM EDTA, 1 mM PMSF oder einer Kombination aus beiden Stabilisatoren zeigte innerhalb einer Lagerungszeit von vier Tagen keinen Effekt auf die Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCB. Ebenso wenig konnte eine stabilisierende oder hemmende Wirkung durch Inkubation mit 1 mg/ml BSA, 10% Glycerol oder 1 mM DTT beobachtet werden.

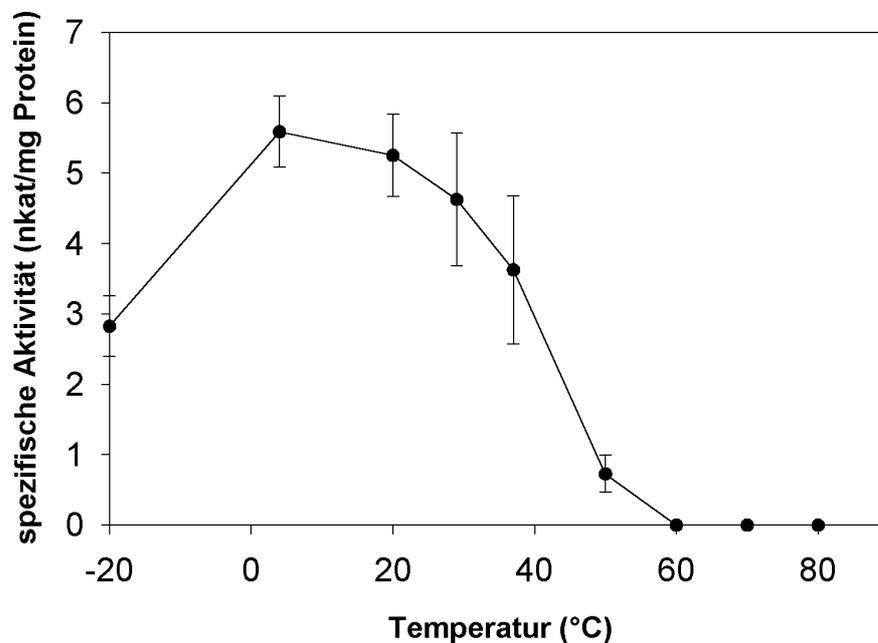


Abb. 9. Thermische Stabilität der TCB-Dehalogenase-Aktivität in Rohextrakt. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen \pm Standardabweichung (in Kaliumacetatpuffer, pH 6,1).

3.2.7 Hemmung der Dehalogenase-Aktivität durch Alkyljodide

Eine lichtreversible Hemmung enzymatischer Aktivität durch Alkyljodide ist charakteristisch für Enzyme, die Corrinnoide als Cofaktoren enthalten (75, 80). In Gegenwart von 10 μ M Ethyljodid oder Propyljodid sank die TCB-Dehalogenase-Aktivität in unbelichteten Rohextrakten und intakten Zellen auf 50-75% der

Kontrollaktivität ab. Durch zehnmütige Beleuchtung mit einer 250 Watt-Lampe konnte die Aktivität bis zu Werten von 78-96% der Kontrollaktivität wiederhergestellt werden. Bei Einsatz von 50 μM Propyliodid zeigten Hemmung und Lichtreversion dasselbe Muster wie mit 10 μM Propyliodid. Konzentrationen oberhalb von 500 μM führten zu einer deutlichen Abnahme der Dehalogenase-Aktivität, jedoch konnte diese durch zehnmütige Beleuchtung nicht wiederhergestellt werden.

3.2.8 Dechlorierung verschiedener Chlorbenzolkongenerere

Rohextrakte wurden auf ihre Fähigkeit, alle TCB- und TeCB-Isomere, PeCB und HCB mit Methylviologen als Elektronendonator zu dechlorieren, untersucht. Obwohl die aus den CBDB1-Kulturen gewonnene Menge an Protein sehr niedrig war, konnte eine Dechlorierung aller getesteten Chlorbenzolkongenerere mit Ausnahme von 1,3,5-TCB nachgewiesen werden (Tabelle 9). Eingesetzt wurden jeweils etwa 100 μg Rohextrakt pro ml Testansatz.

Tabelle 9. Dehalogenase-Aktivität in zellfreiem Rohextrakt mit hochchlorierten Chlorbenzolkongeneren als Elektronenakzeptoren.

Eingesetztes Chlorbenzolkongener	Erste(s) Dechlorierungsprodukt(e)	Spezifische Aktivität \pm SD [nkat/mg Protein] ^a	
1,2,3-TCB	1,3-DCB	11	\pm 0,7
1,2,4-TCB	1,3-DCB, 1,4-DCB	0,3	\pm 0,0
1,3,5-TCB		< 0,05	
1,2,3,4-TeCB	1,2,4-TCB	355	\pm 21
1,2,3,5-TeCB	1,3,5-TCB	76	\pm 1,7
1,2,4,5-TeCB	1,2,4-TCB	3	\pm 0,1
PeCB	1,2,3,5-TeCB, 1,2,4,5-TeCB	171	\pm 12
HCB	PeCB	0,4	\pm 0,0

^a Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen \pm Standardabweichung (in Kaliumacetatpuffer, pH 6,1). 1 nkat ist definiert als 1 nmol gebildete Dechlorierungsprodukte pro Sekunde bei 25°C.

Die Dechlorierung von PeCB zu 1,3,5-TCB, 1,3-DCB und 1,4-DCB verlief über die Bildung von etwa gleich großen Anteilen an 1,2,3,5-TeCB und 1,2,4,5-TeCB. 1,2,3,5-TeCB wurde rasch weiter zu 1,3,5-TCB umgesetzt, wohingegen 1,2,4,5-TeCB vorübergehend akkumulierte (Abb. 10). Bei längerer Inkubation wurde 1,2,4,5-TeCB über 1,2,4-TCB zu 1,3-DCB und 1,4-DCB dechloriert. HCB wurde über PeCB zu 1,3,5-TCB, 1,3-DCB und 1,4-DCB umgesetzt. Aus 1,2,3,4-TeCB entstand 1,2,4-TCB, das langsam weiter zu 1,3-DCB und 1,4-DCB dechloriert wurde.

In Testansätzen mit hitzeinaktivierten Rohextrakten sowie mit einem gleichen Volumen einer Lösung, deren Vitamin B₁₂-Konzentration der des Kultivierungsmediums entsprach (50 ng/l), konnte keine Dehalogenase-Aktivität nachgewiesen werden.

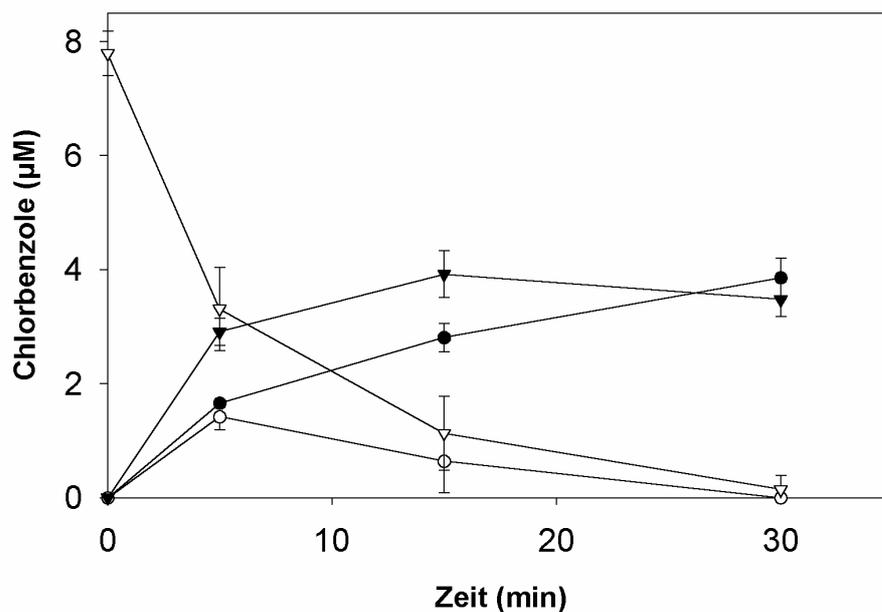


Abb. 10. Erste Schritte der PeCB-Dechlorierung in Rohextrakt. Symbole: (▽) PeCB, (▼) 1,2,4,5-TeCB, (○) 1,2,3,5-TeCB, (●) 1,3,5-TCB. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen \pm Standardabweichung (in Kaliumacetatpuffer, pH 6,1).

Die mit Methylviologen als Elektronendonator beobachteten Dechlorierungswege für Chlorbenzolkongenerne sind in Abb. 11 zusammengestellt. Tabelle 9 enthält die ermittelten spezifischen Aktivitäten für

die verschiedenen Chlorbenzolkongenere. Die Aktivität wurde als die Summe der pro Zeiteinheit gebildeten Dechlorierungsprodukte berechnet. Die höchsten spezifischen Aktivitäten wurden mit 1,2,3,4-TeCB und PeCB gemessen; die Dechlorierung dieser Kongenere verlief etwa um den Faktor 30 bzw. 15 schneller als die Dechlorierung von 1,2,3-TCB. Die spezifische 1,2,3,5-TeCB-Dehalogenase-Aktivität lag fast siebenfach höher als die 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität. Die Dehalogenase-Aktivität mit 1,2,4,5-TCB, HCB und 1,2,4-TCB erreichte 27%, 4% bzw. 3% der 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität.

Die hohe spezifische PeCB-Dehalogenase-Aktivität ermöglichte Messungen mit extrem geringen Rohextraktmengen. Bei Einsatz von <10 ng/ml Rohextrakt-Protein konnte nach einer Inkubationszeit von 15 min bereits ein Umsatz des Substrats zu 1,2,3,5-TeCB, 1,2,4,5-TeCB und 1,3,5-TCB beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

Um zu untersuchen, ob Interferenzen bei der Dechlorierung von verschiedenen Chlorbenzolkongeneren auftreten, wurde jeweils für die Kongener-Paare 1,2,3-TCB/PeCB sowie 1,2,3-TCB/1,2,3,4-TeCB die Dechlorierung durch intakte Zellen bei Einsatz eines einzelnen Substrates sowie bei Einsatz beider Substrate im Aktivitätstest mit Methylviologen bestimmt. Wie aus Abb. 12 und Abb. 13 ersichtlich, wurde die Dechlorierung keines der Kongenere signifikant durch die Anwesenheit des jeweils anderen Kongeners beeinflusst.

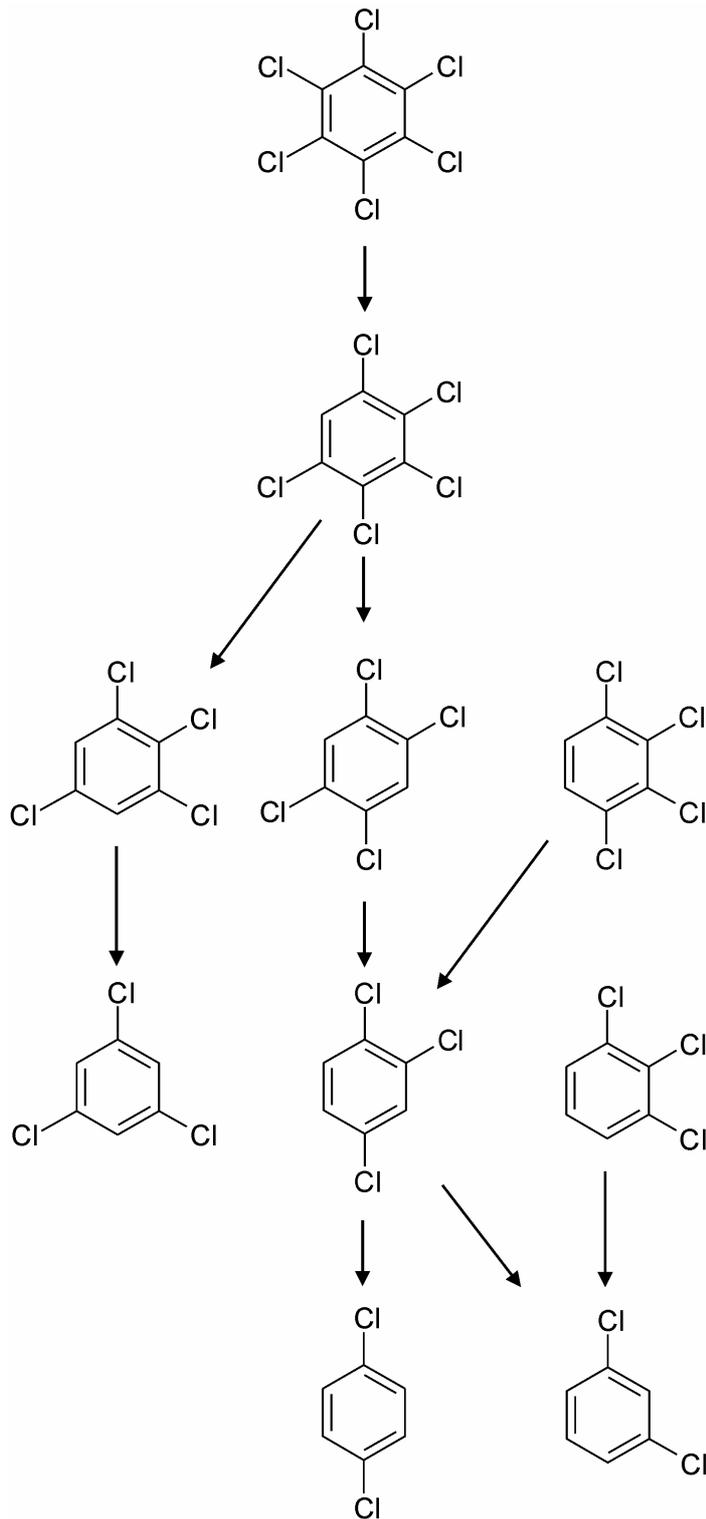


Abb. 11. Beobachtete Dechlorierungswege für Chlorbenzole in Rohextrakt von Stamm CBDB1 mit Methylviologen als Elektronendonator (Darstellung modifiziert nach [4]).

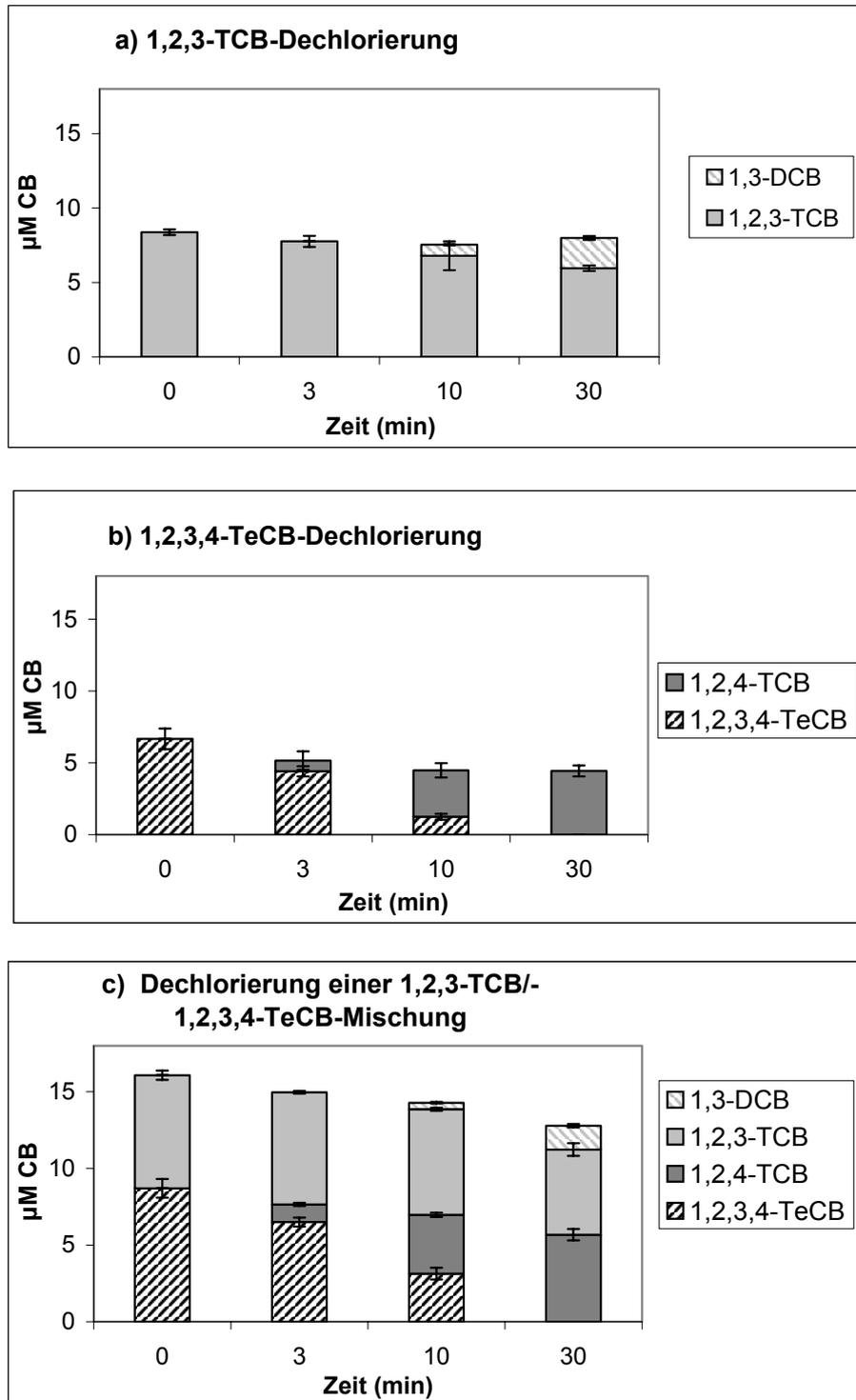


Abb. 12. Dechlorierung einer 1,2,3-TCB-/1,2,3,4-TeCB-Mischung. Die Reaktionen wurden mit 100 µl Zellsuspension pro ml Reaktionslösung (Kaliumacetatpuffer, pH 6,1) und 15 µM je Chlorbenzolkongener durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen ± Standardabweichung.

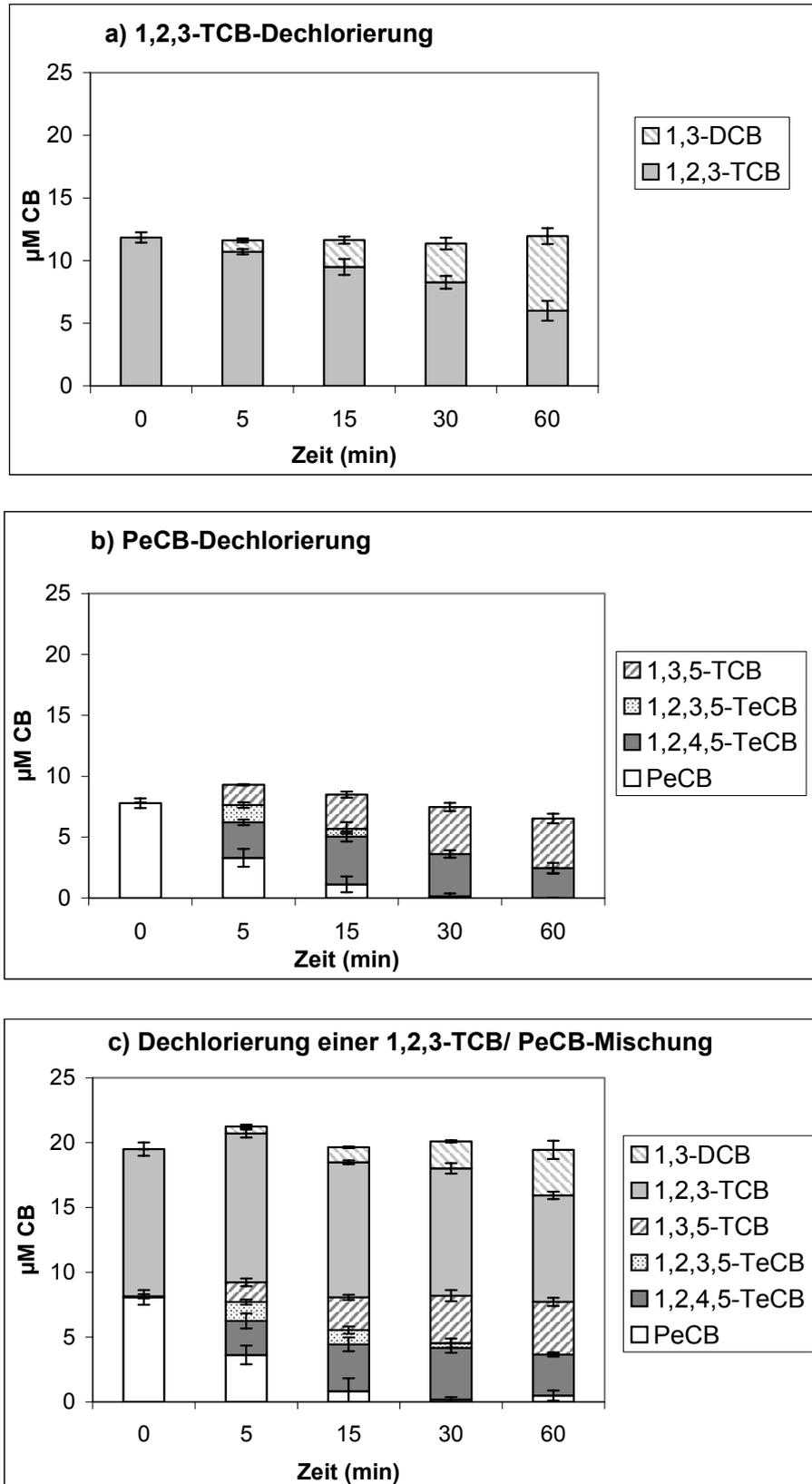


Abb. 13. Dechlorierung einer 1,2,3-TCB/PeCB-Mischung. Die Reaktionen wurden mit 100 µl Zellsuspension pro ml Reaktionslösung (Kaliumacetatpuffer, pH 6,1) und 15 µM je Chlorbenzolkongener durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen ± Standardabweichung.

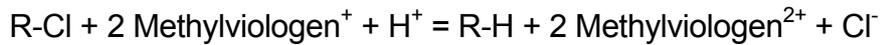
3.2.9 Tests mit Stamm FL2

In Aktivitätstests mit Methylviologen als Elektronendonator wurde keine Dechlorierung von Chlorbenzolkongeneren (1,2,3-TCB; 1,2,4-TeCB; 1,2,3,4-TeCB; 1,2,3,5-TeCB; 1,2,4,5-TeCB; PeCB; HCB) durch intakte Zellen von Stamm FL2 festgestellt. Die Aktivitätstests wurden mit 100-200 µg Protein/ml durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug maximal 72 h.

3.2.10 Photometrische Bestimmung der Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCB und TCA

Der photometrische Aktivitätstest mit Methylviologen als Elektronendonator wurde routinemäßig zur Messung der *in vitro* Aktivität von reduktiven Chlorethen- oder Chlorphenol-Dehalogenasen eingesetzt (80, 117). Bei diesem Test wird die Reduktion von chlorierten Elektronenakzeptoren indirekt über die Oxidation des in reduziertem Zustand farbigen Elektronendonors Methylviologen bestimmt. Der photometrische Test besitzt eine im Vergleich zur gaschromatographischen Analyse geringere Sensitivität. Bei längerer Messdauer überlagert eine durch Sauerstoffeintrag bedingte Oxidation von Methylviologen die dechlorierungsabhängige Oxidation, was besonders bei geringer Enzymmenge bzw. niedriger Aktivität zu ungenauen Ergebnissen führt. Zur Etablierung eines photometrischen Dehalogenase-Aktivitätstests mit Chlorbenzolen wurde 1,2,3,4-TeCB als Elektronenakzeptor eingesetzt, da dieses Kongener am schnellsten mit reduziertem Methylviologen umgesetzt wird (Tabelle 9). Des Weiteren wurde TCA, das mit Methylviologen als Elektronendonator abiotisch oder biotisch durch Corrinnoide bzw. corrinoidhaltige Enzyme zu Dichloracetat dechloriert wird (82), als Substrat getestet. Die Messungen wurden bei hohen Absorptionswerten ($E_{578} = 2-4$) gestartet, da die Reaktionslösungen in diesem Bereich die geringste Störanfälligkeit gegenüber vorzeitiger Entfärbung aufwiesen. In Abb. 14 ist die photometrische Bestimmung der Dechlorierung von TCA und 1,2,3,4-TeCB durch CBDB1-Kultursuspension dargestellt. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Elektronenakzeptor eingesetzt. Aus den Anfangsgeschwindigkeiten konnte für TCA eine etwa um den Faktor 20 höhere Dechlorierungsrate im Vergleich zur

Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCB ermittelt werden. Aus der Oxidation von Methylviologen ($\epsilon_{578} = 9,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurde nach der Gleichung



die Freisetzung von Chloridionen bei der Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCB ermittelt (Abb. 15). Die mit Hilfe des photometrischen Tests ermittelte spezifische Aktivität mit 1,2,3,4-TeCB als Elektronenakzeptor (292 nkat/mg Protein) entsprach für Rohextrakt in etwa der durch gaschromatographische Analyse berechneten spezifischen Aktivität. In weiteren Versuchen wurde die Dechlorierung von TCA durch denaturiertes Zellprotein aus Stamm CBDB1 untersucht. Es konnten keine Unterschiede zwischen hitzedenaturierten, SDS-behandelten Proben und nativen Proben festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Um die Eigenschaften der Corrinoiden in CBDB1-Kulturen näher zu untersuchen, wurde die TCA-Dechlorierung durch CBDB1-Kultursuspension im Vergleich zur TCA-Dechlorierung durch abiotisches CBDB1-Medium, das Vitamin B₁₂ in einer Konzentration von 50 ng/l enthielt, gemessen. Als Kontrollen dienten Ansätze mit CBDB1-Kultursuspension ohne TCA. Aus den Anfangsgeschwindigkeiten der Dechlorierung ergab sich eine etwa dreifach höhere Dechlorierungsrate durch CBDB1-Kultursuspension im Vergleich zum abiotischen Medium (Abb. 16).

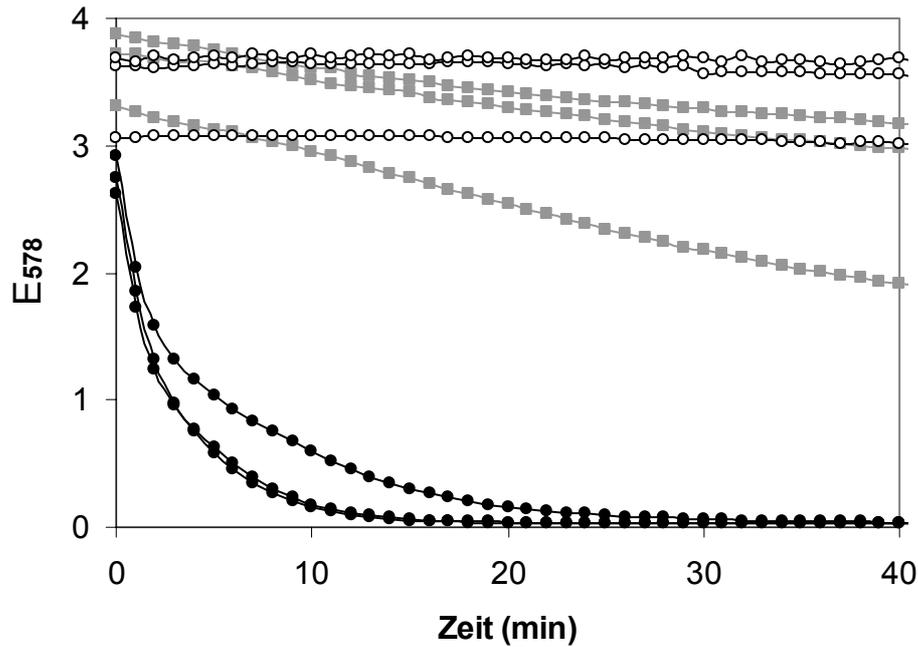


Abb. 14. Photometrische Bestimmung der Dechlorierung von TCA und 1,2,3,4-TeCB durch Stamm CBDB1. Dargestellt ist der Verlauf der Absorption bei 578 nm in jeweils drei parallelen Ansätzen (in Kaliumacetatpuffer, pH 6,1). Symbole: (●) CBDB1-Kultursuspension plus TCA; (■) CBDB1-Kultursuspension plus 1,2,3,4-TeCB; (○) CBDB1-Kultursuspension ohne chloriertes Substrat.

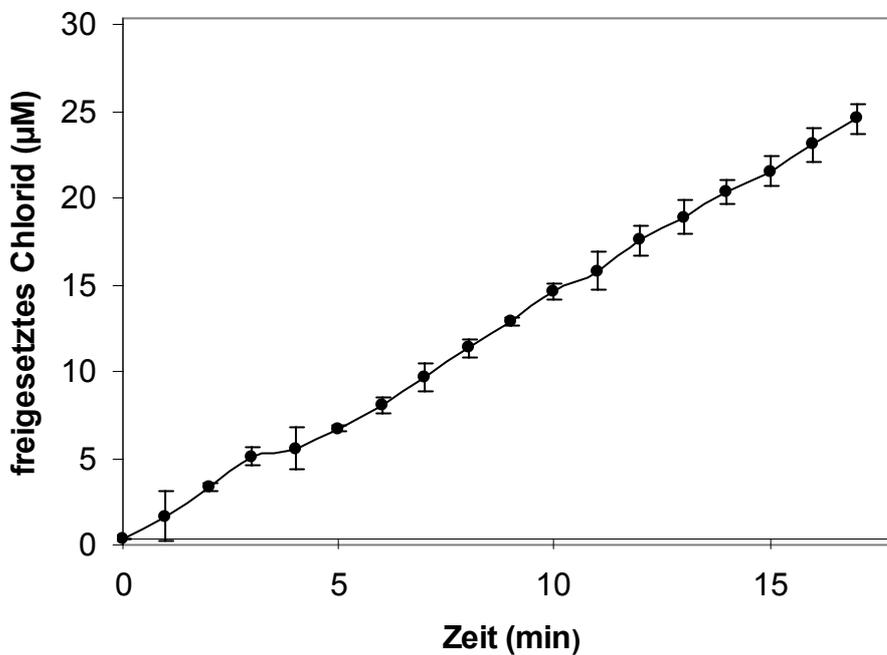


Abb. 15. Freisetzung von Chloridionen aus 1,2,3,4-TeCB. Die Freisetzung der Chloridionen wurde über die photometrische Bestimmung der Oxidation von Methylviologen berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen \pm Standardabweichung. Eingesetzt wurden 80 μg Protein/ml. Die mittlere Steigung entspricht 1,4 μM Chlorid pro Minute = 23 nkat/l. Die spezifische Aktivität beträgt 292 nkat/mg Protein.

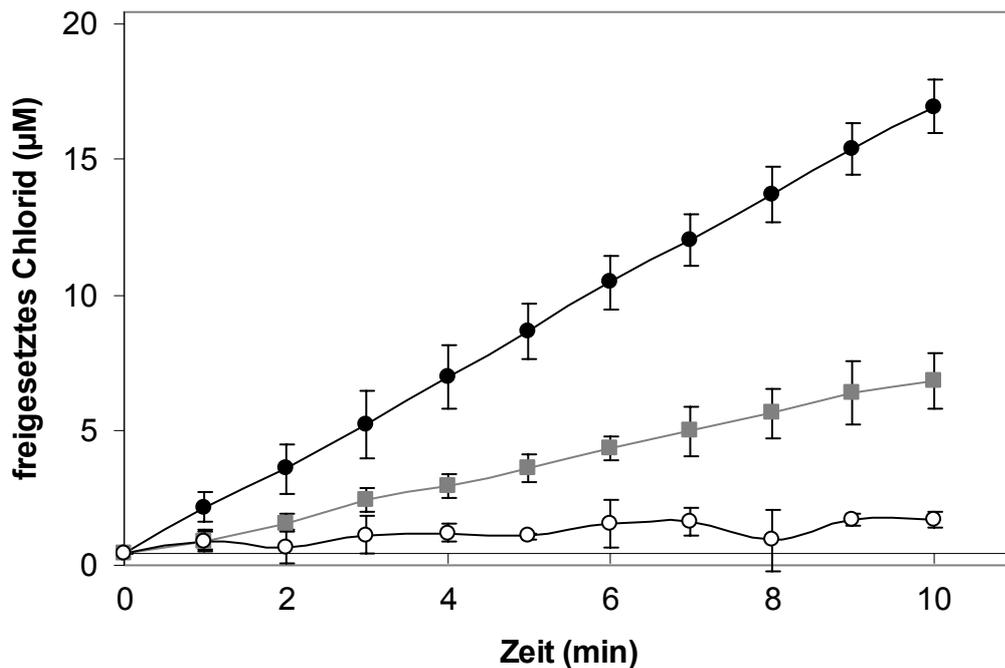


Abb. 16. Photometrische Bestimmung der Dechlorierung von TCA durch Stamm CBDB1 und Vitamin B₁₂ enthaltendes abiotisches Kulturmedium. Symbole: (●) CBDB1-Kultursuspension plus TCA; (■) Kulturmedium plus TCA; (○) CBDB1-Kultursuspension ohne chloriertes Substrat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen ± Standardabweichung (in Kaliumacetatpuffer, pH 6,1)

3.3 Aufreinigung der Dehalogenase-Aktivität

3.3.1 Quantifizierung von CBDB1-Protein

Die geringe Proteinkonzentration sowie das Vorhandensein von Reduktionsmitteln und Detergenzien in CBDB1-Proteinproben verursachten erhebliche Schwierigkeiten bei der Proteinbestimmung. Zur Quantifizierung von Membranproteinen wird häufig die Bicinchoninsäure-(*bicinchononic acid*, BCA) Methode (108) wegen ihrer hohen Sensitivität und ihrer Toleranz gegenüber Detergenzien, die zur Solubilisierung der Proteine genutzt werden, eingesetzt. Da Detergenzien auch für die Reinigung der TCB-Dehalogenase nötig waren, wurden Proteinkonzentrationen zunächst mit der BCA-Methode bestimmt. Leider zeigten die den Proben zugesetzten Reduktionsmittel Titan(III)citrat und DTT eine starke Interferenz mit der BCA-Methode. Aus diesem Grund wurde der fluorimetrische NanoOrange Test zur Proteinbestimmung eingesetzt, der ebenfalls sehr sensitiv ist und nicht mit Reduktionsmitteln interferiert. Mit Hilfe

des NanoOrange Tests ließen sich Proteinkonzentrationen bis zu einer unteren Grenze von etwa 0,5 µg/ml abschätzen (Abb. 17). Aufgrund der Inkompatibilität dieses Tests mit Detergenzien konnte jedoch keine Quantifizierung von Proben mit solubilisierten Membranproteinen durchgeführt werden.

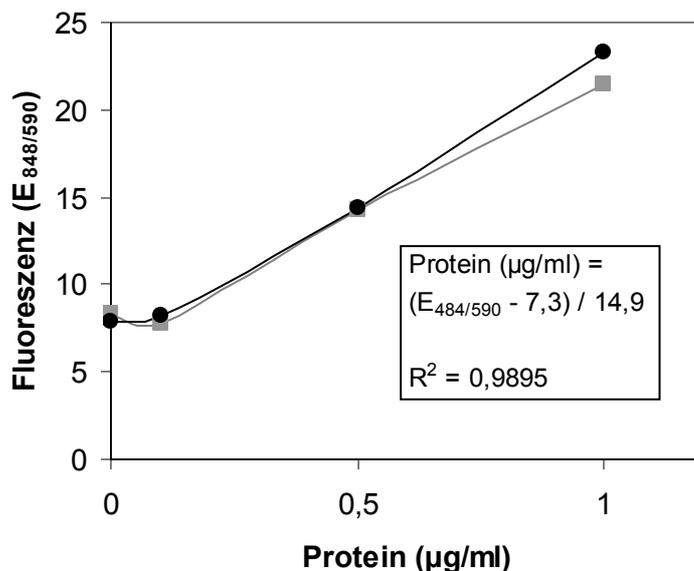


Abb. 17. Eichgerade zur Proteinbestimmung mit Hilfe des NanoOrange Tests. Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin eingesetzt. Dargestellt sind Werte aus zwei parallelen Reihen.

3.3.2 Lokalisierung der Dehalogenase-Aktivität

Intakte Zellen, mit 0,4% Toluol behandelte Zellen, Rohextrakte sowie Fraktionen löslicher und membranassoziierter Proteine wurden auf 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität getestet. Mit Toluol behandelte Zellen zeigten etwa die gleiche Aktivität wie unbehandelte intakte Zellen. Wie anhand der Aktivitäten in Rohextrakten gezeigt wurde, zeigte Toluol selbst keine hemmende Wirkung auf die Dehalogenase-Aktivität. 40-50% der 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität intakter Zellen konnten in zellfreien Rohextrakten nachgewiesen werden (Abb. 18). Nach Ultrazentrifugation wurde fast die gesamte wieder erhaltene Aktivität in der Membranfraktion gemessen (42). Eine entsprechende Fraktionierung wurde auch für die 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität bestimmt (Daten nicht dargestellt). Durch Inkubation mit 0,01% Triton X-100 oder 10-20 mM CHAPS konnte die Dehalogenase-Aktivität aus der

Membranfraktion solubilisiert werden; allerdings war die Aktivität der solubilierten Fraktion sehr niedrig im Vergleich zur Ausgangsaktivität der intakten Zellen.

3.3.3 Direkte Solubilisierung der TCB-Dehalogenase-Aktivität aus intakten Zellen

Ohne vorhergehenden Zellaufschluss wurden intakte Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Triton X-100 oder CHAPS bzw. mit 1 M NaCl inkubiert und die solubilierten Proteine anschließend durch Ultrazentrifugation von membrangebundenen Proteinen und intakten Zellen getrennt. Bei Behandlung mit 0,01% Triton X-100 oder 10-20 mM CHAPS wurden 30-50% der für intakte Zellen gemessenen Aktivität in der solubilierten Fraktion nachgewiesen (Abb. 19). Bei Einsatz von 1 M NaCl wurde fast die gesamte Aktivität im Pellet gemessen, das intakte Zellen und Membranen enthielt. Eine Inkubation mit Triton X-100-Konzentrationen unterhalb 0,01% oder mit 5 mM CHAPS resultierte in geringerer Solubilisierungseffizienz; der überwiegende Anteil der Dehalogenase-Aktivität war noch immer mit dem Pellet assoziiert. Wie anhand von mikroskopischen Untersuchungen im Rahmen eines studentischen Praktikums gezeigt wurde, waren bei Triton X-100-Konzentrationen bis zu 0,001% noch intakte Zellen vorhanden, wohingegen eine Inkubation mit 0,01% Triton X-100 mit einem Verlust der Zellintegrität verbunden war. Triton X-100-Konzentrationen oberhalb von 0,1% oder 50 mM CHAPS zeigten einen stark hemmenden Effekt auf die Dehalogenase-Aktivität und führten daher auch zu geringeren Aktivitäten in den solubilierten Fraktionen. Erhöhte NaCl-Konzentrationen (0,2 M; 0,5 M) zeigten keinen Effekt auf die Solubilisierung der TCB-Dehalogenase aus intakten Zellen.

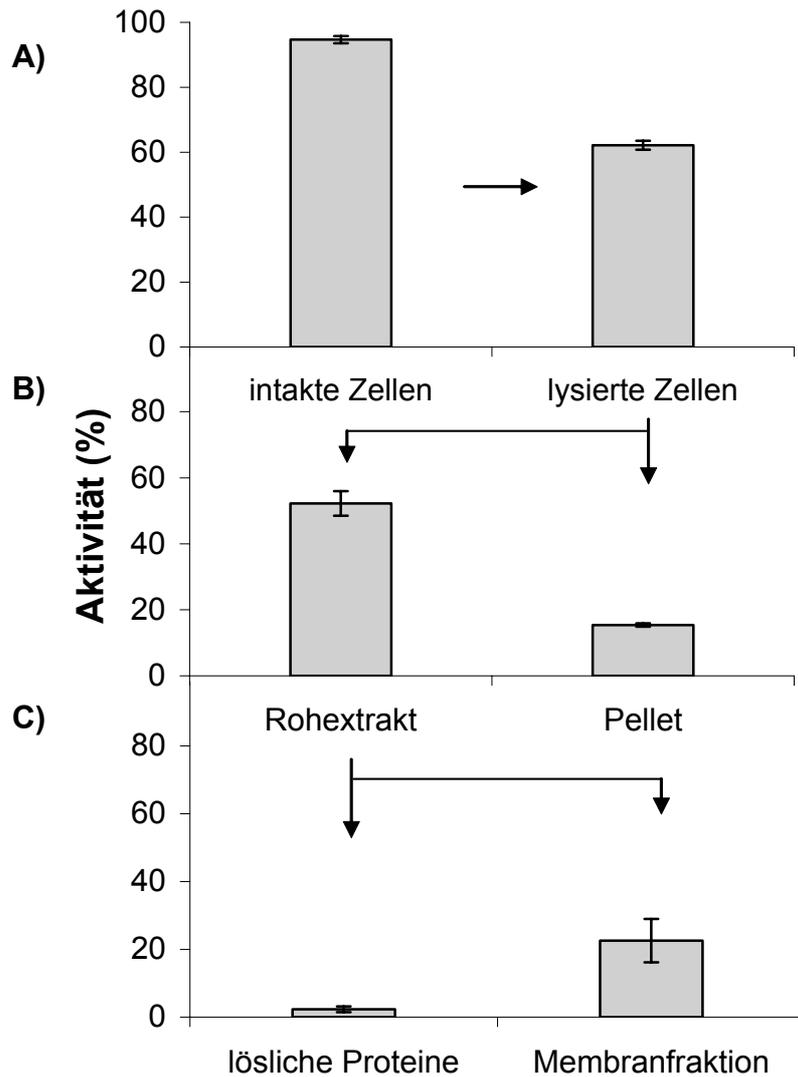


Abb. 18. Lokalisierung der TCB-Dehalogenase. Dargestellt ist die Aktivität (Anteil des umgesetzten TCB in Prozent) unterschiedlicher Fraktionen. A) vor bzw. nach Aufschluss mit der French Press. B) nach Zentrifugation der lysierten Zellen bei 10.000 x g. C) nach Zentrifugation des Rohextrakts bei 120.000 x g (Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen \pm Standardabweichung, in Tris-HCl-Puffer, pH 7,5).

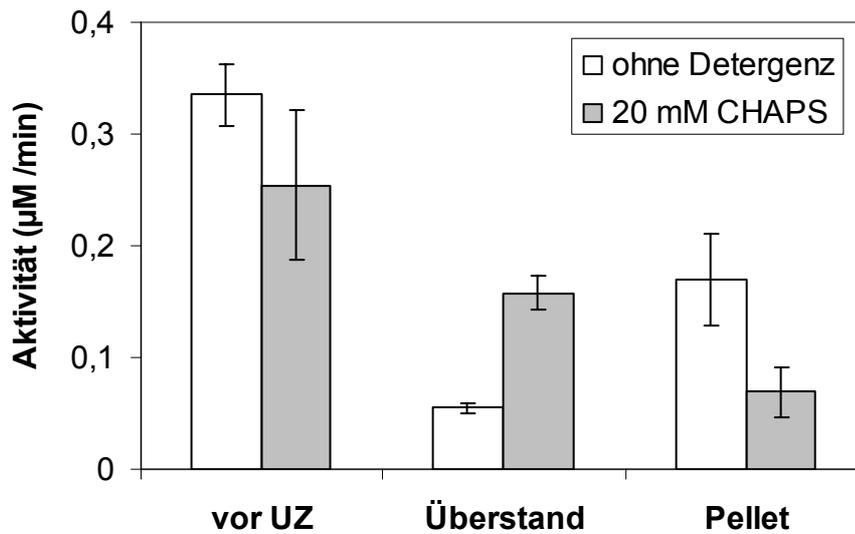


Abb. 19. Direkte Solubilisierung der TCB-Dehalogenase-Aktivität aus intakten Zellen. Dargestellt ist die Aktivität der Zellsuspensionen vor Ultrazentrifugation (UZ) sowie der Fraktionen nach Ultrazentrifugation bei 100.000 x g (Mittelwerte aus Dreifach-Ansätzen \pm Standardabweichung, in Tris-HCl-Puffer, pH 7,5).

3.3.4 Säulenchromatographie

Die Anionenaustausch-Chromatographie wurde als Methode zur Reinigung der TCB-Dehalogenase getestet. Mit CHAPS solubilierte Dehalogenase-Aktivität konnte an MonoQ-Adsorbens gebunden und anschließend durch Erhöhung der Ionenstärke eluiert werden (Abb. 20). Eluiert wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-1 M). Die Dehalogenase-Aktivität eluierte bei etwa 200-300 mM NaCl. Aufgrund der sehr geringen Proteinkonzentration konnten mit Hilfe der SDS-PAGE keine Proteine in den eluierten Fraktionen nachgewiesen werden. Als weitere chromatographische Aufreinigungsmethode wurde die Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Methyl- oder Phenylsepharose als Adsorbens getestet. Unter den gewählten Bedingungen fand jedoch keine Bindung der Dehalogenase-Aktivität an die Säule statt.

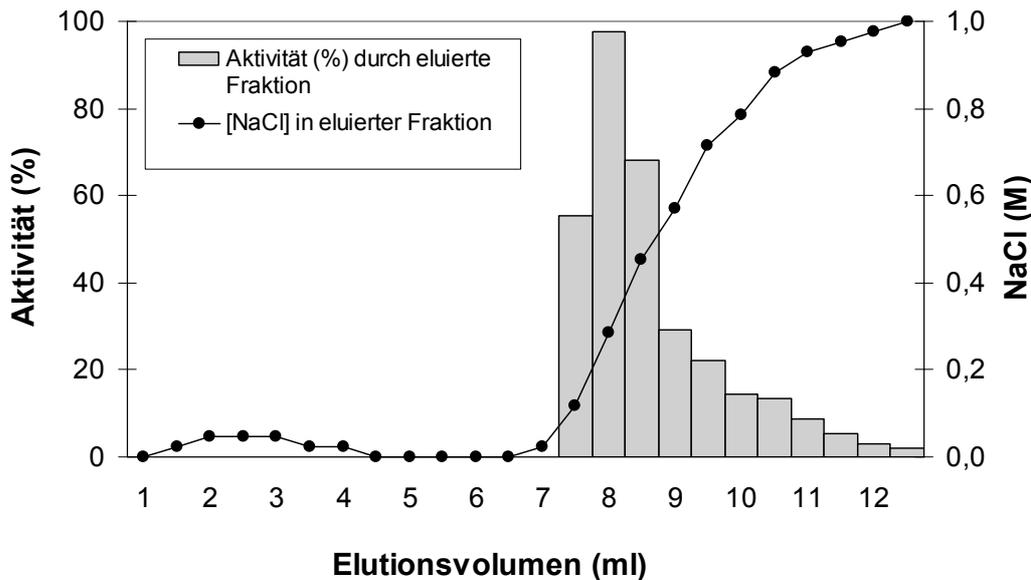


Abb. 20. Elution der 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität aus einer MonoQ-Säule durch Erhöhung der NaCl-Konzentration. Dargestellt ist die Aktivität (Anteil des umgesetzten TCB in Prozent) der eluierten Fraktionen (in Tris-HCl-Puffer, pH 7,5). Die NaCl-Konzentration wurde indirekt über die Messung der Leitfähigkeit der eluierten Fraktionen ermittelt.

3.4 Aufreinigung der Dehalogenase-Aktivität durch native PAGE

Solubilisierete Membranproteine wurden durch native Gelelektrophorese unter aeroben Bedingungen aufgetrennt. Anschließend konnte Dehalogenase-Aktivität in Gelfragmenten gemessen werden. Durch Abgleich mit einer weiteren Gelspur, dessen Proteinbanden durch Silberfärbung visualisiert wurden, konnten Aktivitätsspeaks bestimmten Proteinbanden zugeordnet werden (Abb. 21).

3.4.1 Native TDC-PAGE

3.4.1.1 Aufreinigung der 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität

Mit CHAPS solubilisierete und über Membranfilter mit einem *cut-off* von 50 kDa konzentrierte Membranproteine wurden über TDC-PAGE aufgetrennt (Abb. 22). Dehalogenase-Aktivitätstests mit Gelfragmenten aus einer nicht gefärbten Spur zeigten, dass der größte Anteil 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität in einem Gelfragment konzentriert war, das mit einer starken Proteinbande einer silbergefärbten Spur korrespondierte („aktive Proteinbande“, Abb. 22, Spur 1).

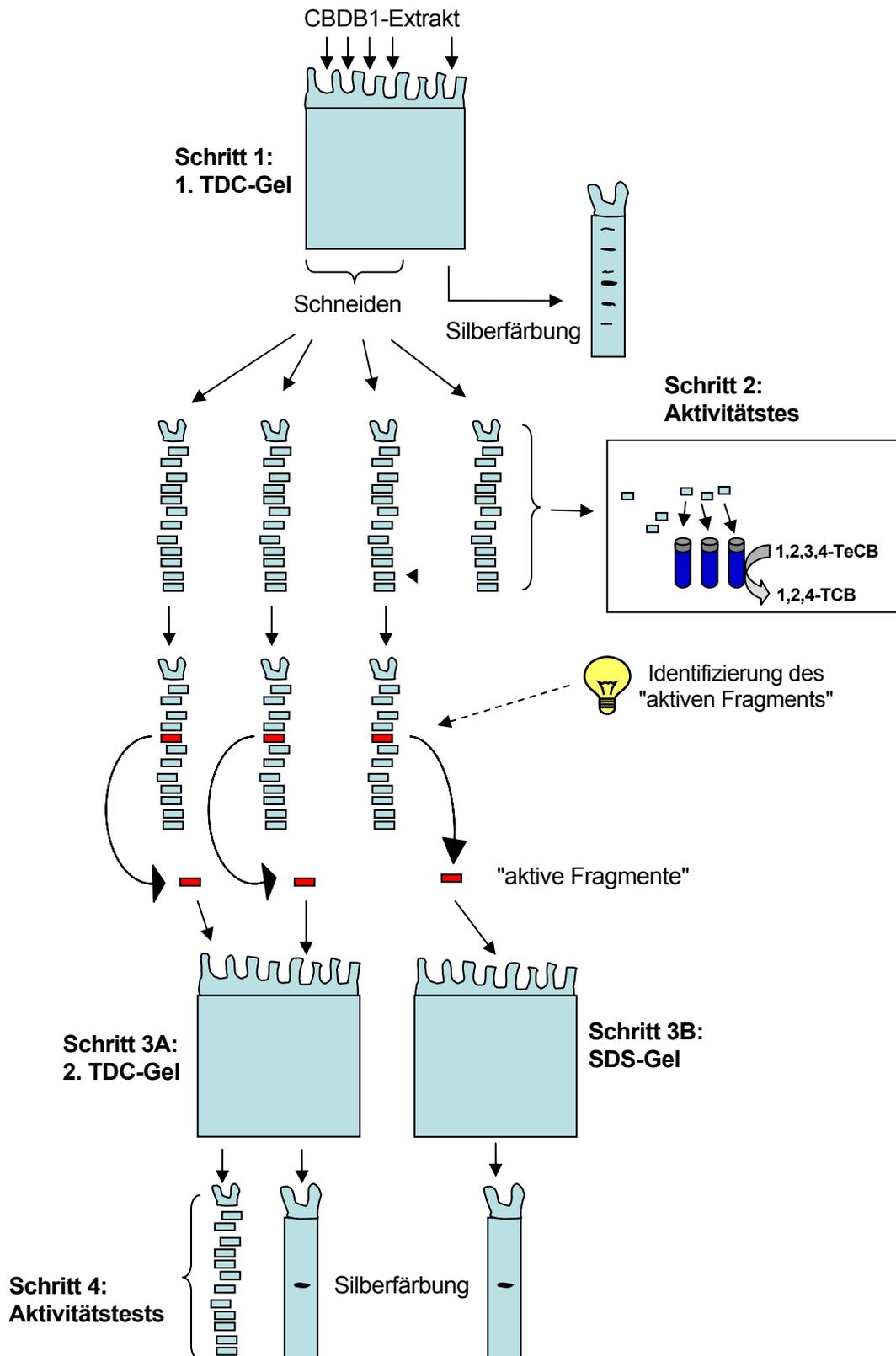


Abb. 21. Schematische Darstellung der Aufreinigung der Chlorbenzol-Dehalogenase über TDC- und SDS-PAGE. Eingesetzt wurden mit CHAPS solubilisierte und über 50 kDa-Membranfilter konzentrierte Membranproteine aus Stamm CBDB1. Gelspuren wurden für eine Silberfärbung (Referenzspur), Aktivitätstests oder einen Transfer auf ein weiteres Gel verwendet. Markerproteine sind nicht dargestellt. Siehe Text für weitere Erläuterungen.

Die Proteine entsprechender Gelfragmente aus drei weiteren ungefärbten Spuren wurden eluiert und entweder für eine zweite TDC-PAGE oder eine SDS-PAGE eingesetzt (Abb. 23). Die zweite TDC-PAGE diente der Überprüfung eines erfolgreichen Transfers der aktiven Proteinbande. Nach erfolgter Elektrophorese wies eine mit aktivem Proteineluat beladene und mit Silber gefärbte Spur eine einzelne Bande auf (Abb. 23A, Spur 2). Über Dehalogenase-Aktivitätstests mit einer ungefärbten Spur aus diesem Gel konnte diese Bande erneut mit Dehalogenase-Aktivität korreliert werden. Nach SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung zeigte sich in der mit aktivem Eluat beladenen Spur eine deutliche Proteinbande in der 45 kDa-Region (Abb. 23B, Spur 2). Die Bande wurde für eine massenspektrometrische Analyse aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorff-Gefäß übertragen.

3.4.1.2 Dechlorierung verschiedener Chlorbenzolkongenerer durch TDC-Gelfragmente

Nach erfolgter TDC-PAGE wurden die Gelfragmente auf eine Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCB, 1,2,3-TCB und PeCB überprüft. Die Inkubationszeit betrug jeweils 24 h. 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität wurde in verschiedenen Gelfragmenten detektiert. Zwei auseinander liegende Gelfragmente, die jeweils mit starken Proteinbanden der mit Silber gefärbten Gelspur korrespondierten, wiesen eine vergleichsweise hohe Aktivität auf, wobei die stärkere Bande mit höherer relativer Mobilität eine Produktbildung von 35 μM 1,2,4-TCB und die schwächere Bande eine Produktbildung von 20 μM 1,2,4-TCB aufwies. Einige weitere Banden zeigten ebenfalls leichte Aktivität ($<3 \mu\text{M}$ 1,2,4-TCB). 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität (Produktbildung 1 μM 1,3-DCB) konnte lediglich in dem Fragment gefunden werden, das mit dem am stärksten 1,2,3,4-TeCB dechlorierenden Fragment korrespondierte. Diesem Fragment konnte auch eine sehr schwache PeCB-Dehalogenase-Aktivität zugeordnet werden: In dem entsprechenden Ansatz wurde 1,2,4,5-TeCB in sehr geringer Konzentration ($<1 \mu\text{M}$) nachgewiesen.

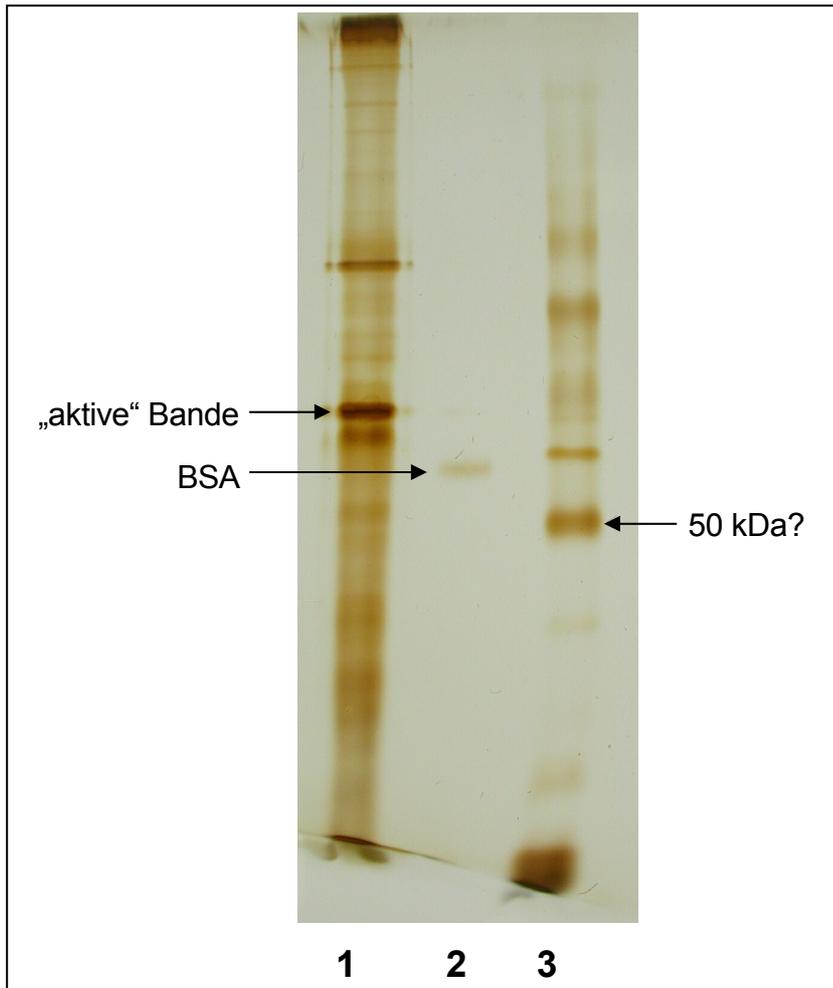


Abb. 22. TDC-PAGE von Membranproteinen aus Stamm CBDB1. Spur 1, CBDB1-Extrakt; Spur 2, 100 ng BSA (67 kDa); Spur 3, Markerproteine 20-100 kDa. Bei der mit einem Pfeil gekennzeichneten starken Bande der Markerproteinspur handelt es sich vermutlich um das 50 kDa-Protein, da dieses in der Markerproteinlösung in höherer Konzentration vorlag als die anderen Proteine (vergl. Abb. 23B, Spur 1). Eine Größenordnung der anderen Markerproteine war aufgrund der unvollständigen Trennung im TDC-Gel nicht möglich.

3.4.1.3 Massenspektrometrische Analyse des Proteins

Für die Bestimmung der Proteinprobe wurde die Massenspektrometrie gewählt, da diese eine Identifikation von sehr niedrig konzentrierten Proteinen ermöglicht (7). Bei der LC-ESI-MS/MS erfolgt zunächst ein Verdau der Proteinprobe mit spezifisch schneidenden Proteasen, häufig Trypsin. Die entstehenden Peptide (*precursor ions*) werden über HPLC aufgetrennt und ihre Massen im ersten Massenspektrometer analysiert. Anschließend werden die Peptide weiter fragmentiert und die Massen der entstehenden kurzen Peptide

(*product ions*) in einem zweiten Massenspektrometer bestimmt, wodurch eine Ableitung von Aminosäuresequenzinformation („*sequence tag*“) ermöglicht wird. Über einen Abgleich mit entsprechenden Genomsequenzdatenbanken kann das entsprechende Protein identifiziert werden (7).

Die Analyse der aus dem SDS-Gel isolierten Proteinbande (Abb. 23B, Spur 2) über nanoLC-ESI-MS/MS ergab keine aussagekräftigen Ergebnisse, was vermutlich auf eine ungenügende Probemenge zurückzuführen ist. Bei den drei identifizierten *de novo*-Sequenzen handelte es sich in zwei Fällen um Trypsin-Fragmente und in einem Fall um eine Sequenz ohne jegliche Ähnlichkeit zu den aus den RDH-Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen oder den Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken.

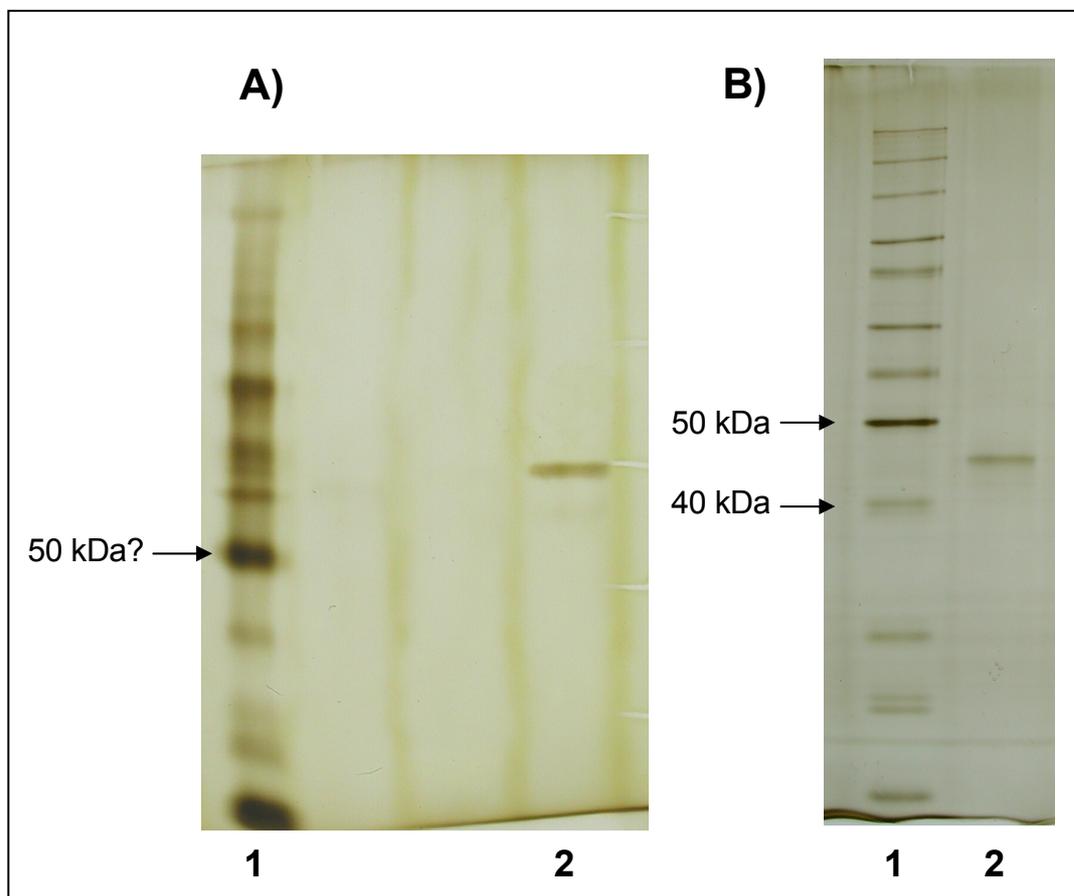


Abb. 23. Auftrennung eluierter aktiver Proteinfraktionen über PAGE. A) Zweite TDC-PAGE. B) SDS-PAGE. Spur 1 (beide Gele), Markerproteine 20-100 kDa; Spur 2 (beide Gele), Eluat aus aktivem Gelfragment der ersten TDC-PAGE.

3.4.2 Native PAGE nach Schägger und von Jagow

In einem modifizierten nativen Gelelektrophoresesystem nach Schägger und von Jagow (99) wurde ebenfalls eine klare Trennung von CBDB1-Proteinen erreicht. 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität (Produkt 1,2,4-TCB) konnte in Gelfragmenten gemessen und mit Proteinbanden korreliert werden (44). Die besten Resultate wurden mit einem Gelkonzentrationsgradienten von 12,5–17,5% erreicht. 1,2,3,4-Dehalogenase-Aktivität konnte jeweils in mehreren Gelfragmenten gemessen werden, wobei wie bei der TDC-PAGE ein bis zwei Aktivitätspeaks auftraten. Ebenso konnte dem Gelfragment mit der höchsten 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität eine geringe PeCB-Dehalogenase-Aktivität (Produkt 1,2,4,5-TeCB) zugeordnet werden. Die exakte Korrelation der Aktivität mit Proteinbanden wurde durch eine inhomogene Streckung der mit Silber gefärbten Gelspur erschwert, die vermutlich durch den Gelkonzentrationsgradienten bedingt war.

3.4.3 Native isoelektrische Fokussierung

Solubilisierte Membranproteine von Stamm CBDB1 wurden über native isoelektrische Fokussierung (34, 100) in Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten unter aeroben Bedingungen aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung wurde unter Variation der Versuchsbedingungen wie Pufferzusammensetzung (Konzentration von Triton X-100), Weite des pH-Gradienten oder Probenauftragsort (basisches/saures Ende des Gelstreifens) mehrfach durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen war ein reproduzierbarer Nachweis von 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität in den Gelstreifen nach Beendigung des Laufs nicht möglich. In zwei Versuchen wurde eine sehr geringe Dehalogenase-Aktivität gemessen; in einem Fall in einem Gelfragment, das dem Probenauftragsort entsprach, im zweiten Fall in einem Gelfragment, das sich in der Nähe des Probenauftragsorts (Probenauftrag am basischen Ende bei pH 10) befand.

3.5 Detektion und Analyse Dehalogenase-homologer Gene in *Dehalococcoides*-Stämmen

3.5.1 Blast-Suche nach RDH-Genen im Genom von *Dehalococcoides ethenogenes*

Die Genomsequenz von *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 ist über die Website von TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>) zugänglich. Bisher sind die multiplen RDH-Gene (bzw. „putativen reduktiven Dehalogenase-Gene“) von Stamm 195 nicht über eine Datenbank als annotierte Gene adressierbar. Es ist jedoch möglich, eine Blast-Suche über die TIGR-Website durchzuführen. Um die 17 RDH-Sequenzen zu erhalten, wurde eine Blast-Suche mit dem *tceA*-Gen von Stamm 195 (69) durchgeführt. Die auf diese Weise ermittelten RDH-Sequenzen wurden mit den von Villemur *et al.* (119) publizierten RDH-Sequenzen abgeglichen. Alle für die folgenden Versuche verwendeten Primer sind von diesen RDH-Sequenzen abgeleitet (45, 53).

3.5.2 Amplifikation von RDH-Genen aus Stamm CBDB1 und Stamm FL2

PCR-Produkte mit der zu erwartenden Länge von 1,7 kb wurden mit dem Primerpaar RRF2/B1R aus genomischer DNA von Stamm CBDB1 oder Stamm FL2 amplifiziert. Insgesamt wurden 99 Klone, davon 51 für Stamm CBDB1 (mit *rdh*_{CBDB1} bezeichnet) und 48 für Stamm FL2 (mit *rdh*_{FL2} bezeichnet) erhalten. Mit Hilfe einer Restriktionsanalyse konnten 13 verschiedene Restriktionsmuster innerhalb der CBDB1-Klonbibliothek sowie 14 Restriktionsmuster innerhalb der FL2-Klonbibliothek unterschieden werden (Abb. 24). Zehn Restriktionsmuster waren bei *rdh*_{CBDB1}- und *rdh*_{FL2}-Klonen identisch. Die Inserts von repräsentativen *rdh*_{CBDB1}- und *rdh*_{FL2}-Klonen wurden sequenziert. Alle Sequenzen enthielten einen fast vollständigen orfA (1350–1495 bp Länge), bei dem lediglich die ersten 45-60 Nukleotide am 5'-Ende fehlten, sowie etwa 90 Nukleotide von orfB (Abb. 25). Eine Ausnahme stellte das orfA-Gen von *rdh10*_{FL2} (*rdhA10*_{FL2}) dar, bei dem zusätzlich 250-260 Nukleotide am 5'-Ende fehlten, was möglicherweise durch ein *Mispriming* des für die PCR eingesetzten Vorwärtsprimers RRF2 bedingt war.

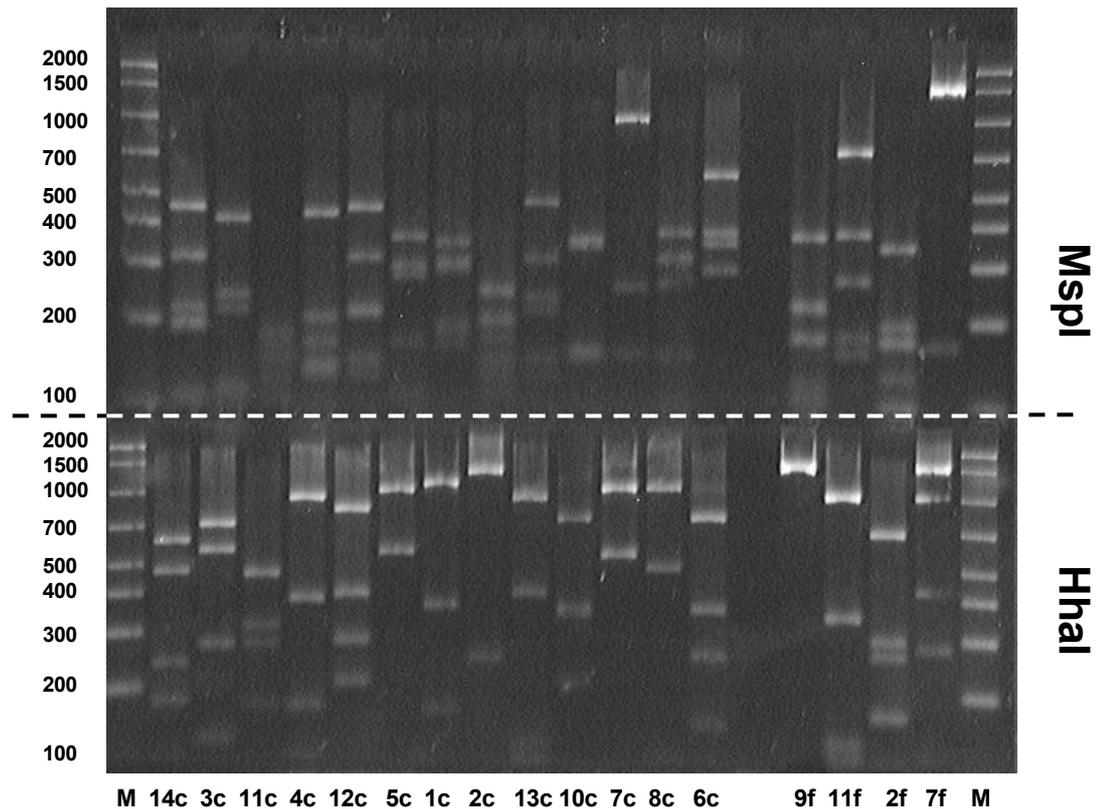


Abb. 24. Restriktionsanalyse von RDH-Sequenzen. PCR-Amplikons (1,7 kb) wurden jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *MspI* oder *HhaI* verdaut. Dargestellt sind die Restriktionsmuster der CBDB1-Klone *rdh1-8*_{CBDB1} und *rdh10-14*_{CBDB1} (mit „c“ markiert) sowie die in der CBDB1-Genbibliothek nicht vorkommenden Restriktionsmuster von FL2-Klonen (markiert mit „f“; *rdh2*_{FL2}, *rdh7*_{FL2}, *rdh9*_{FL2}, *rdh11*_{FL2}). M, DNA-Marker, 100-2000 bp.

Im Rahmen einer Studienarbeit (73) wurde eine zusätzliche RDH-Sequenz aus Stamm CBDB1 (mit *rdh9*_{CBDB1} bezeichnet) mit Hilfe der degenerierten Primer mern2 und mern5 amplifiziert (Abb. 25). Das Amplikon enthielt das vollständige 5'-Ende von *orfA* einschließlich der Twin-Arginin-Signalsequenz, was darauf hindeutet, dass der Vorwärtsprimer etwa 180 Nukleotide stromaufwärts der eigentlichen Targetsequenz gebunden hat. Mit Hilfe einer zweiten PCR wurde die Sequenz am 3'-Ende verlängert, so dass ein komplettes *orfA*-Gen erhalten wurde. Dieses *orfA*-Gen (*rdhA9*_{CBDB1}) hat eine Länge von 1488 bp und stellt das erste aus Stamm CBDB1 erhaltene komplette *rdhA*-Gen dar (Abb. 26). Zwei weitere 500 bp-Sequenzen (mit *rdhA15*_{CBDB1} und *rdhA16*_{CBDB1} bezeichnet) wurden mit dem Primerpaar *fdehal/rdehal* aus Stamm CBDB1 amplifiziert (Abb. 25).

In anderen Untersuchungen (45) konnte mit *tceA*-spezifischen Primern aus Stamm FL2 ein Amplikon mit hoher Ähnlichkeit zu dem *tceA*-Gen von *D. ethenogenes* Stamm 195 (99,3% Identität auf der Aminosäuresequenzebene) amplifiziert werden. Dagegen wurde mit denselben Primern kein *tceA*-Amplikon in Stamm CBDB1 erhalten.

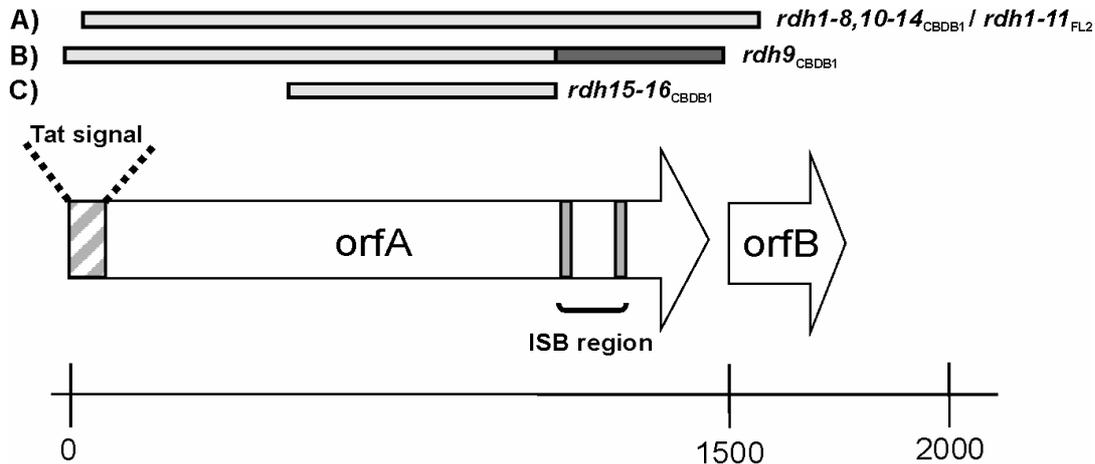


Abb. 25. Organisation der aus Stamm CBDB1 und Stamm FL2 amplifizierten RDH-Gene. A) Sequenzen, die mit dem Primerpaar RRF2/B1R amplifiziert wurden. B) Sequenz *rdh9*_{CBDB1}, die mit dem Primerpaar mern2/mern5 erhalten und durch zusätzliche PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar mintF/B1R erweitert wurde (schattiert). C) Sequenzen, die mit dem Primerpaar rdehal/rdehal amplifiziert wurden. OrfA stellt den offenen Leserahmen dar, der die katalytisch aktive reduktive Dehalogenase kodiert, orfB kodiert ein kleines hydrophobes B-Protein. Tat signal, Twin-Arginin-Signalsequenz einschließlich des Consensusmotivs RRXFVK; ISB region, Eisen-Schwefel-Cluster-Bindungsregion. Der Maßstab zeigt die Nukleotidposition an (1= Startcodon von orfA).

3.5.3 Sequenzanalyse der RDH-Gene

3.5.3.1 Vergleich mit anderen Sequenzen aus der Datenbank

Die *rdhA*_{CBDB1}- und *rdhA*_{FL2}-Sequenzen wiesen die höchste Ähnlichkeit zu einer Gruppe von Genen, bestehend aus dem *tceA*-Gen von *D. ethenogenes* Stamm 195, dem *tceA*-Gen von Stamm FL2 (45), und *tceA*-Genen, die in anderen Untersuchungen aus drei Chlorethen dechlorierenden Mischkulturen amplifiziert wurden (GenBank *accession numbers* AAN85590, AAN85592, und AAN85594), auf. Eine Blast-Suche ergab die besten Datenbank-Treffer (*E-value* 10^{-31} bis 10^{-61}) für Alignments von *rdhA1-14*_{CBDB1} und *rdhA1-11*_{FL2} mit dem charakterisierten *tceA*-Gen von Stamm 195. Wie durch paarweise

Alignments der abgeleiteten Aminosäuresequenzen gezeigt wurde, waren *rdhA1-14*_{CBDB1} und *rdhA1-11*_{FL2} 27-33% identisch mit dem *tceA*-Gen von Stamm 195. Die 500 bp-Fragmente *rdhA15*_{CBDB1} und *rdhA16*_{CBDB1} wiesen 30% bzw. 21% Identität zu *tceA* auf.

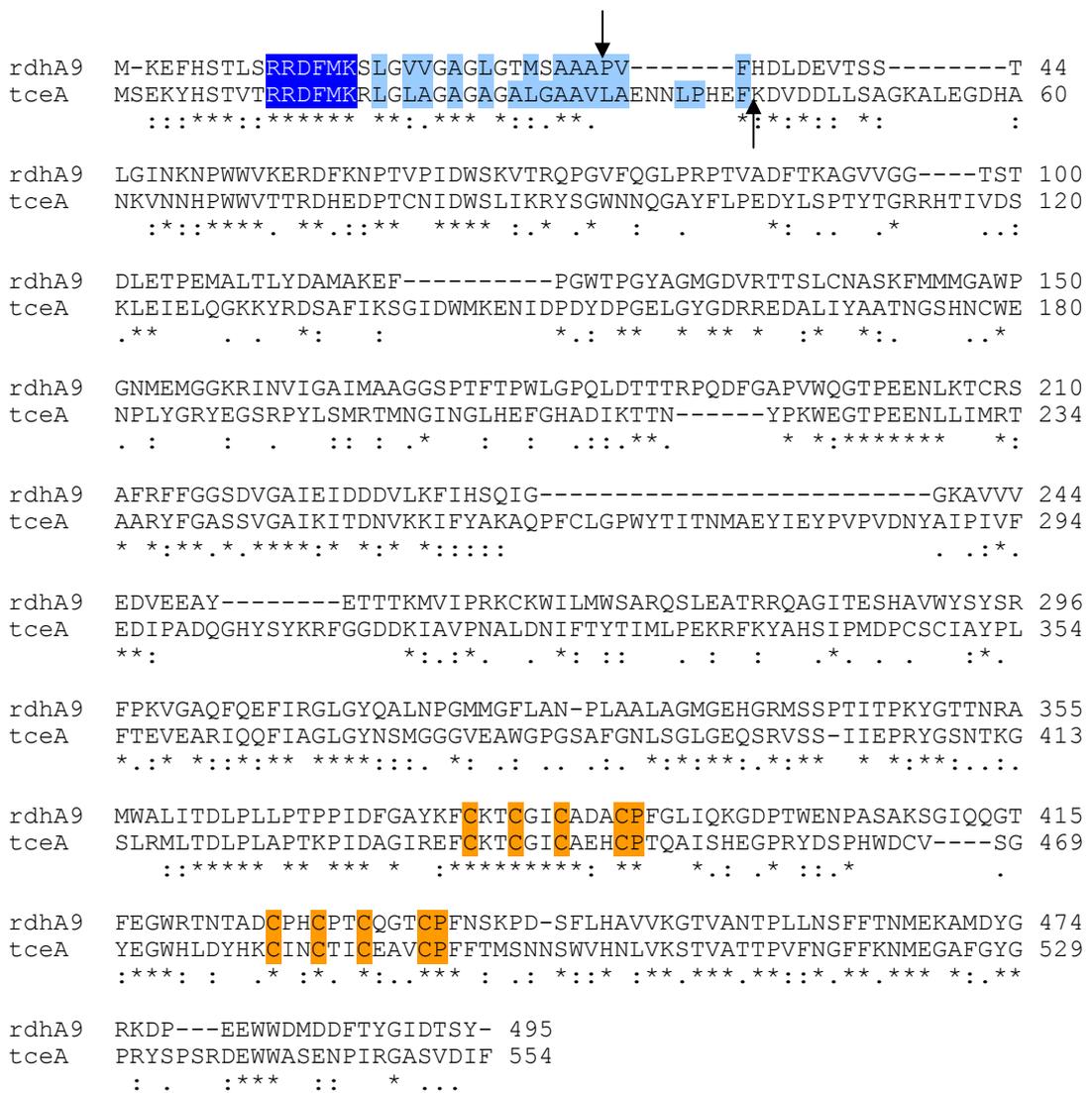


Abb. 26. Sequenzalignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *rdhA9*_{CBDB1} aus Stamm CBDB1 und *tceA* aus Stamm 195. Die in der Unterzeile angegebenen Symbole markieren den Grad der Konservierung entsprechend ClustalW-Konvention (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Konservierte Reste der Twin-Arginin-Signalsequenz und der Bindungsmotive von Eisen-Schwefel-Clustern sind unterlegt. Die Pfeile zeigen vermutliche Protease-Spaltstellen für *rdhA9*_{CBDB1} (Vorhersage über das Programm SignalP) bzw. *tceA* (69) an.

Einige *rdhA*_{CBDB1}- und *rdhA*_{FL2}-Gene zeigten hohe Ähnlichkeit (blastx *E*-value $< 10^{-35}$) zu der Sequenz *rdh63A* (GenBank *accession number* AAO15649), einem RDH-Gen, das aus einem 2-Bromphenol abbauenden mikrobiellen Konsortium gewonnen wurde (93). Datenbank-Treffer mit kleinen *E*-values (*E*-value 10^{-10} bis 10^{-30}) wurden auch für Alignments der *rdhA*_{CBDB1}- und *rdhA*_{FL2}-Gene mit anderen bekannten reduktiven Dehalogenase-Genen, z.B. den *pceA*-Genen von *Sulfurospirillum multivorans*, *Dehalobacter restrictus* und *Desulfitobacterium* spp. und den *cprA*-Genen von *Desulfitobacterium* spp., erhalten. Für andere funktionell charakterisierte Gene, z.B. eine Phosphoglycerat-Mutase aus *Clostridium tetanii* sowie eine periplasmatische [Fe] Hydrogenase und eine Molybdän-haltige Formylmethanofuran Dehydrogenase-Untereinheit aus *Methanosarcina mazei*, lieferte die Blastx-Suche nur partielle Alignments mit hohen *E*-values ($>10^{-4}$).

3.5.3.2 Phylogenetische Analyse

Abgeleitete Aminosäuresequenzen von fast vollständigen *orfA*-Genen aus *rdhA*_{CBDB1}- und *rdhA*_{FL2}-Sequenzen (404 - 489 Aminosäurereste) wurden zur Konstruktion eines phylogenetischen Baums eingesetzt, in den die 17 RDH-Gene von Stamm 195 (*rdhA1-17*_{DE}; [119]), die sieben in Stamm BAV1 gefundenen RDH-Gene (*rdhA1-7*_{BAV1}; [53]), sowie reduktive Dehalogenase-Gene aus anderen dechlorierenden Bakterien integriert wurden (Abb. 27). Alle *Dehalococcoides* RDH-Gene außer *rdhA16*_{DE} und *rdhA17*_{DE} bildeten eine gemeinsame Gruppe. Des Weiteren bildeten sieben *rdhA*_{CBDB1}-Gene (*rdhA8-14*_{CBDB1}), fünf *rdhA*_{FL2}-Gene (*rdhA7-11*_{FL2}) und drei *rdhA*_{BAV1}-Gene (*rdhA4-6*_{BAV1}) einen Cluster mit sechs *rdhA*_{DE}-Genen (*rdhA1-6*_{DE}) sowie dem *tceA*-Gen-Subcluster (Cluster I; Abb. 26). Ein zweiter Cluster (Cluster II) setzte sich aus sechs *rdhA*_{CBDB1}-Genen (*rdhA1-6*_{CBDB1}), sechs *rdhA*_{FL2}-Genen (*rdhA1-6*_{FL2}), zwei *rdhA*_{BAV1}-Genen (*rdhA1*_{BAV1}, *rdhA7*_{BAV1}) und fünf *rdhA*_{DE}-Genen (*rdhA10-14*_{DE}) zusammen. Eine eindeutige Zuordnung von *rdhA7*_{CBDB1} zu einem der beiden Cluster war nicht möglich. *rdhA16*_{DE} und *rdhA17*_{DE} hatten nur begrenzte Ähnlichkeit mit den *rdhA*_{CBDB1}- und *rdhA*_{FL2}-Genen, ließen sich aber separaten Clustern aus *cprA*-Genen bzw. *pceA*-Genen von *Desulfitobacterium* spp. und *Dehalobacter restrictus* zuordnen.

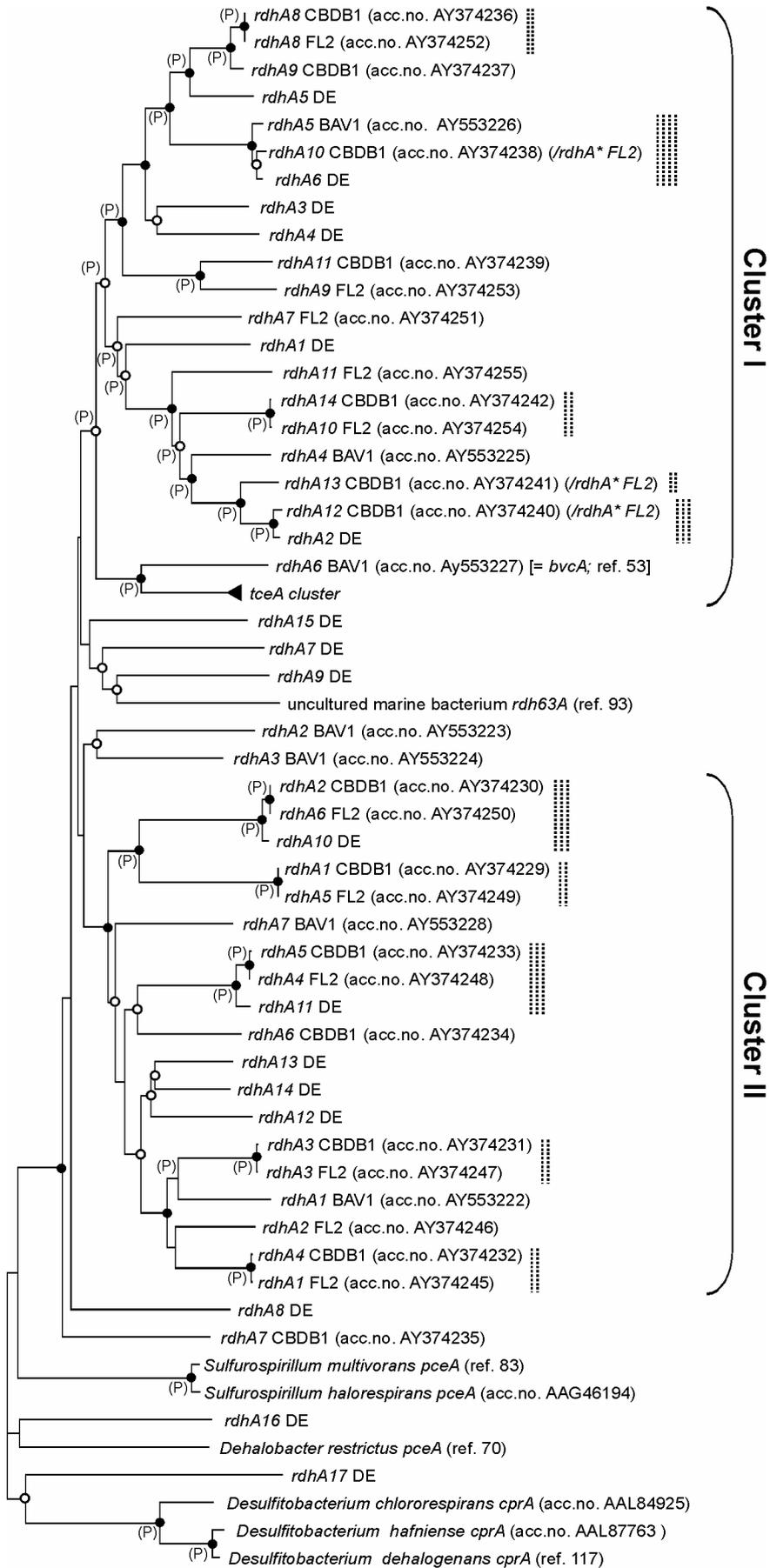


Abb. 27. Phylogenetische Analyse von RDH-Genen aus *Dehalococcoides*. Das dargestellte Dendrogramm wurde mit der Neighbor-Joining Methode (97) aus abgeleiteten Aminosäuresequenzen fast vollständiger *orfA*-Gene erstellt (für weitere Erläuterungen siehe Abb. 25 und Text). Zur Prüfung der Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1000-facher Replikation durchgeführt. Verzweigungspunkte, die durch Bootstrap-Werte von 85-100% unterstützt werden, sind durch schwarze Punkte dargestellt. Offene Kreise bezeichnen Bootstrap-Werte von 50-84%. Verzweigungspunkte, die durch die Maximum Parsimony Methode gestützt werden, sind mit (P) markiert. Zusätzliche Klone von Stamm FL2 (*rdhA*_{FL2}*; diese Klone wurden nicht sequenziert) wurden gemeinsam mit den *rdhA*_{CBDB1}-Genen, die identische Restriktionsmuster aufwiesen, dargestellt. Punktiierte Doppel-, Dreifach- und Vierfachlinien markieren jeweils Subcluster sehr ähnlicher Gene von zwei, drei oder vier verschiedenen *Dehalococcoides*-Stämmen (siehe Text für weitere Erläuterungen). Abkürzungen: *tceA*, Trichlorethen-Dehalogenase, *pceA*, Tetrachlorethen-Dehalogenase, *cprA*, Chlorphenol-Dehalogenase. Der *tceA*-Cluster enthält die *tceA*-Gene von *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 (accession number AAF73916), Stamm FL2 (accession number AY165309) und drei Chlorethen dechlorierenden Mischkulturen (accession numbers AAN85590, AAN85592, AAN85594). Der Maßstab entspricht 20% Sequenzunterschied.

Mehrere *rdhA*_{CBDB1}-Gene wiesen eine hohe Sequenzidentität zu *rdhA*_{FL2}-Genen auf (Abb. 28). Sechs *rdhA*_{CBDB1}-Gene mit 98,5 – 99,8% Sequenzidentität zu *rdhA*_{FL2}-Genen und ein *rdhA*_{CBDB1}-Gen mit 100% Sequenzidentität zu einem *rdhA*_{FL2}-Gen basierend auf der abgeleiteten Aminosäuresequenz wurden identifiziert. Zusätzlich stimmten die Restriktionsmuster von drei Inserts der FL2-Klonbibliothek mit drei verschiedenen Restriktionsmustern von Inserts der CBDB1-Klonbibliothek überein, was auf weitere Sequenzpaare mit hoher Ähnlichkeit hinwies. Vier *rdhA*_{DE}-Gene wurden identifiziert, die 86,5 – 94,4% Identität zu *rdhA*_{CBDB1}- und *rdhA*_{FL2}-Genen besaßen und somit vier Subcluster bildeten (Abb. 27). Des Weiteren wies ein *rdhA*_{BAV1}-Gen (*rdhA*_{5BAV1}; Cluster I) 90,8 – 93,1% Sequenzidentität zu den Genen eines Subclusters auf. Insgesamt wurden 10 Subcluster identifiziert, die sich jeweils aus 2 - 4 RDH-Genen von verschiedenen *Dehalococcoides*-Stämmen zusammensetzten (Abb. 27).

3.5.4 Bindungsmotive von Eisen-Schwefel-Clustern

Wie auch für andere Dehalogenasen beschrieben, enthielten alle *rdhA*_{CBDB1}- und *rdhA*_{FL2}-kodierte Aminosäuresequenzen zwei Bindungsmotive von Eisen-Schwefel-Clustern (ISB-Motive, nach „iron-sulfur cluster binding“) in der C-terminalen Region (Abb. 28). Das erste ISB-Motiv in allen Sequenzen entsprach der konservierten Consensussequenz CXXCXXCXXXCP, die charakteristisch für bakterielle Ferredoxine ist (16). Im zweiten ISB-Motiv trat dieses Muster

hingegen in abgewandelter Form auf. In vierzehn von 21 Genen aus Cluster I entsprach das zweite ISB-Motiv dem Consensus CXXCXXCXXCP. In den anderen sieben RDH-Genen aus Cluster I waren die ersten zwei Cysteinreste des zweiten ISB-Motivs durch drei, vier oder sechs Reste anstelle von zweien getrennt (Abb. 28). In allen fünf RDH-Genen aus Cluster I mit vier oder sechs Resten zwischen den ersten zwei Cysteinen des zweiten ISB-Motivs (*rdhA12-14*_{CBDB1}, *rdhA10*_{FL2}, *rdhA2*_{DE}) war ein fünfter Cysteinrest stromaufwärts des zweiten ISB-Motivs vorhanden. Dieses Motiv CX₄CX_nCX₂₋₃CXXXCP wurde auch in *rdhA3*_{DE} und *rdhA4*_{DE} gefunden. In allen *Dehalococcoides* RDH-Genen außerhalb von Cluster I wurden die ersten zwei Cysteinreste durch eine längere Folge von Aminosäuren (8 - 21 Reste) getrennt (*rdhA1-7*_{CBDB1}, *rdhA1-6*_{FL2}, *rdhA7-17*_{DE}, *rdhA1-3*_{BAV1}, *rdhA7*_{BAV1}; Abb. 28). Alle RDH-Gene, die sich durch ein zweites ISB-Motiv mit dicht aufeinander folgenden Cysteinresten auszeichneten (Cluster I), bildeten eine kohärente Gruppe sequenzverwandter Gene, wohingegen die anderen *Dehalococcoides* RDH-Gene, in denen das zweite ISB-Motiv ein weiter entferntes Cystein enthielt, keine phylogenetisch zusammenhängende Gruppe bildeten (Abb. 27).

3.5.5 Consensussequenzen zur Cobalaminbindung

Eine Consensussequenz für die Bindung von Cobalamin DXHXXG...SXL...GG (65) wurde in der C-terminalen Region von *rdhA12*_{DE} gefunden (Cluster II; Abb. 28). Das Consensus-Motiv DXHXXG befand sich zwischen den beiden ISB-Motiven, wohingegen das SXL- und Twin-Glycin-Motiv stromabwärts des zweiten ISB-Motivs lokalisiert waren. Die Sequenzabschnitte zwischen den konservierten Motiven waren in *rdhA12*_{DE} länger (DXHXXG-X₅₀-SXL-X₄₂-GG) als für eine Gruppe von bekannten Cobalamin-abhängigen Enzymen aus anderen Prokaryonten beschrieben (DXHXXG-X₄₁-SXL-X₂₆₋₂₈-GG; [65]). Des Weiteren enthielten zwei *rdhA*_{CBDB1}, drei *rdhA*_{FL2}-Gene und ein *rdhA*_{BAV1}-Gen (*rdhA3-4*_{CBDB1}, *rdhA1-3*_{FL2}, *rdhA1*_{BAV1}; Cluster II) den Consensus DXXHXXG (Abb. 28). Das SXL-Motiv wurde auch in *rdhA3-4*_{CBDB1} und *rdhA1-3*_{FL2} gefunden. *rdhA1*_{BAV1} wies an entsprechender Stelle ebenfalls die Aminosäuren Serin und Leucin auf, die hier allerdings durch fünf Reste getrennt waren. Vier dieser RDH-Gene enthielten das Twin-Glycin-

Motiv, wohingegen zwei Gene einen einzelnen Glycinrest in dem entsprechenden Bereich enthielten (Abb. 28).

3.5.6 N-terminale Region der RDH-Gene

Abgeleitete Aminosäuresequenzen aller mit dem Primerpaar RRF2/B1R amplifizierten Fragmente enthielten N-terminal Bereiche mit hydrophoben Resten, die denjenigen bekannter reduktiver Dehalogenasen entsprachen (Daten nicht dargestellt). Der Vorwärtsprimer RRF2 ist gegen das Consensus-Motiv RRFXK der Twin-Arginin-Signalsequenz gerichtet, was darauf hinweist, dass alle amplifizierten Gene diese Sequenz enthalten, obwohl die exakte Nukleotidzusammensetzung bedingt durch die degenerierte Natur dieses Primers nicht bekannt ist. *rdhA9*_{CBDB1}, eine Sequenz, die mit dem Primerpaar mern2/mern5 amplifiziert wurde, enthielt den vollständigen N-Terminus von orfA einschließlich des Motivs RRDFMK, das auch in *tceA* und 13 der 17 RDH-Gene in Stamm 195 zu finden ist (Abb. 26).

Für alle aus den RDH-Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen konnten mit Hilfe des Programms SignalP theoretische Protease-Spaltstellen im Bereich der Twin-Arginin-Signalsequenz vorhergesagt werden. Ein entsprechender *in silico* Verdau berechnete die Sequenzen der reifen Proteine (siehe 3.5.8).

3.5.7 orfB-Sequenzen

Die amplifizierten N-terminalen orfB-Fragmente (*rdhB*_{CBDB1}, *rdhB*_{FL2}) kodierten überwiegend hydrophobe Aminosäuren und entsprachen damit orfB-Genen wie *tceB* von *D. ethenogenes* Stamm 195 oder *pceB* von *Sulfurospirillum multivorans*, die Operons mit bekannten Dehalogenase-Genen bilden. Die erhaltenen *rdhB*_{CBDB1}- und *rdhB*_{FL2}-Fragmente waren kurz (~90 bp) und ermöglichten daher keine Konstruktion eines phylogenetischen Baums mit hohen Bootstrap-Werten. Die Neighbor-Joining-Analysen mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen dieser kurzen Fragmente unterstützten jedoch die etablierten Subcluster aus den sehr ähnlichen orfA-Genen von verschiedenen *Dehalococcoides*-Stämmen. Sechs *rdhB*_{CBDB1}-Fragmente waren 100% identisch mit sechs *rdhB*_{FL2}-Fragmenten, analog zu den korrespondierenden orthologen *rdhA*_{CBDB1}- und *rdhA*_{FL2}-Genen. Des Weiteren konnte eine stabile Gruppierung der übrigen orfB-Fragmente in Analogie zu den

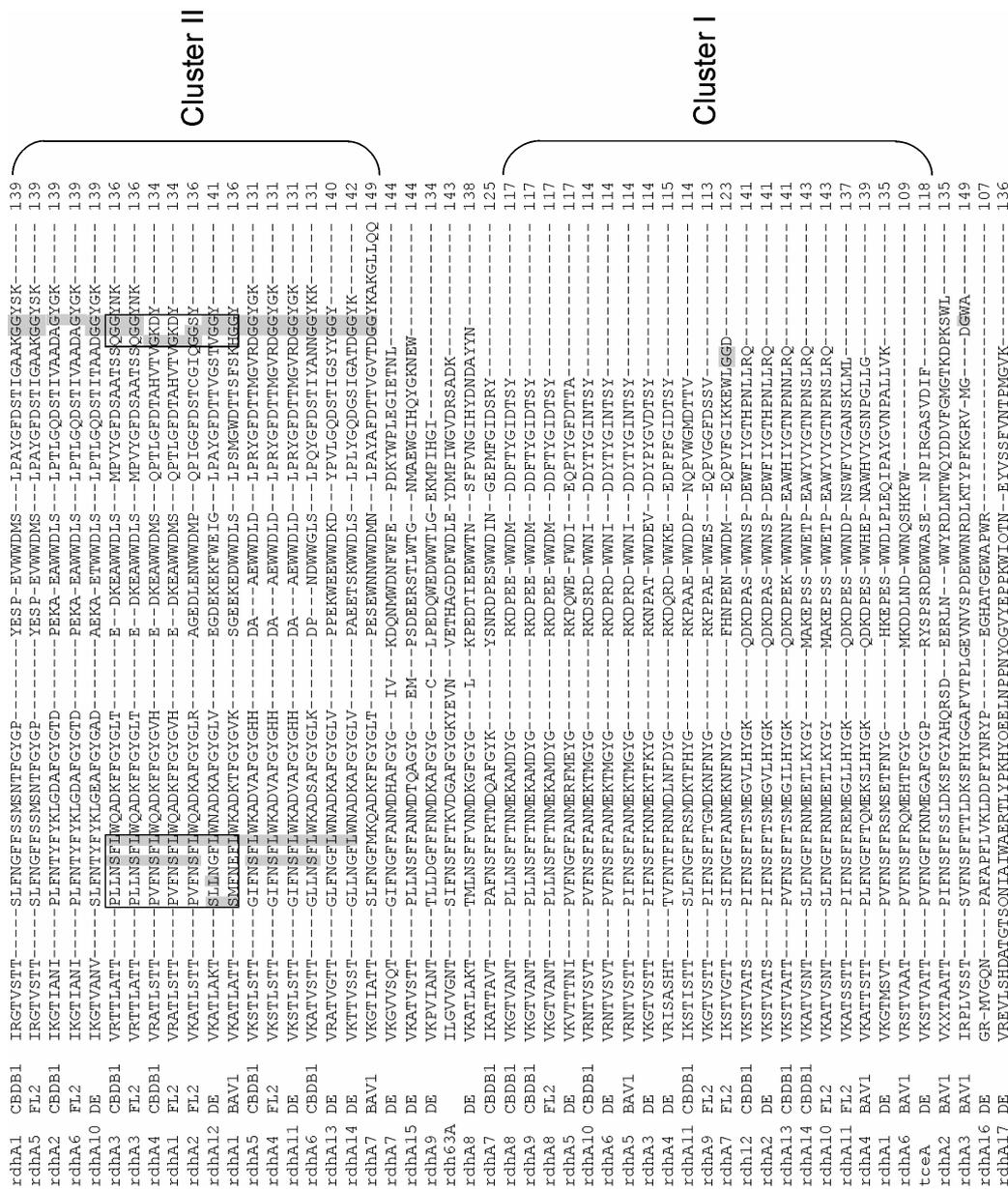


Abb. 28. Sequenzalignment von RDH-Genen aus *Dehalococcoides*. Dargestellt ist die C-terminale Region der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *rdhA*-Gene (*ethtceA* bezeichnet das *tceA*-Gen von *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195; siehe Abb. 27 für alle weiteren Bezeichnungen). Enthalten ist auch Sequenz *rdh63A*, ein aus einem 2-Bromphenol abbauenden bakteriellen Konsortium gewonnenes RDH-Gen (Ref. 93). Um putative Cofaktor-Bindungsstellen zu alignen, wurde das mit ClustalW erstellte Alignment manuell korrigiert. Konservierte Reste der zwei Bindungsmotive von Eisen-Schwefel-Clustern und der Consensussequenz zur Cobalaminbindung sind grau unterlegt. Cobalaminbindungs-Motive in *rdhA3-4*_{CBDB1}, *rdhA1-3*_{FL2}, *rdhA12*_{DE}, und *rdhA1*_{BAV1} sind eingerahmt. In *rdhA12*_{DE} und *rdhA1*_{BAV1} konnte das Motiv (S)XL nicht eindeutig lokalisiert werden (für weitere Erläuterungen siehe Text).

3.5.8 Theoretische Verteilung der RDH-Genprodukte im zweidimensionalen Gel

Um abzuschätzen, ob eine Trennung eventuell vorhandener multipler Dehalogenaseproteine in einem zweidimensionalen Gelsystem möglich ist, wurde die theoretische Verteilung der reifen RDH-Genprodukte nach gelelektrophoretischer Trennung entsprechend des isoelektrischen Punkts (pI; erste Dimension) und der Größe (zweite Dimension) berechnet (Abb. 29). Es zeigte sich, dass die theoretischen Proteine RdhA_{CBDB1}1-14 sich in Bezug auf beide Eigenschaften sehr ähnlich waren. Der pI lag generell bei pH 5,5-6,0, die Größe betrug 51 - 54 kDa. Lediglich RdhA6 wich mit einem pI von pH 6,9 von dieser Tendenz ab, während RdhA7 eine deutlich geringere Größe (48 kDa) aufwies als die anderen Proteine. Die berechnete Größe lag für alle Proteine oberhalb der durch SDS-PAGE abgeschätzten Größe des Proteins mit Chlorbenzol-Dehalogenase-Aktivität (45 kDa; siehe 3.4.1.1).

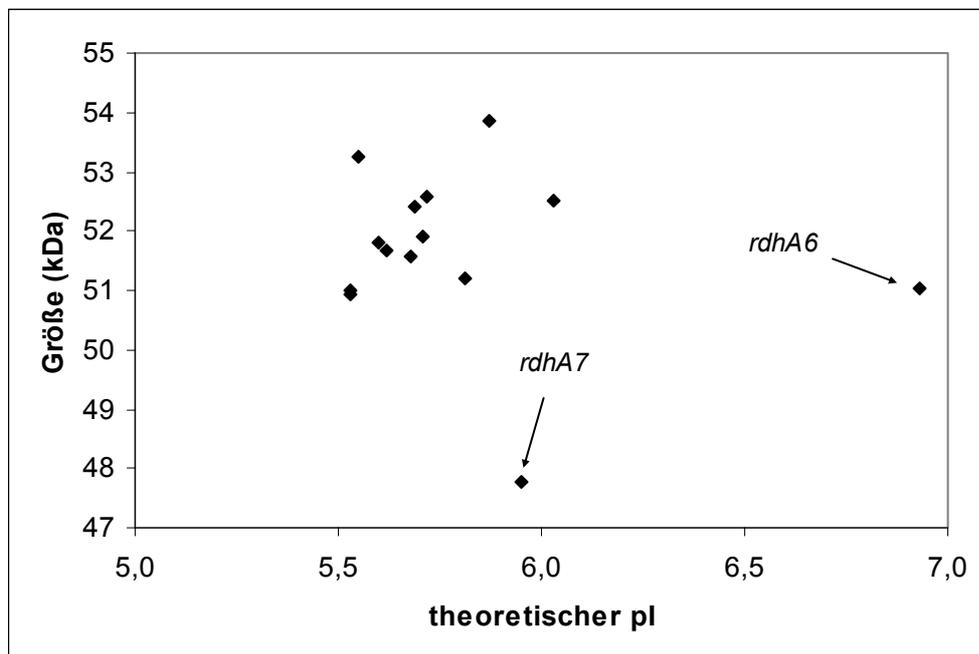


Abb. 29. Theoretische Verteilung der RDH-Genprodukte von Stamm CBDB1 im zweidimensionalen Gel. Protease-Spaltstellen wurden mit dem Programm SignalP vorhergesagt. Größe und pI der theoretischen Proteine (abgeleitete Aminosäuresequenzen ohne TAT-Signalpeptid) wurden mit dem pI-Tool von ExPASy abgeschätzt.

3.6 Untersuchungen zur Aufreinigung von Dehalogenasen über B-Protein/Dehalogenase-Interaktion

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde die vermutete Bindungsinteraktion von B-Protein und reduktiver Dehalogenase als Methode zur Aufreinigung von Dehalogenasen aus Stamm CBDB1 untersucht (122). Zwei *orfB*-Gene, *rdhB5*_{CBDB1} und *rdhB10*_{CBDB1}, wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Maltosebindeprotein-Affinitätstag in *E. coli* exprimiert. Gesamtzellprotein von *E. coli* wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Das Vorhandensein der B-Protein-Fusionsproteine konnte dann durch Westernblot mit einem primären Antikörper gegen das Maltosebindeprotein und einem sekundären, mit Alkalischer Phosphatase markierten Antikörper eindeutig nachgewiesen werden. Die Größe der Fusionsproteine lag bei etwa 52 kDa, entsprechend der Größe des rekombinanten Maltosebindeproteins (42 kDa) plus Fusionspartner RdhB5 bzw. RdhB10 (jeweils ca. 10 kDa).

In einem weiteren Ansatz wurden Versuche zur Bindung von Dehalogenasen aus CBDB1-Extrakt an immobilisierte B-Protein-Fusionsproteine durchgeführt. Als CBDB1-Extrakt wurde eine Lösung aus mit CHAPS solubilisierten Membranproteinen eingesetzt, aus der CHAPS zuvor über Membranfiltration weitgehend entfernt wurde. Über SDS-PAGE aufgetrenntes Gesamtprotein von *E. coli* wurde auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und anschließend drei verschiedene Fragmente einer Proteinspur (10 kDa-, 40 kDa- und 50 kDa-Bereich) mit solubilisierten Membranproteinen aus Stamm CBDB1 inkubiert. Die Nitrocellulose-Membranfragmente wurden anschließend kurz gewaschen und auf 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität getestet. Lediglich die Ansätze mit den 50 kDa-Bereich-Fragmenten, die das B-Protein-Fusionsprotein enthielten, wiesen Dehalogenase-Aktivität auf. In allen Ansätzen, die Nitrocellulose-Membranfragmente enthielten, wurde eine im Vergleich zu den Kontrollansätzen herabgesetzte Gesamtkonzentration an Chlorbenzolen gemessen (siehe 4.5.2).

In parallel durchgeführten optischen Aktivitätstests mit TCA als Elektronenakzeptor auf einer Mikrotiterplatte (122) konnte keine spezifische Dechlorierung durch bestimmte Nitrocellulose-Membranfragmente bestimmt

werden. Kontrollansätze mit Vitamin B₁₂ zeigten hingegen eine Entfärbung in Abhängigkeit der B₁₂-Konzentration.

Mit Hilfe von computergestützten Programmen zur Vorhersage von Transmembranhelizes (TMHMM; [56], [109]) und Sequenzalignments wurde nach möglichen Dehalogenase-Bindungsstellen in B-Proteinen gesucht. Die Analysen ergaben, dass RdhB5 und RdhB10 ebenso wie orfB-kodierte Proteine charakterisierter Dehalogenasen drei Transmembran-Domänen aufweisen. Aus Sequenzalignments von RdhB5 und RdhB10 mit orfB-kodierten Proteinen aus *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 konnte unter anderem das stark konservierte Motiv WYEW abgeleitet werden, das sich auf einem zur Außenseite der Membran orientierten Abschnitt befand (WYEW stellt auch die Targetsequenz des Rückwärtsprimers B1R dar [53]).

4. DISKUSSION

4.1 Zellfreie Dehalogenase-Aktivität mit 1,2,3-TCB und hochchlorierten Benzolen als Elektronenakzeptoren

In dieser Arbeit konnte erstmalig eine reduktive Dechlorierung von PeCB und HCB durch zellfreie Extrakte einer Reinkultur gezeigt werden (43). Adrian *et al.* (3) hatten zuvor eine reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TCB, 1,2,4-TCB und allen TeCB-Isomeren mit Wasserstoff als Elektronendonator nachgewiesen, PeCB und HCB wurden unter den gewählten Kulturbedingungen jedoch nicht durch die Reinkultur dechloriert. Anschließend gelang es Jayachandran *et al.* (48), ein Wachstum von Stamm CBDB1 mit PeCB oder HCB als Elektronenakzeptor nachzuweisen, wenn diese Kongenere dem Kulturmedium als Kristalle zugesetzt wurden.

Reduktive Dehalogenasen aus anaeroben Bakterien, die Chlorbenzoat, Chlorphenole oder chlorierte Ethene als Elektronenakzeptoren nutzen, besitzen spezifische Aktivitäten zwischen 2,5 und 25 nkat/mg in Rohextrakt mit Methylviologen als Elektronendonator (47). Die 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität in Rohextrakt von Stamm CBDB1 wies mit 11 nkat/mg eine ähnliche spezifische Aktivität auf; für 1,2,3,4-TeCB (355 nkat/mg) und PeCB (171 nkat/mg) wurden hingegen deutlich höhere spezifische Aktivitäten bestimmt.

4.2 Unterschiede in der Nutzung chlorierter Elektronenakzeptoren durch verschiedene *Dehalococcoides*-Stämme

Chlorbenzole. Die in Rohextrakten von Stamm CBDB1 beobachteten Dechlorierungswege für hochchlorierte Benzole zu niedriger chlorierten Benzolen entsprachen den für Reinkulturen mit Wasserstoff als Elektronendonator beobachteten Mustern. Die Standard-Redoxpotentiale von Chlorbenzolen liegen mit +310 bis +478 mV (27) im stark positiven Bereich. In Kulturen (4) und in Rohextrakt von Stamm CBDB1 werden bevorzugt doppelt flankierte Chlorsubstituenten entfernt. Dies ist mit einer stärkeren Abnahme der Freien Enthalpie G_o' verbunden als die Dechlorierung von einfach flankierten oder isolierten Chlorsubstituenten (4, 27). Die beobachteten Unterschiede bezüglich der Dechlorierungsraten für die einzelnen Chlorbenzolkongenere

können jedoch nicht durch thermodynamische Betrachtungen erklärt werden. Dies zeigt sich z.B. daran, dass HCB deutlich langsamer als die meisten anderen getesteten Kongenere dechloriert wird, obwohl die reduktive Dechlorierung von HCB mit der stärksten Abnahme an Freier Enthalpie verbunden ist (27).

Die Fähigkeit zur reduktiven Dechlorierung von Chlorbenzolen wurde vor kurzem auch für Stamm 195 (31) und Stamm DF-1, ein *Dehalococcoides*-ähnliches Bakterium, das in einer Mischkultur identifiziert wurde (125), nachgewiesen. Stamm 195, Stamm DF-1 und Stamm CBDB1 weisen einige Unterschiede bezüglich der Dechlorierungsmuster (4) und der Nutzung von Chlorbenzolkongeneren auf. Beispielsweise folgt die HCB-Dechlorierung in Stamm 195 hauptsächlich dem Muster $\text{HCB} \rightarrow \text{PeCB} \rightarrow 1,2,3,5\text{-TeCB} \rightarrow 1,3,5\text{-TCB}$ (31), das auch für Stamm DF-1 gefunden wurde (125), wohingegen die Dechlorierung von HCB in Stamm CBDB1 über die beiden Isomere 1,2,4,5-TeCB und 1,2,3,5-TeCB verläuft und zur Bildung von 1,3,5-TCB und DCBs führt (43, 48). Stamm 195 und Stamm DF-1 sind im Gegensatz zu Stamm CBDB1 nicht in der Lage, mit 1,2,3-TCB oder 1,2,4-TCB als einzigen Elektronenakzeptoren zu wachsen (31, 125). Obwohl bisher nicht bekannt ist, ob die beobachteten Dechlorierungsreaktionen durch ein Enzym oder mehrere Enzyme vermittelt werden, liegt die Vermutung nahe, dass die ausschließlich in Stamm CBDB1 beobachteten Reaktionen durch zusätzliche, in Stamm 195 und Stamm DF-1 fehlende Dehalogenasen katalysiert werden. Das Fehlen einer Interferenz der 1,2,3-TCB-Dechlorierung mit der Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCB bzw. PeCB in Stamm CBDB1 steht im Einklang mit der Annahme, dass die jeweiligen Reaktionen von verschiedenen spezifischen Dehalogenasen katalysiert werden.

Im Gegensatz zu Stamm FL2 dechlorieren Stamm CBDB1 und Stamm 195 chlorierte Benzole, was darauf hindeutet, dass Chlorbenzol-Dehalogenasen nur in Stamm CBDB1 und Stamm 195 vorhanden sind. Allerdings könnten spezifische Kulturbedingungen nötig sein, um eine Dechlorierung von Chlorbenzolen in Stamm FL2 zu induzieren. Eine substratabhängige differentielle Induktion von Dehalogenasen konnte in *Desulfitobacterium* spp. (Siehe Übersichtsartikel [107]) demonstriert werden. In Stamm CBDB1 wurden bei Anzucht mit unterschiedlichen Chlorbenzolkongeneren als

Elektronenakzeptoren jeweils verschiedene relative Dechlorierungsraten für 1,2,3-TCB, PeCB und HCB ermittelt, was darauf hinweist, dass Dehalogenasen durch ihr jeweiliges Substrat induziert werden (48). Im Gegensatz dazu wurde eine konstitutive PCE-Dechlorierung in Kulturen von Stamm 195, die auf TCE, 1,1-DCE oder Dichlorethan gewachsen waren, festgestellt (72).

Andere chlororganische Elektronenakzeptoren. Mittlerweile sind die verschiedenen *Dehalococcoides*-Stämme hinsichtlich der Nutzung einer Vielzahl von haloorganischen Verbindungen charakterisiert worden. Für Stamm CBDB1 konnte ein Wachstum mit polychlorierten Dibenzodioxinen nachgewiesen werden (18). Wie vor kurzem gezeigt wurde, werden chlorierte Dibenzodioxine auch von Stamm 195 dechloriert (31). Wie bei den Chlorbenzolen lassen sich stammspezifische Unterschiede in der Nutzung verschiedener Kongenere erkennen (18, 31).

Stammspezifische Unterschiede zeigen sich auch in der Verwertung von chlorierten Ethenen. Beispielsweise wird PCE von Stamm 195 als metabolischer Elektronenakzeptor benutzt, nicht jedoch von Stamm FL2, Stamm CBDB1, Stamm BAV1 und Stamm VS (3, 39, 63, 95). Stamm 195 und Stamm FL2 können TCE zum Wachstum nutzen (62, 63, 71), während diese Verbindung nur cometabolisch durch Stamm BAV1 und Stamm VS dechloriert wird (39, 95). Stamm BAV1 und Stamm VS veratmen VC zu Ethen, wohingegen Stamm FL2 und Stamm 195 nicht in der Lage sind, VC als metabolischen Elektronenakzeptor zu nutzen (38, 72). Stamm CBDB1 wurde im Rahmen einer Diplomarbeit spezifisch hinsichtlich einer TceA-Aktivität, d.h. einer Dechlorierung von TCE über VC (68, 69), untersucht. Es wurde jedoch keine VC-Bildung beobachtet (120).

Für Stamm 195 wurde eine Dechlorierung von polychlorierten Biphenylen, Naphtalenen und Dibenzofuranen gezeigt (31), wobei noch nicht bekannt ist, ob es sich um metabolische Dechlorierungsreaktionen handelt. Neuere Untersuchungen zeigten, dass Stamm CBDB1 in der Lage ist, 2,3-DCP zu 3-MCP zu dechlorieren (L. Adrian, in Vorbereitung). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden CBDB1-Kulturen angelegt, die bis zu 1 mM 2,3-DCP bei sukzessiver Zugabe von 2,3-DCP transformierten. Schließlich sind *Dehalococcoides*-Stämme auch an der reduktiven Dechlorierung von 1,2-

Dichlorpropan zu Propen beteiligt, die im Gegensatz zu den anderen Dechlorierungsreaktionen vermutlich über den Mechanismus der Dihaloelimination verläuft (94).

4.3 Hinweise für die Beteiligung von Cob(I)alamin

4.3.1 Elektronendonoren

In Untersuchungen mit verschiedenen Elektronendonoren dienten nur Verbindungen mit Standard-Redoxpotentialen unterhalb von -360 mV als Elektronendonoren für die 1,2,3-TCB-Dehalogenase in Rohextrakten. Dies könnte durch die Beteiligung des sehr elektronegativen Cob(I)alamins an der enzymatischen Reaktion erklärt werden (siehe 1.5.1). Die Dechlorierung wurde durch alle drei getesteten Viologene ($E'_0 \leq -360$ mV) vermittelt, wohingegen mit NADH ($E'_0 = -320$ mV) und AQDS ($E'_0 = 184$ mV) keine Dechlorierung stattfand. Mit Wasserstoff, einem ebenfalls sehr elektronegativen Molekül ($E'_0 = -414$ mV), konnte allerdings ebenfalls keine Aktivität in Rohextrakten nachgewiesen werden (siehe 4.4).

Wie auch für Rohextrakte von *Sulfurospirillum multivorans* und *Desulfitobacterium* Stamm PCE-S beschrieben (74, 75), eignete sich Methylviologen ($E'_0 = -448$ mV) besser als Elektronendonor für die Dechlorierung in Rohextrakten von Stamm CBDB1 als das stärker elektronegative Ethylviologen. Die geringere Aktivität mit Ethylviologen in *Sulfurospirillum multivorans*-Extrakten wurde auf einen erschwerten Zugang des Moleküls zu der Elektronen aufnehmenden Bindungsstelle der Dehalogenase zurückgeführt (74). Während in Rohextrakten von *Sulfurospirillum multivorans* und *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23 keine Dechlorierung mit Benzylviologen beobachtet werden konnte (61, 74), diente Benzylviologen als Elektronendonor für die reduktiven Dehalogenasen in Stamm PCE-S (75), Stamm 195 (85) und Stamm CBDB1. Dies deutet darauf hin, dass die Cofaktoren der Dehalogenasen von *Sulfurospirillum multivorans* und *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23 stärker negative Redoxpotentiale besitzen als die Cofaktoren von Stamm PCE-S, Stamm 195 und Stamm CBDB1. Andererseits könnten auch die Elektronen aufnehmenden

Bindungsstellen der letztgenannten Dehalogenasen besser für große Moleküle wie Benzylviologen zugänglich sein.

4.3.2 Lichtreversible Hemmung

Für die meisten reduktiven Dehalogenasen konnte eine Beteiligung von Cob(I)alamin an der Katalyse über eine lichtreversible Hemmung durch Alkyljodide gezeigt werden (47, 55, 68, 75, 80). In Rohextrakten und intakten Zellen von Stamm CBDB1 wurde eine Abnahme der 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität durch Zugabe von 10 μM Ethyljodid oder Propyljodid beobachtet, die zumindest teilweise durch Beleuchtung aufgehoben werden konnte. Diese Ergebnisse lassen sich durch eine Beteiligung von Cob(I)alamin bei der Dechlorierung von Chlorbenzolen in Stamm CBDB1 erklären. Das Fehlen einer vollständigen Hemmung ist möglicherweise durch sterische Effekte bedingt. So wird z.B. die PCE-Dehalogenase von Stamm 195 durch Ethyljodid, nicht aber durch Propyljodid, gehemmt, was auf eine bessere Zugänglichkeit des kleineren Moleküls Ethyljodid zu der Bindungstasche des Enzyms zurückgeführt wurde (68).

4.3.3 TCA-Dechlorierung durch Stamm CBDB1

In photometrischen Aktivitätstests wurde TCA deutlich schneller durch CBDB1-Kultursuspension dechloriert als durch abiotisches Vitamin B₁₂ enthaltendes Kulturmedium. Dies weist darauf hin, dass Stamm CBDB1 ein anderes Corrinoid als B₁₂ enthält. Zwischen nativem CBDB1-Protein und SDS/hitzedenaturiertem CBDB1-Protein konnten keine Unterschiede in der TCA-Dechlorierungsaktivität gefunden werden. Es kann daher vermutet werden, dass Proteine die Corrinoid-vermittelte Dechlorierung von TCA nicht beeinflussen. Eine *de novo* Synthese von zusätzlichem Vitamin B₁₂ durch Stamm CBDB1 ist unwahrscheinlich, da dieser Stamm Vitamin B₁₂ als Zusatz zum Medium unbedingt benötigt, um wachsen zu können. Die Norspeudovitamin B₁₂ enthaltende PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans* zeigte in nativem Zustand eine etwa dreifach höhere und in denaturiertem Zustand sogar eine etwa fünfzigfach höhere Dechlorierungsrate für TCA als Cyanocobalamin (82). Die höhere Dechlorierungsrate des denaturierten Enzyms im Vergleich zum nativen Enzym wurde auf eine bessere

Zugänglichkeit des Cofaktors für das halogenierte Substrat und/oder den Elektronendonator zurückgeführt (82).

4.4 Lokalisierung der TCB-Dehalogenase und Elektronentransport

Die 1,2,3-TCB-Dehalogenase von Stamm CBDB1 war wie die meisten anderen charakterisierten reduktiven Dehalogenasen mit der Membranfraktion assoziiert. Eine Solubilisierung der TCB-Dehalogenase-Aktivität gelang bereits mit geringen Konzentrationen des nichtionischen Detergenzes Triton X-100, was darauf hinweist, dass es sich um ein peripheres Membranprotein handelt (103). Dies wurde auch für die TCE-Dehalogenase von Stamm 195 angenommen, die mit 0,1% Triton X-100 aus der Membran extrahiert werden konnte (69). Untersuchungen zur Interaktion von Dehalogenasen aus Stamm CBDB1 mit putativen Membrananker-Proteinen (siehe 4.5.2) liefern weitere Hinweise dafür, dass Chlorbenzol-Dehalogenasen in Stamm CBDB1 nicht in die Membran eingebettet, sondern über hydrophobe Membrananker-Proteine mit der Membran verbunden sind.

Die Orientierung der reduktiven Dehalogenasen ist noch Gegenstand der Untersuchung. Für einige Dehalogenasen wie die PCE-Dehalogenase von *Desulfitobacterium* Stamm PCE-S gibt es Hinweise auf eine cytoplasmatische Orientierung, die aus Studien mit dem hydrophilen Elektronendonator Methylviologen abgeleitet wurden (74, 75, 76). Im Gegensatz zur PCE-Dechlorierung in Stamm PCE-S nahm die TCB-Dechlorierung in Stamm CBDB1 mit Methylviologen als Elektronendonator nach Zellaufschluss nicht zu. Eine Permeabilisierung intakter Zellen mit 0,4% Toluol bewirkte ebenfalls keinen Anstieg der Dechlorierungsgeschwindigkeit. Das Methylviologen-Monokationradikal als elektronenabgebende Form von Methylviologen durchdringt Zellmembranen nur in sehr begrenztem Umfang, wie an *E. coli*-Zellen gezeigt wurde (52). Daher stehen die Ergebnisse dieser Arbeit mit der Hypothese im Einklang, dass die TCB-Dehalogenase von Stamm CBDB1 zur Außenseite der Membran orientiert ist, wie auch für die reduktiven Dehalogenasen von Stamm 195 (69) und *Desulfitobacterium dehalogenans* (106, 118) vorgeschlagen (Abb. 30).

In Rohextrakten und intakten Zellen von Stamm CBDB1 und Stamm 195 konnte keine Dechlorierung mit dem Chinonanalogue AQDS als Elektronendonator

gemessen werden ([85]; für Stamm CBDB1 siehe auch [50]). Ebenso wenig diente 2,3-Dimethyl-1,4-naphtochinon, ein Menachinon-Derivat, als Elektronendonator für die TCB-Dechlorierung in Stamm CBDB1 (50). 2-Heptyl-4-hydroxy-chinolin-N-oxid, ein Antagonist von Menachinon-abhängigen Redoxreaktionen, zeigte keine hemmende Wirkung auf die Dechlorierung in beiden Stämmen (50, 85). Aus diesen Gründen ist es unwahrscheinlich, dass ein Chinon am Elektronentransport in Stamm CBDB1 und Stamm 195 (85) beteiligt ist.

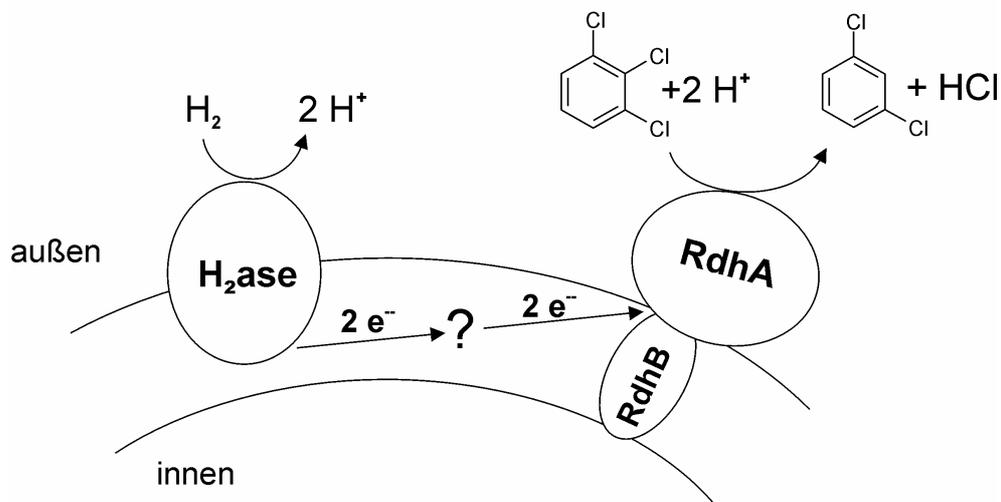


Abb. 30. Modell des respiratorischen Elektronentransports in Stamm CBDB1. H₂ase, Hydrogenase; RdhA, reduktive Dehalogenase (*rdhA*-Genprodukt); RdhB, Membranankerprotein.

Die Hydrogenase-Aktivität von Stamm CBDB1 wurde von Jayachandran *et al.* (50) charakterisiert. Stamm CBDB1 besitzt eine membranassoziierte Hydrogenase, die vermutlich zum [Ni-Fe]-Typ gehört. Die Hemmbarkeit durch Cu²⁺-Ionen, für die Membranen nicht permeabel sind, weist auf eine extrazelluläre Orientierung der Hydrogenase hin (50). Die Hydrogenase ist extrem sauerstoffempfindlich (50). Dies könnte erklären, weshalb keine Dechlorierungsaktivität mit Wasserstoff als Elektronendonator in Rohextrakten von Stamm CBDB1, die mit Hilfe der French Press hergestellt wurden, nachgewiesen werden konnte: Die Hydrogenase wurde vermutlich infolge eines Sauerstoffeintrags bei der French Press-Behandlung inaktiviert. Dagegen zeigten Rohextrakte, die unter strikter Einhaltung anaerober Bedingungen mit

der Kugelmühle hergestellt wurden, Dehalogenase-Aktivität mit Wasserstoff als Elektronendonator (49). Die Dehalogenase-Aktivität intakter Zellen mit Wasserstoff als Elektronendonator betrug 17% der mit Methylviologen erreichten Aktivität (Daten nicht dargestellt).

4.5 Methoden zur Reinigung der Chlorbenzol-Dehalogenase-Aktivität bei limitierten Proteinmengen

Aufgrund der geringen Zellerträge in CBDB1-Kulturen gab es erhebliche Probleme bei der Aufreinigung der Dehalogenase-Aktivität aus Stamm CBDB1. Die begrenzte Verfügbarkeit von Protein hat sich auch bei anderen *Dehalococcoides*-Stämmen als problematisch für eine Isolierung von Dehalogenasen in aktiver Form erwiesen, obwohl diese Stämme mit chlorierten Ethenen als Elektronenakzeptoren noch zu höheren Zellzahlen heranwachsen als Stamm CBDB1 (68, 78, 95). Die PCE-Dehalogenase und die TCE-Dehalogenase aus Stamm 195 wurden partiell über säulenchromatographische Methoden gereinigt und anschließend durch eine Kombination von präparativer nativer PAGE und SDS-PAGE identifiziert (68). *Dehalococcoides* sp. Stamm VS nutzt ebenso wie Stamm BAV1 VC als Elektronenakzeptor (23). Vor kurzem gelang es, aus einer hochangereicherten Mischkultur von Stamm VS eine VC-Dehalogenase über säulenchromatographische Methoden partiell zu reinigen. Nach SDS-PAGE der angereicherten Probe wurde das entsprechende Protein isoliert und N-terminal ansequenziert (78). Für die Aufreinigung der Chlorbenzol-Dehalogenase-Aktivität aus Stamm CBDB1 erwiesen sich säulenchromatographische Methoden aufgrund der geringen Mengen an verfügbarem Protein als wenig geeignet. Ein säulenchromatischer Lauf war stets mit einer Verdünnung der TCB-Dehalogenase-Aktivität in den eluierten Fraktionen verbunden. Da Proteinbanden in den eluierten aktiven Fraktionen über SDS-PAGE nicht nachgewiesen werden konnten, entsprach die Verdünnung der Aktivität offenbar auch einer Verdünnung des Dehalogenaseproteins. Eine Erklärung für die Verdünnung des Proteins konnte nicht gefunden werden. Da die TCB-Dehalogenase-Aktivität zumindest an MonoQ-Adsorbens gebunden und eluiert werden konnte, erscheint eine säulenchromatographische Reinigung mit größeren Proteinmengen prinzipiell möglich.

4.5.1 Native Gelelektrophorese-Systeme

Aufgrund der geringen benötigten Proteinmengen und der positiven Ergebnisse mit Stamm 195 boten sich native Elektrophorese-Systeme für weitere Proteintrennungsversuche an. Eine Identifizierung des gereinigten Proteins sollte anschließend über Massenspektrometrie stattfinden (7). Native Lämmli-Gele (100), bei denen das stark denaturierende Detergenz SDS durch Triton X-100 ersetzt wurde, sowie native Gele mit Triton X-100, die bei neutralem pH arbeiten, zeigten eine geringe Trennleistung. Die nach erfolgter Elektrophorese in den Gelfragmenten nachgewiesene Dehalogenase-Aktivität war sehr niedrig. Deutliche bessere Resultate wurden mit nativen Gradientengelen nach Schägger und von Jagow (99) erzielt. Nachteile dieser Methode waren jedoch die lange Trennzeit und die schwierige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit den Gradientengelen.

Eine Erklärung für das Fehlen von Dehalogenase-Aktivität in Gelfragmenten nach nativer isoelektrischer Fokussierung konnte nicht gefunden werden. Die in zwei Versuchen gemessene geringe Dehalogenase-Aktivität im Gel nahe des Probenauftragsorts könnte einen Hinweis darauf geben, dass es zu einer vorzeitigen Präzipitation des Dehalogenaseproteins gekommen ist.

Die native TDC-PAGE erwies sich aufgrund der hohen Trennleistung und einfachen Durchführbarkeit als am besten geeignete Methode für die Proteinauftrennung. Die Trennung von Proteinen im TDC-Lämmli-Gel erfolgt grundsätzlich wie im SDS-Lämmli-System entsprechend des Molekulargewichts, wenn auch ein strikter Zusammenhang zwischen Größe und relativer Mobilität des Proteins nicht gegeben ist (100). Nach TDC-PAGE konnte einer einzelnen Proteinbande im Gel Dehalogenase-Aktivität zugeordnet werden. Möglicherweise handelte es sich bei der Bande bereits um das isolierte Dehalogenaseprotein. Aufgrund der geringen Zahl an Aufreinigungsschritten (differentielle Zentrifugation, TDC-PAGE) muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass diese Bande mehrere Proteine mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften enthielt. Dies könnte auch ein Grund für die niedrigen Signale bei der massenspektrometrischen Analyse gewesen sein. Man kann spekulieren, dass unter den gewählten Kulturbedingungen multiple Dehalogenasen in Stamm CBDB1 vorliegen, die aufgrund ähnlicher Größe nicht oder nur unzureichend in einem TDC-Gel voneinander getrennt werden. Das in einer

einzelnen Bande vorliegende Protein konnte mit der Dechlorierung von 1,2,3-TCB, 1,2,3,4-TeCB und, in eingeschränktem Maße, PeCB in Verbindung gebracht werden. Diese Aktivitäten werden möglicherweise durch unterschiedliche Dehalogenasen vermittelt (siehe auch 4.2). Unklar ist, weshalb die PeCB-Dechlorierung durch Gelfragmente im Gegensatz zu dem Trend in Rohextrakten deutlich langsamer verlief als die Dechlorierung von 1,2,3-TCB. Es kann vermutet werden, dass die PeCB-Dehalogenase-Aktivität empfindlicher gegenüber Einflüssen während der Aufreinigung ist. Möglich wäre auch die Abtrennung einer für die PeCB-Dechlorierung notwendigen Komponente.

In einem zweidimensionalen Gel werden generell höhere Trennleistungen erreicht als in einem eindimensionalen Gel, da eine vorgeschaltete native oder denaturierende isoelektrische Fokussierung Proteine, die sich in ihrer Größe nicht unterscheiden, auftrennen kann (41). Die theoretischen isoelektrischen Punkte der meisten RDH-Genprodukte liegen allerdings sehr nahe beieinander (siehe 3.5.8). Geht man davon aus, dass Chlorbenzol-Dehalogenasen durch eben diese RDH-Gene kodiert werden, erscheint ein Einsatz der isoelektrischen Fokussierung als wenig Erfolg versprechend, zumal zunächst eine Optimierung hinsichtlich der Konservierung der Dehalogenase-Aktivität erfolgen müsste.

Es konnte noch nicht geklärt werden, ob die Chlorbenzol-Dehalogenase tatsächlich zu der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Gruppe von reduktiven Dehalogenasen gehört und durch ein RDH-Gen kodiert wird. Das aktive Protein weicht entsprechend der Größenbestimmung über SDS-PAGE mit einem Molekulargewicht von 45 kDa nur geringfügig von den theoretischen Größen der gereiften RDH-Genprodukte (47-54 kDa) ab. Die ermittelten Größen für die in Stamm 195 identifizierte TCE-Dehalogenase (61 kDa; [68]) und das aus dem kodierenden Gen abgeleitete Protein (58 kDa; [69]) stehen allerdings in umgekehrtem Verhältnis. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Chlorbenzol-Dehalogenase durch ein etwas kleineres RDH-Gen in Stamm CBDB1 kodiert wird, das in der vorliegenden Arbeit nicht amplifiziert wurde. Die TCB-Dehalogenase von Stamm CBDB1 und die TCE-Dehalogenase von Stamm 195 besitzen gemeinsame Charakteristika wie Reduzierbarkeit durch Benzylviologen, leichte Solubilisierbarkeit und hohe Aktivität mit Methylviologen in intakten Zellen (siehe 4.3.1, 4.4), was eine ähnliche Proteinstruktur und damit verwandte Gene vermuten lässt (96).

Bindungsstudien mit immobilisierten B-Proteinen aus Stamm CBDB1 (siehe 4.5.2) weisen auf eine Interaktion der Chlorbenzol-Dehalogenase-Aktivität mit B-Proteinen hin. Eine Beteiligung von Cob(I)alamin an der Dechlorierung von TCB ist wahrscheinlich. Beides kann als Hinweis auf eine Zugehörigkeit zu der beschriebenen Gruppe von reduktiven Dehalogenasen gelten.

4.5.2 Interaktion Dehalogenase/B-Protein

Im Rahmen einer Diplomarbeit sollte eine Methode zur Aufreinigung von reduktiven Dehalogenasen über eine spezifische Interaktion mit vermutlichen Membranankerproteinen (B-Proteinen) erarbeitet werden. Erstes Ziel war es, rekombinante B-Proteine für die zu untersuchende Interaktion herzustellen. Versuche anderer Arbeitsgruppen, auf direktem Wege reduktive Dehalogenasen in aktiver Form in *E. coli* zu exprimieren, sind bisher fehlgeschlagen (83, 111). So zeigten die in *E. coli* exprimierten PCE-Dehalogenasen aus *Sulfurospirillum multivorans* und *Desulfitobacterium* sp. Stamm Y51 keine Aktivität. Ursache hierfür ist vermutlich, dass in *E. coli* kein funktioneller Zusammenbau des Corrinoid-haltigen Holoenzym stattfindet (83).

Die aus orfB-Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen (B-Proteine) von Stamm CBDB1 und anderen dechlorierenden Bakterien weisen dagegen keine bekannten Bindungsmotive für Cofaktoren auf. Versuche, B-Proteine aus Stamm CBDB1, die mit einem Histidin-Affinitäts-tag fusioniert wurden, in *E. coli* zu exprimieren, führten zu einem vorzeitigen Absterben der Zellen. Dies ist möglicherweise auf die hohe Hydrophobizität und die geringe Größe der B-Proteine zurückzuführen. Eine Expression von RdhB5 und RdhB10 aus Stamm CBDB1 (122) sowie von PceB aus *Sulfurospirillum multivorans* (51) gelang schließlich in einem Expressionssystem mit dem Maltosebindeprotein als Fusionspartner, das die Löslichkeit des rekombinanten Proteins erhöht und die Ausbildung der nativen Struktur fördern kann (8, 90, 113).

Untersuchungen zur Bindung der 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität aus Stamm CBDB1 an immobilisierte rekombinante B-Proteine (RdhB5 und RdhB10) gaben erstmalig deutliche Hinweise darauf, dass eine spezifische Interaktion zwischen beiden Proteinen tatsächlich stattfindet (122). Eine Aufreinigung von Dehalogenasen aus CBDB1-Extrakt mit Hilfe von immobilisierten B-Proteinen stellt somit eine interessante Alternative zur

konventionellen Aufreinigung dar. Hinsichtlich der Aktivitätsbestimmung mit den auf Nitrocellulose-Membranen immobilisierten B-Proteinen besteht noch Optimierungsbedarf. Die Abnahme der Chlorbenzol-Gesamtkonzentration in den Aktivitätstests kann auf eine Adsorption der Chlorbenzole an die Nitrocellulose-Membran zurückgeführt werden und ließe sich z.B. durch Erhöhung der eingesetzten Chlorbenzol-Konzentration im Test vermeiden (122).

Es stellt sich die Frage nach der Spezifität der Dehalogenase/B-Protein-Interaktion. Interessanterweise konnte 1,2,3,4-TeCB-Dehalogenase-Aktivität sowohl an RdhB5 als auch an RdhB10 gebunden werden, was eher auf eine unspezifische Interaktion zwischen Dehalogenase und B-Protein hindeutet. Andererseits könnte die 1,2,3,4-TeCB-Dechlorierung auch eine Nebenreaktion verschiedener spezifischer Dehalogenasen, z.B. einer TCB- und einer PeCB-Dehalogenase, sein. Wichtig ist der Befund, dass SDS-denaturiertes B-Protein offenbar in der Lage ist, mit Dehalogenasen zu interagieren; eine spezifische Proteinfaltung scheint daher nicht notwendig zu sein. Möglicherweise findet eine Interaktion über kurze Aminosäuresequenzen des B-Proteins wie z.B. das konservierte Motiv WYEW statt (122).

4.6 RDH-Gene in *Dehalococcoides*

4.6.1 Sequenzeigenschaften von RDH-Genen

30 neue RDH-Gene wurden aus *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 und *Dehalococcoides* sp. Stamm FL2 amplifiziert. Alle RDH-Gene unterschieden sich von den in *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 und *Dehalococcoides* sp. Stamm BAV1 identifizierten RDH-Genen. Obwohl die Substratspezifitäten der amplifizierten Gene nicht abgeleitet werden können, gibt es deutliche Hinweise dafür, dass alle in den vier *Dehalococcoides*-Stämmen identifizierten RDH-Gene echte Homologe (Gene gemeinsamen Ursprungs) des biochemisch charakterisierten *tceA*-Gens aus Stamm 195 (69) darstellen. i) Alle amplifizierten RDH-Gene weisen 27-33% Sequenzidentität zu *tceA* auf der Aminosäureebene über die komplette Sequenzlänge auf (449-489 Aminosäurereste bei allen *rdhA*_{CBDB1}- und *rdhA*_{FL2}-Genen mit Ausnahme von *rdhA10*_{FL2} mit einer Länge von 404 Resten), was die Ableitung einer homologen

Beziehung nach Brenner *et al.* (15) und Rost (96) erlaubt. ii) Alle RDH-Gene besitzen zwei funktionelle Domänen, die die Struktur und/oder Lokalisierung des Proteins festlegen: die N-terminale Twin-Arginin-Signalsequenz und die ISB-Region in der Nähe des C-Terminus, die zwei getrennte ISB-Motive enthält. iii) Alle RDH-Gene sind in Operons mit einem stromabwärts gelegenen orfB-Gen, das einen putativen Membrananker kodiert, organisiert. iv) Die hohe Anzahl von RDH-Genen (17 RDH-Gene in Stamm 195, mindestens jeweils 14 RDH-Gene in Stamm CBDB1 und FL2 sowie sieben RDH-Gene in Stamm BAV1) lässt eine konvergente Entwicklung eher unwahrscheinlich erscheinen.

4.6.2 Zur Phylogenie der reduktiven Dehalogenasen

Ein Vergleich der RDH-Gensequenzen aller vier *Dehalococcoides*-Stämme zeigt, dass verschiedene Stämme Gene mit hoher Ähnlichkeit besitzen, gleichzeitig aber auch einzigartige RDH-Gene vorhanden sind, die die *Dehalococcoides*-Stämme voneinander unterscheiden. Die Subcluster aus Genen mit hoher Ähnlichkeit können als Orthologe, d.h. Homologe, die durch Speziation entstanden sind, interpretiert werden (110). Die 16S rRNA-Gene von Stamm CBDB1 (GenBank *accession number* AF230641) und Stamm FL2 (*accession number* AF357918) sind 100% identisch und besitzen 98,5% Sequenzidentität zum 16S rRNA-Gen von Stamm 195 (*accession number* AF004928). Die Topologie jeder orthologen Gruppe von RDH-Genen aus Stamm CBDB1, Stamm FL2 und Stamm 195 steht mit einer 16S rRNA-basierten Phylogenie im Einklang. Somit wird das Konzept einer Unterteilung der *Dehalococcoides*-Stämme in Gruppen (40), nach welchem Stamm FL2 und Stamm CBDB1 näher miteinander verwandt sind als mit Stamm 195, durch die RDH-Genanalyse weiter gestützt. Das 16S rRNA-Gen von Stamm BAV1 (*accession number* AY165308) weist lediglich eine Base Unterschied (99,9% Identität) gegenüber den 16S rRNA-Genen von Stamm CBDB1 und Stamm FL2 auf. Es konnte jedoch keine engere Verwandtschaftsbeziehung zwischen den *rdhA*_{BAV1}-Genen und den RDH-Genen von Stamm CBDB1 und Stamm FL2 als zwischen den *rdhA*_{BAV1}-Genen und den *rdhA*_{DE}-Genen gefunden werden. Die Analyse der orfB-Genfragmente aller vier *Dehalococcoides*-Stämme ergab, dass die Sequenzbeziehungen zwischen den orfB-Genen mit denen der orfA-Gene korrespondieren, was auf eine Coevolution und funktionelle Verbindung

beider Gene hinweist. Insgesamt lässt sich anhand der vorliegenden Daten zeigen, dass die Vervielfältigung und Divergenz der RDH-Gene in einem gemeinsamen *Dehalococcoides*-Vorfahren stattfand, und nicht erst nach den Speziationsereignissen, die zur Entstehung der heute bekannten Stämme führten. Dies ist im Zusammenhang mit der Frage nach den Ursachen der Entstehung der Dehalogenase-Gene von Bedeutung. Demnach geht das Vorhandensein von multiplen RDH-Genen in *Dehalococcoides*-Spezies nicht auf eine rasche Anpassung an anthropogene haloorganische Verbindungen zurück, die innerhalb des letzten Jahrhunderts freigesetzt wurden, sondern auf viel weiter zurückliegende evolutionäre Ereignisse. Für eine frühe Entstehung von Dehalogenase-Genen spricht auch die ubiquitäre Verbreitung von *Dehalococcoides* Spezies (40).

Da Chlorbenzole vermutlich nur in unwesentlichen Mengen natürlich entstehen (35), kann spekuliert werden, dass andere haloorganische Verbindungen wie z.B. halogenierte Phenole, die durch eine Vielzahl von Organismen produziert werden (35), die ursprünglichen Elektronenakzeptoren der Chlorbenzol-Dehalogenasen bzw. Chlorbenzol-Dehalogenasevorstufen darstellen. Ein interessantes natürliches Habitat für reduktiv dechlorierende Mikroorganismen ist der Bromphenole produzierende marine Schwamm *Aplysina aerophoba*. In den Schwamm-assoziierten Mikroorganismen konnten RDH-Gene identifiziert werden (6). Nichthalogenierte natürliche Verbindungen mit aromatischen Strukturen wie z.B. Huminstoffe könnten ebenfalls ursprüngliche Substrate von reduktiv dechlorierenden Bakterien darstellen (20). *Dehalococcoides*-Stämme besitzen multiple RDH-Gene, die vermutlich reduktive Dehalogenasen mit verschiedenen Spezifitäten kodieren. Chlorbenzol-Dehalogenase-Gene könnten zu einem späteren Zeitpunkt durch Diversifikation der ursprünglichen RDH-Gene entstanden sein.

In Stamm 195, *Desulfitobacterium hafniense* und in Amplikons aus einem 2-Bromphenol abbauenden mikrobiellen Konsortium wurden Transposase- oder Integrase-ähnliche Gene in enger Verbindung mit RDH-Genen gefunden. Dies lässt vermuten, dass Dehalogenase-Gene auch durch horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Spezies ausgetauscht werden können (93, 106, 107). So weist die gegenüber den anderen orthologen RDH-Genen in

Dehalococcoides-Stämmen sehr hohe Sequenzidentität der *tceA*-Gene von Stamm 195 und Stamm FL2 auf einen lateralen Gentransfer hin.

4.6.3 Stammspezifische Unterschiede: RDH-Gene und Dechlorierungsaktivitäten in *Dehalococcoides*

Das Vorhandensein multipler unterschiedlicher RDH-Gene in *Dehalococcoides*-Stämmen ist im Einklang mit der Beobachtung, dass die verschiedenen Stämme unterschiedliche Elektronenakzeptoren nutzen. Einige RDH-Gene sind nur in einzelnen Stämmen zu finden und besitzen kein Ortholog unter den bekannten Genen der anderen Stämme. Für viele RDH-Gene von Stamm CBDB1, FL2 und BAV1 finden sich innerhalb des komplett sequenzierten Genoms von Stamm 195 keine Orthologen, was darauf hinweist, dass diese Stämme Dechlorierungspotentiale aufweisen, die Stamm 195 fehlen.

Die beobachtete Aktivität der verschiedenen *Dehalococcoides*-Stämme gegenüber TCE korrespondiert mit dem Vorhandensein oder Fehlen des *tceA*-Gens. TCE dient als Elektronenakzeptor für Stamm FL2 und Stamm 195; entsprechend liegt das *tceA*-Gen in diesen Stämmen vor (45, 68). Stamm BAV1 (39) und Stamm CBDB1 können nicht mit TCE wachsen. In Übereinstimmung hiermit wurde das *tceA*-Gen nicht in Stamm BAV1 (38) oder Stamm CBDB1 (45) gefunden. In Stamm BAV1 wurde ein VC-Dehalogenase-Gen *bvcA* (dieses entspricht dem RDH-Gen *rdhA6*_{BAV1} in Abb. 27) mit Hilfe einer Transkriptionsanalyse identifiziert (53). Das kodierende Gen besitzt kein bekanntes Ortholog in den anderen *Dehalococcoides*-Isolaten, die VC im Gegensatz zu Stamm BAV1 nicht als metabolischen Elektronenakzeptor nutzen können. Die Tatsache, dass Stamm 195 VC dennoch cometabolisch umsetzt, unterstützt die These, dass einige reduktive Dehalogenasen unspezifische Nebenreaktionen besitzen, wie möglicherweise auch die Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCB (siehe 4.5.2).

Vor kurzem wurde aus einer hoch angereicherten Mischkultur von *Dehalococcoides* sp. Stamm VS eine VC-Dehalogenase partiell gereinigt und das kodierende Gen *vcrA* über Peptidsequenzierung und inverse PCR identifiziert (78). *vcrA* weist unter den bekannten RDH-Genen die höchste

Ähnlichkeit zu dem *tceA*-Gen aus Stamm 195 und dem VC-Dehalogenase-Gen *bvcA* aus Stamm BAV1 (78) auf. Interessanterweise ist die Sequenzidentität zu *tceA* (40%) höher als die zu *bvcA* (36%), obwohl TceA VC lediglich cometabolisch umsetzt (68, 69).

4.6.4 Funktionelle Domänen in RDH-Genen

Alle RDH-Gene enthalten die in reduktiven Dehalogenasen charakterisierten funktionellen Domänen (47, 104). Das Vorhandensein einer Twin-Arginin-Signalsequenz in RDH-Genen ist im Einklang mit der Hypothese, dass diese Gene an einem dehalorespiratorischen Prozess beteiligt sind, da solche Motive überwiegend in membranassoziierten Proteinen des respiratorischen Elektronentransports gefunden werden (13, 104). Darüber hinaus enthalten die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller RDH-Gene zwei ISB-Motive und könnten daher Eisen-Schwefel-Cluster ausbilden, die vermutlich den Transfer von Elektronen zum aktiven Zentrum der Dehalogenase, dem Corrinoid, vermitteln (81, 117).

Cobalamin-Bindungsmotive. Hinweise auf die Beteiligung eines Corrinoid-Cofaktors an der Katalyse wurden für die meisten reduktiven Dehalogenasen von Dehalorespiration betreibenden Bakterien gefunden (47, 104), ohne dass entsprechende Corrinoid-Bindungsmotive in den kodierenden Genen identifiziert wurden. So weist auch die PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans*, die Norpseudovitamin B₁₂ als Cofaktor besitzt (54), kein Corrinoid-Bindungsmotiv in der Aminosäuresequenz auf (83). Aus einer Gruppe von Cobalamin-abhängigen Methyltransferasen und Isomerasen von verschiedenen Bakterienarten wie *E. coli*, *Propionibacterium shermanii* und *Clostridium* sp. wurde eine Consensussequenz zur Cobalaminbindung (DXHXXG...SXL...GG) etabliert (65). In diesen Methyltransferasen und Isomerasen ist der Dimethylbenzimidazol-Ligand des Cobalt-Zentrums durch einen konservierten Histidinrest der Consensussequenz ersetzt. Eine solche Consensussequenz zur Cobalaminbindung konnte nun in einer Gruppe von *Dehalococcoides* RDH-Genen identifiziert werden. In anderen RDH-Genen einschließlich aller Gene, die charakterisierte reduktive Dehalogenasen kodieren, fehlt diese Consensussequenz zur Cobalaminbindung. Vor kurzem wurde jedoch in der 3,5-DCP-Dehalogenase von *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 ein Motiv

EYHYNG identifiziert, das dem Motiv DXHXXG ähnelt und auch in Datenbanken, die konservierte Cobalaminbindungsdomänen führen, für einige Proteine aufgelistet ist (114). Das Motiv EYHYNG befindet sich nicht zwischen den ISB-Motiven wie das Motiv DX(X)HXXG der *Dehalococcoides* RDH-Gene, sondern im ersten Drittel der Dehalogenasesequenz bei Aminosäureposition 159. Das SXL- und das Twin-Glycin-Motiv fehlen in der DCP-Dehalogenase. Insofern ist es fragwürdig, ob das in der DCP-Dehalogenase gefundene Motiv funktionell analog zu den Consensussequenzen der *Dehalococcoides* RDH-Gene ist.

Die Chlorphenol-Dehalogenase von *Desulfitobacterium dehalogenans* und die PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans* wurden detailliert über paramagnetische Elektronenresonanz-Spektroskopie charakterisiert. Die Analysen gaben einen Hinweis darauf, dass beide Enzyme das Corrinoid in der „base-off“ Form enthalten (54, 81, 117), d.h. ohne Koordination eines Dimethylbenzimidazol- oder Histidinliganden an das Cobalt-Zentrum. Dies führt zu der Frage, ob die RDH-Genprodukte, die die Consensussequenz zur Cobalaminbindung enthalten, den Corrinoid-Cofaktor auf andere Weise binden und einen abweichenden katalytischen Mechanismus aufweisen. Allerdings ist bekannt, dass die Bindung von Cobalt über Histidinligation keinen spezifischen Reaktionsmechanismus festlegt, da unterschiedliche katalytische Mechanismen in Methyltransferasen und Isomerasen identifiziert wurden (65). Darüber hinaus besitzen andere Untergruppen Cobalamin-abhängiger Methyltransferasen und Isomerasen keinen Consensus zur Cobalaminbindung und binden Cobalamin nicht über Histidinligation (9, 65).

ISB-Motive. Die in dieser Arbeit amplifizierte RDH-Gene enthalten zwei ISB-Motive und könnten daher zwei Eisen-Schwefel-Cluster ausbilden. Für Dehalogenasen wie die TCE-Dehalogenase von Stamm 195, in der beide ISB-Motive der Consensussequenz CXXCXXCXXXCP entsprechen, kann die Ausbildung von zwei Fe_4S_4 -Clustern angenommen werden (16, 69). Unklar ist hingegen, ob das weiter stromaufwärts gelegene Cystein im zweiten ISB-Motiv anderer Dehalogenasen an der Bindung von Eisen beteiligt ist. In der PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans* und der Chlorphenol-Dehalogenase von *Desulfitobacterium dehalogenans* sind die ersten beiden

Cysteinreste des zweiten ISB-Motivs durch einen Stretch von 10 bzw. 12 Aminosäureresten getrennt. Eine Ausbildung von sowohl Fe_4S_4 - als auch Fe_3S_4 -Clustern durch diese ISB-Motive wurde diskutiert (83, 117, 121). Fe_3S_4 -Cluster sind in der Natur seltener anzutreffen als Fe_4S_4 -Cluster und können über eine Oxidation von Fe_4 -Clustern entstehen, die nur drei Cysteinliganden besitzen (11). Analysen über paramagnetische Elektronenresonanz-Spektroskopie ergaben, dass zwei Fe_4S_4 -Cluster in den PCE-Dehalogenasen von *Sulfurospirillum multivorans*, *Desulfitobacterium* Stamm PCE-S und *Dehalobacter restrictus* vorliegen (76, 81, 102), wohingegen ein Fe_4S_4 -Cluster und ein Fe_3S_4 -Cluster in der Chlorphenol-Dehalogenase von *Desulfitobacterium dehalogenans* gefunden wurden (117).

Interaktion von Cobalamin und Eisen-Schwefel-Clustern. In den RDH-Genen *rdhA3-4*_{CBDB1}, *rdhA1-3*_{FL2} und *rdhA12*_{DE} sind die einzelnen Motive des Consensus zur Cobalaminbindung sowohl zwischen den beiden ISB-Motiven als auch stromabwärts des zweiten ISB-Motivs lokalisiert, wodurch sich ein „Ineinandergreifen“ der Consensussequenz zur Cobalaminbindung und der ISB-Region ergibt. Für andere Proteine mit multiplen ISB-Motiven wurde gefunden, dass die ersten drei Cysteinreste eines ISB-Motivs typischerweise einen Eisen-Schwefel-Cluster mit dem vierten Cystein eines zweiten ISB-Motivs bilden und umgekehrt, so dass die zwei Cluster die zwei Bereiche der Peptidkette, die die ISB-Motive enthalten, miteinander verbinden (37). Eine ähnliche Verknüpfung der zwei ISB-Motive über Eisen-Schwefel-Cluster wurde auch für die PCE-Dehalogenase von *Dehalobacter restrictus* vorgeschlagen (70). Das „Ineinandergreifen“ von ISB-Motiven und Consensus zur Cobalaminbindung in *rdhA3-4*_{CBDB1}, *rdhA1-3*_{FL2} und *rdhA12*_{DE} deutet darauf hin, dass die Eisen-Schwefel-Cluster und das Corrinoid in der reifen Dehalogenase sehr nahe beieinander liegen, was möglicherweise eine Voraussetzung für den Transport von Elektronen zwischen den Cofaktoren während des Dechlorierungsprozesses ist (81).

4.7 Ausblick

4.7.1 Identifizierung der Chlorbenzol-Dehalogenase

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur Aufreinigung der reduktiven Chlorbenzol-Dehalogenase aus Stamm CBDB1 erarbeitet, die speziell für geringe Proteinmengen geeignet sind. Nach Aufreinigung über differentielle Zentrifugation und TDC-PAGE konnte einer einzelnen Proteinbande im Polyacrylamidgel Chlorbenzol-Dehalogenase-Aktivität zugeordnet werden. Gelingt es in zukünftigen Untersuchungen, eine ausreichend hohe Menge an Protein zu reinigen, ist eine Analyse des Proteins über Massenspektrometrie und ein Abgleich mit Gensequenzdaten möglich (siehe 3.4.1.3). Ein wichtiges Ziel ist es daher, die Wachstumsbedingungen für Stamm CBDB1 in Kultur zu optimieren, um mehr Zellmasse für eine Enzymaufreinigung zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit zur Bereitstellung von mehr Zellmasse stellt die Kultivierung in größeren Volumina dar. Für 250 ml- und 500 ml-Kulturen wurde eine stabile Dechlorierungsleistung erreicht. Erste Experimente mit 1,8 l-Kulturen zeigten trotz erhöhter Anfälligkeit für Kontaminationen viel versprechende Ergebnisse und sollten weitergeführt werden. Darüber hinaus stellen die bisher durchgeführten Versuche zur Bindung von Chlorbenzol-Dehalogenasen an immobilisierte rekombinante B-Proteine eine wichtige Basis für weitere Aufreinigungsversuche dar. Ein entscheidendes Ziel ist hier die Klärung der Spezifität der Interaktion zwischen Dehalogenase und B-Protein. Falls eine hohe Spezifität besteht, d.h. ein individuelles B-Protein nicht verschiedene RDH-Genprodukte, sondern nur die korrespondierende Chlorbenzol-Dehalogenase bindet, könnte eine spezifische Aufreinigung des Enzyms in einem Schritt möglich sein.

Für die Identifizierung der reduktiven Chlorbenzol-Dehalogenase über Massenspektrometrie sind die für Stamm CBDB1 verfügbaren RDH-Gensequenzen entscheidend. Diese dienen als Datenbank, aus der mit Hilfe spezieller Programme wie z.B. Mascot (<http://www.matrixscience.com>) das Dehalogenaseprotein über dessen massenspektrometrisch bestimmtes Peptidfragmentmuster identifiziert werden kann. Da allerdings nicht auszuschließen ist, dass die Chlorbenzol-Dehalogenase durch ein anderes Gen kodiert wird, ist zur sicheren Bestimmung des Proteins vermutlich eine

vollständige Genomsequenz von Stamm CBDB1 notwendig. Für verschiedene *Dehalococcoides*-Stämme einschließlich Stamm CBDB1 ist eine Sequenzierung des Genoms geplant.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Chlorbenzol-Dehalogenasen in Stamm CBDB1 bei Limitierung der Proteinmengen stellt die Analyse der messenger-RNA dar. Die gewonnenen RDH-Sequenzdaten könnten für ein Design von Primern für eine Transkriptionsanalyse spezifischer RDH-Gene über RT-PCR (53) eingesetzt werden.

4.7.2 Detektion von Dechlorierungspotentialen in der Umwelt

Dehalococcoides und andere anaerobe Bakterien spielen eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung chlorierter aromatischer und aliphatischer Verbindungen in anaeroben Umweltkompartimenten (40, 60). Entscheidend für eine Nutzung der bakteriellen Abbauleistungen zu Sanierungszwecken ist die Untersuchung des vor Ort gegebenen Dechlorierungspotentials. Bereits vorhandene Dechlorierer können durch den Einsatz von Wachstumsstoffen wie z.B. Elektronendonoren gefördert werden. Fehlt eine entsprechende Mikroflora, ist ein Ausbringen angepasster Kulturen in die Umwelt möglich. Seit einigen Jahren werden *Dehalococcoides*-Präparate (z.B. „KB-1 Dechlorinator“) in den USA erfolgreich zur Verstärkung des Abbaus chlorierter Schadstoffe, insbesondere PCE und TCE, an kontaminierten Standorten eingesetzt (<http://www.siremlab.com>). *Dehalococcoides*-Stämme können auf Basis der 16S rRNA über PCR-Amplifikation (40, 60) oder *in situ* Hybridisierung mit fluoreszenzgekoppelten Sonden (127) in Umweltproben detektiert werden. Allerdings ist die Aussagekraft 16S rRNA-basierter Methoden zur Detektion spezifischer Dechlorierungspotentiale aufgrund der hohen Sequenzidentität der 16S rRNA-Gene von *Dehalococcoides*-Stämmen mit verschiedenen Dechlorierungsaktivitäten eingeschränkt. Aus diesem Grund ist es ein wichtiges Ziel, metabolische Gene, d.h. spezifische reduktive Dehalogenase-Gene, in entsprechende Untersuchungen einzubeziehen (53, 78, 107). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen stammspezifischen RDH-Gensequenzen stellen einen Ausgangspunkt für die Entwicklung von Primern gegen spezifische Dehalogenase-Gene dar. RDH-Gene oder gegen RDH-Gene gerichtete Sonden könnten z.B. in Form von DNA-Arrays eingesetzt werden, um in

Umweltproben zwischen verschiedenen *Dehalococcoides*-Stämmen wie CBDB1 und FL2 zu differenzieren. Eine Voraussetzung hierfür ist die Aufklärung der Funktion der RDH-Gene. Gelingt diese, können Sonden für spezifische reduktive Dehalogenase-Gene entwickelt werden.

Das Potential von *Dehalococcoides* zum Abbau von Chloraromaten unter Umweltbedingungen sollte weiter erforscht werden. Eine signifikante Isotopenfraktionierung konnte für die Dechlorierung von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB durch intakte Zellen von Stamm CBDB1 nachgewiesen werden (36). Entsprechend könnten Aktivitätsmessungen DNA-basierte Detektionsmethoden ergänzen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt Eigenschaften der reduktiven Chlorbenzol-Dehalogenase aus *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1, einem strikt anaeroben Bakterium, das Chlorbenzole als terminale Elektronenakzeptoren zur Energiegewinnung nutzt. 1,2,3-Trichlorbenzol (TCB), 1,2,4-TCB, alle Tetrachlorbenzol-Isomere, Pentachlorbenzol und Hexachlorbenzol wurden durch Rohextrakt von Stamm CBDB1 reduktiv dechloriert. Besonders hohe spezifische Aktivitäten konnten für 1,2,3,4-Tetrachlorbenzol und Pentachlorbenzol mit Methylviologen als Elektronendonator nachgewiesen werden. Die lichtreversible Hemmung durch Alkyljodide ließ auf eine Beteiligung von Cob(I)alamin an der reduktiven Dechlorierung von 1,2,3-TCB schließen. Die 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität war mit der Membranfraktion assoziiert. Hohe Dechlorierungsaktivitäten intakter Zellen mit dem hydrophilen Elektronendonator Methylviologen wiesen auf eine extrazelluläre Orientierung der TCB-Dehalogenase hin. Aufgrund der geringen Proteinerträge aus CBDB1-Kulturen (<1 µg Protein/ml) wurden gelelektrophoretische Methoden für die Proteinaufreinigung eingesetzt. Mit Hilfe von nativen, Taurodesoxycholat enthaltenden Polyacrylamidgelen wurden solubilisierte Membranproteine aufgetrennt, und einer einzelnen Proteinbande konnte Dehalogenase-Aktivität zugeordnet werden. Eine Analyse über Tandem-Massenspektrometrie lieferte aufgrund der geringen Proteinmenge keine verwertbare Aminosäure-Sequenzinformation. Bindungsversuche mit immobilisierten rekombinanten B-Proteinen aus Stamm CBDB1 gaben Hinweise darauf, dass Dehalogenasen spezifisch mit Membranankerproteinen interagieren und eine Aufreinigung von Dehalogenasen über diese Interaktion möglich ist. Aus genomischer DNA von Stamm CBDB1 und dem Trichlorethen (TCE) dechlorierenden Bakterium *Dehalococcoides* sp. Stamm FL2 wurden jeweils 14 verschiedene reduktive Dehalogenase-homologe (RDH)-Gene über PCR amplifiziert, die mit RDH-Genen von *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 und *Dehalococcoides* sp. Stamm BAV1 sowie dem TCE-Dehalogenase kodierenden *tceA*-Gen von Stamm 195 einen Gencluster bildeten. Die Sequenzbeziehungen der RDH-Gene lassen eine frühe Evolution der reduktiven Dehalogenasen vermuten. Mit Hilfe von vergleichenden Sequenzanalysen konnten Consensussequenzen zur

Cobalaminbindung in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von sieben RDH-Genen identifiziert werden.

6. SUMMARY

The present work describes properties of the chlorobenzene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1, a strictly anaerobic bacterium that uses chlorinated benzenes as terminal electron acceptors to meet its energy needs. 1,2,3-trichlorobenzene (TCB), 1,2,4-TCB, all tetrachlorobenzene isomers, pentachlorobenzene and hexachlorobenzene were reductively dechlorinated by crude extracts of strain CBDB1. Exceptionally high specific activities were obtained for 1,2,3,4-tetrachlorobenzene and pentachlorobenzene with methyl viologen as electron donor. Light-reversible inhibition by alkyl iodides indicated the involvement of cob(I)alamin in reductive dechlorination of 1,2,3-TCB. 1,2,3-TCB dehalogenase activity was associated with the membrane fraction. High dechlorinating activities of intact cells with the hydrophobic electron donor methyl viologen suggested an extracellular orientation of the TCB dehalogenase. Owing to low protein yields of CBDB1 cultures (<1 µg protein/ml) gel electrophoretic methods were applied for protein purification.

Using native polyacrylamide gels containing taurodeoxycholate, solubilized membrane proteins were separated and dehalogenase activity could be assigned to a single protein band. Due to the low amount of protein, tandem mass spectrometry did not yield useful amino acid sequence information. Binding studies with immobilized recombinant B proteins from strain CBDB1 suggested that dehalogenases specifically interact with membran anchoring proteins and that purification of dehalogenases via this interaction is feasible.

From genomic DNA of strain CBDB1 and the trichloroethene (TCE) dechlorinating bacterium *Dehalococcoides* sp. strain FL2, 14 different reductive-dehalogenase-homologous (RDH) genes were PCR-amplified that formed a gene cluster with the RDH genes from *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 and *Dehalococcoides* sp. strain BAV1 as well as the TCE dehalogenase encoding *tceA* gene from strain 195. Sequence relationships of RDH genes suggested an early evolution of reductive dehalogenases. Comparative sequence analysis revealed the presence of cobalamin binding consensus sequences in deduced amino acid sequences of seven RDH genes.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adrian, L., W. Manz, U. Szewzyk, und H. Görisch.** 1998. Physiological characterization of a bacterial consortium reductively dechlorinating 1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:496-503.
2. **Adrian, L.** 1999. Reduktive Dechlorierung von Trichlorbenzolen durch anaerobe Mikroorganismen. Dissertation, TU Berlin.
3. **Adrian, L., U. Szewzyk, J. Wecke, und H. Görisch.** 2000. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* **408**:580-583.
4. **Adrian, L., und H. Görisch.** 2002. Microbial transformation of chlorinated benzenes under anaerobic conditions. *Res. Microbiol.* **153**:131-137.
5. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).** 2002. Toxicological profile for hexachlorobenzene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
6. **Ahn, Y.-B., S.-K. Rhee, D. E. Fennell, L. J. Kerkhof, U. Hentschel, und M. M. Häggblom.** 2003. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. Environ. Microbiol.* **96**:4159-4166.
7. **Ashcroft, A. E.** 2003. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. *Nat. Prod. Rep.* **20**:202-215.
8. **Bach, H., Y. Mazor, S. Shaky, A. Shoham-Lev, Y. Berdichevsky, D. L. Gutnick, und I. Benhar.** 2001. *Escherichia coli* maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J. Mol. Biol.* **312**:79-93.
9. **Banerjee, R., und S. W. Ragsdale.** 2004. The many faces of vitamin B₁₂: Catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**:209-247.

10. **Beil, S., B. Happe, K. N. Timmis, und D. H. Pieper.** 1997. Genetic and biochemical characterization of the broad spectrum chlorobenzene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain PS12 - dechlorination of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene. *Eur. J. Biochem.* **247**:190-109.
11. **Beinert, H.** 2000. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**:2-15.
12. **Benz, M., B. Schink, und A. Brune.** 1998. Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4507-4512.
13. **Berks, B. C., F. Sargent, und T. Palmer.** 2000. The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35**:260-274.
14. **Boyer, A., R. Pagé-Bélanger, M. Saucier, R. Villemur, F. Lépine, P. Juteau, und R. Beaudet.** 2003. Purification, cloning, and sequencing of an enzyme mediating the reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol from *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Biochem. J.* **373**:297-303.
15. **Brenner, S. E., C. Chothia, und T. J. Hubbard.** 1998. Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6073-6078.
16. **Bruschi, M., und F. Guerlesquin.** 1988. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**:155-174.
17. **Bujnicki, R.** 1999. Untersuchung an einer reduktiv Chlorbenzol dechlorierenden Aktivität in einer hoch angereicherten Mischkultur. Studienarbeit im Fachgebiet Technische Biochemie der TU Berlin.
18. **Bunge, M., L. Adrian, A. Kraus, M. Opel, W. G. Lorenz, J. R. Andreesen, H. Görisch, und U. Lechner.** 2003. Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature* **421**:357-360.

19. **Cabral, J. R., und P. Shubik.** 1986. Carcinogenic activity of hexachlorobenzene in mice and hamsters. IARC Sci. Publ. **77**:411-416.
20. **Cervantes, F. J., F. A. de Bok, T. Duong-Dac, A. J. Stams, G. Lettinga, und J. A. Field.** 2002. Reduction of humic substances by halorespiring, sulphate-reducing and methanogenic microorganisms. Environ. Microbiol. **4**:51-57.
21. **Chen, S., A. Christopher, H. P. Jones, S. G. Bell, Q. Guo, F. Xu, Z. Rao, und L. L. Wong.** 2002. Crystal structure of the F87W/Y96F/V247L mutant of cytochrome P450cam with 1,3,5-trichlorobenzene bound and further protein engineering for the oxidation of pentachlorobenzene and hexachlorobenzene. J. Biol. Chem. **40**:37519-37526.
22. **Christiansen, N., B. K. Ahring, G. Wohlfarth, und G. Diekert.** 1998. Purification and characterization of the 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetate reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense*. FEBS Lett. **436**:159-162.
23. **Cupples, A. M., A. M. Spormann, und P. L. McCarty.** 2003. Growth of a *Dehalococcoides*-like microorganism on vinyl chloride and *cis*-dichloroethene as electron acceptors as determined by competitive PCR. Appl. Environ. Microbiol. **69**:953-959.
24. **Cutter, L. A., J. E. Watts, und K. Sowers.** 2001. Identification of a microorganism that links growth to the reductive dechlorination of 2,3,5,6-chlorobiphenyl. Environ. Microbiol. **3**:699-709.
25. **Dolfing, J.** 1990. Reductive dechlorination of 3-chlorobenzoate is coupled to ATP production and growth in an anaerobic bacterium, strain DCB-1. Arch. Microbiol. **153**:264-266.
26. **Dolfing, J., und B. K. Harrison.** 1992. Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. Environ. Sci. Technol. **26**:2213-2218.

27. **Dolfing, J., und B. K. Harrison.** 1993. Redox and reduction potentials as parameters to predict the degradation pathway of chlorinated benzenes in anaerobic environments. *FEBS Microbiol. Ecol.* **13**:23-29.
28. **Döpfer, M., und W. Stock.** 1995. Herkunft, Eintrag und Verbleib von Chloraromaten in der Umwelt. Kolloquium der TU Berlin „Mikrobielle Eliminierung chlororganischer Verbindungen“, 20. und 21. November, Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung **6**:29-41.
29. **EU.** 2001. Entscheidung Nr. 2455/2001/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. November 2001 zur Festlegung der Liste prioritärer Stoffe im Bereich der Wasserpolitik und zur Änderung der Richtlinie 2000/60/EG (WRRL), Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft Nr. L 331/1 vom 15.12. 2001.
30. **Fathepure, B. Z., und T. M. Vogel.** 1991. Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by a two-stage biofilm reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3418-3422.
31. **Fennell, D. E., I. Nijenhuis, S. F. Wilson, S. H. Zinder, und M. M. Häggblom.** 2004. *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **38**:2075-2081.
32. **Fetzner, S.** 1998. Bacterial dehalogenation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:633-657.
33. **Gantzer, C. J., und L. P. Wackett.** 1991. Reductive dechlorination catalyzed by bacterial transition-metal coenzymes. *Environ. Sci. Technol.* **25**: 715-722.
34. **Giometti, C. S., T. Khare, S. L. Tollaksen, A. Tsapin, W. Zhu, J. R. Yates, und K. H. Nealson.** 2003. Analysis of the *Shewanella oneidensis* proteome by two-dimensional gel electrophoresis under nondenaturing conditions. *Proteomics* **3**:777-784.

35. **Gribble, G. W.** 1994. The natural production of chlorinated compounds. *Environ. Sci. Technol.* **28**:310-319.
36. **Griebler, C., L. Adrian, R. U. Meckenstock, und H. H. Richnow.** 2004. Stable carbon isotope fractionation during aerobic and anaerobic transformation of trichlorobenzene. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**:313-321.
37. **Guigliarelli, B., A. Magalon, M. Asso, P. Bertrund, C. Frixon, G. Giordano, und F. Blasco.** 1996. Complete coordination of the four Fe-S centers of the beta subunit from *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of site-directed mutants lacking the highest or lowest potential [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry* **35**:4828-4836.
38. **He, J., K. M. Ritalahti, M. R. Aiello, und F. E. Löffler.** 2003. Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:996-1003.
39. **He, J., K. M. Ritalahti, K. L. Yang, S. S. Koenigsberg, und F. E. Löffler.** 2003. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature* **424**:62-65.
40. **Hendrickson, E. R., J. A. Payne, R. M. Young, M. G. Starr, M. P. Perry, S. Fahnestock, D. E. Ellis, und R. C. Ebersole.** 2002. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:485-495.
41. **Herbert, B. R., J. L. Harry, N. H. Packer, A. A. Gooley, S. K. Pedersen, und K. L. Williams.** 2001. What place for polyacrylamide in proteomics? *Trends Biotechnol.* **19** (Suppl.):S3-S9.
42. **Hölscher, T., L. Adrian, und H. Görisch.** 2001. *In vitro* dechlorination of trichlorobenzenes by cell extracts of *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1.

Kolloquium der TU Berlin „Anaerobic dehalogenation“, 2. und 3. April, Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung **15**:155-162.

43. **Hölscher, T., H. Görisch, und L. Adrian.** 2003. Reductive dehalogenation of chlorobenzene congeners in cell free extracts of *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2999-3001.
44. **Hölscher, T., G. Jayachandran, H. Görisch, und L. Adrian.** 2003. Studying 1,2,3,4-TeCB reductive dehalogenase of *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1 by native gel electrophoresis. In: Abstracts of the 103th General Meeting 2003 of the American Society for Microbiology, Washington D. C., abstract Q-002.
45. **Hölscher, T., R. Krajmalnik-Brown, K. M. Ritalahti, F. von Wintzingerode, H. Görisch, F. E. Löffler, und L. Adrian.** 2004. Multiple nonidentical reductive-dehalogenase-homologous genes are common in *Dehalococcoides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5290-5297.
46. **Holliger, C., G. Schraa, A. J. M. Stams, und A. J. B. Zehnder.** 1992. Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1636-1644.
47. **Holliger, C., G. Wohlfarth, und G. Diekert.** 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:383-398.
48. **Jayachandran, G., H. Görisch, und L. Adrian.** 2003. Dehalorespiration with penta- and hexachlorobenzene by *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Arch. Microbiol.* **180**:411-416.
49. **Jayachandran, G.** 2004. Physiological and enzymatic studies of respiration in *Dehalococcoides* species strain CBDB1. Dissertation, TU Berlin.

50. **Jayachandran, G., H. Görisch, und L. Adrian.** 2004. Studies on hydrogenase activity and chlorobenzene respiration in *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. Arch. Microbiol. **182**:498-504.
51. **John, M., R. P. H. Schmitz, A. Neumann, und G. Diekert.** 2002. Studies on components of the dehalorespiratory system of *Dehalospirillum multivorans*. Poster VAAM Jahrestagung, Göttingen.
52. **Jones, R. W., und P. B. Garland.** 1977. Sites and specificity of the reaction of bipyridylium compounds with anaerobic respiratory enzymes of *Escherichia coli*. Biochem. J. **164**:199-211.
53. **Krajmalnik-Brown, R., T. Hölscher, I. N. Thomson, F. M. Saunders, K. M. Ritalahti, und F. E. Löffler.** 2004. Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. Appl. Environ. Microbiol. **70**:6347-6351.
54. **Kräutler, B., W. Fieber, S. Ostermann, M. Fasching, K.-H. Ongania, K. Gruber, C. Kratky, C. Mikl, A. Siebert, und G. Diekert.** 2003. The Cofactor of tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans* is norpseudob₁₂, a new type of natural corrinoid. Helv. Chim. Acta **11**:3698-3716.
55. **Krasotkina, J., T. Walters, K. A. Maruya, und S. W. Ragsdale.** 2001. Characterization of the B₁₂⁻ and iron-sulfur-containing reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans*. J. Biol. Chem. **276**:40991-40997.
56. **Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, und E. L. L. Sonnhammer.** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. J. Mol. Biol. **395**:567-580.
57. **Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, und M. Nei.** 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics **17**:1244-1245.

58. **Lämmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
59. **Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg.** 1995. Stoffbericht Hexachlorbenzol (HCB). Schriftenreihe Texte und Berichte zur Altlastenbearbeitung, 18/95.
60. **Lendvay, J. M., F. E. Löffler, M. Dollhopf, M. R. Aiello, G. Daniels, B. Z. Fathepure, M. Gebhard, R. Heine, R. Helton, J. Shi, R. Krajmalnik-Brown, C. L. Brown, C. L. Major, Jr., M. J. Barcelona, E. Petrovskis, R. Hickey, J. M. Tiedje, und P. Adriaens.** 2003. Bioreactive barriers: A comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environ. Sci. Technol.* **37**:1422-1431.
61. **Löffler, F. E., R. A. Sanford, und J. M. Tiedje.** 1996. Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3809-3813.
62. **Löffler, F. E., Q. Sun, J. Li, und J. M. Tiedje.** 2000. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1369-1374.
63. **Löffler, F. E., J. R. Cole, K. M. Ritalahti, und J. M. Tiedje.** 2003. Diversity of dechlorinating bacteria, 53-87. In: M. M. Häggblom and I. D. Bossert (Hrsg.): Dehalogenation: microbial processes and environmental applications. Kluwer Academic, New York.
64. **Louie, T. M., und W. W. Mohn.** 1999. Evidence for a Chemiosmotic Model of Dehalorespiration in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *J. Bacteriol.* **181**:40-46.
65. **Ludwig, M. L., und R. G. Matthews.** 1997. Structure-based perspectives on B₁₂-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:269-313.
66. **Luijten, M. L., J. de Weert, H. Smidt, H. T. Boschker, V. M. de Vos, G. Schraa, und A. J. Stams.** 2003. Description of *Sulfurospirillum halorespirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring

- bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**:787-793.
67. **Mackiewicz, M., und J. Wiegel.** 1998. Comparison of energy and growth yields for *Desulfitobacterium dehalogenans* during utilization of chlorophenol and various traditional electron acceptors. Appl. Environ. Microbiol. **64**:352-355.
68. **Magnuson, J. K., R. V. Stern, J. M. Gossett, S. H. Zinder, und D. R. Burris.** 1998. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. Appl. Environ. Microbiol. **64**:1270-1275.
69. **Magnuson, J. K., M. F. Romine, D. R. Burris, und M. T. Kingsley.** 2000. Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: Sequence of *tceA* and substrate range characterization. Appl. Environ. Microbiol. **66**:5141-5147.
70. **Maillard, J., W. Schumacher, F. Vazquez, C. Regeard, W. R. Hagen, und C. Holliger.** 2003. Characterization of the corrinoid iron-sulfur protein tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. Appl. Environ. Microbiol. **69**:4628-4638.
71. **Maymó-Gatell, X., Y.-T. Chien, J. M. Gossett, und S. H. Zinder.** 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. Science **276**:1568-1571.
72. **Maymó-Gatell, X., T. Anguish, und S. H. Zinder.** 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by "*Dehalococcoides ethenogenes*" 195. Appl. Environ. Microbiol. **65**:3108-3113.
73. **Mern, D. S.** 2003. Molekularbiologische Analyse zur Auffindung von reduktive Dehalogenase codierenden Genen im Stamm CBDB1. Studienarbeit im Fachgebiet Technische Biochemie, TU Berlin.

74. **Miller, E., G. Wohlfarth, und G. Diekert.** 1997a. Studies on tetrachloroethene respiration in *Dehalospirillum multivorans*. Arch. Microbiol. **166**:379-387.
75. **Miller, E., G. Wohlfarth, und G. Diekert.** 1997b. Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. Arch. Microbiol. **168**:513-519.
76. **Miller, E., G. Wohlfarth, und G. Diekert.** 1998. Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S. Arch. Microbiol. **169**:497-502.
77. **Mohn, W. W., und J. M. Tiedje.** 1991. Evidence for chemiosmotic coupling of reductive dechlorination and ATP synthesis in *Desulfomonile tiedjei*. Arch. Microbiol. **157**:1-6.
78. **Müller, J. A., B. M. Rosner, G. von Abendroth, G. Meshulam-Simon, P. L. McCarty, und A. Spormann.** 2004. Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. Appl. Environ. Microbiol. **70**:4880-4888.
79. **Nesterenko, M. V., M. Tilley, und S. J. Upton.** 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. J. Biochem. Biophys. Method. **28**:239-242.
80. **Neumann, A., G. Wohlfarth, und G. Diekert.** 1995. Properties of tetrachloroethene and trichloroethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*. Arch. Microbiol. **163**:276-281.
81. **Neumann, A., G. Wohlfarth, und G. Diekert.** 1996. Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. J. Biol. Chem. **271**:16515-16519.
82. **Neumann, A., A. Siebert, T. Trescher, S. Reinhardt, G. Wohlfarth, und G. Diekert.** 2002. Tetrachloroethene reductive dehalogenase of

- Dehalospirillum multivorans*: Substrate specificity of the native enzyme and its corrinoid cofactor. Arch. Microbiol. **177**:420-426.
83. **Neumann, A., G. Wohlfarth, und G. Diekert.** 1998. Tetrachloroethene dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **180**:4140-4145.
84. **Ni, S., J. K. Fredrickson, und L. Xun.** 1995. Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate-reductive dehalogenase from the cytoplasmic membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. J. Bacteriol. **177**:5135-5139.
85. **Nijenhuis, I., und S. H. Zinder.** 2000. Characterization of reductive dechlorination by whole cells and cell extracts of "*Dehalococcoides ethenogenes*" strain 195. In: Abstracts of the 100th General Meeting 2000 of the American Society for Microbiology, Washington D. C., abstract Q-126.
86. **Novak, J., N. H. Kirsch, W Hegemann, und H.-J. Stan.** 1996. Total reductive dehalogenation of chlorobenzenes to benzene by a methanogenic mixed culture enriched from Saale river sediment. Appl. Microbiol. Biotechnol. **45**:700-709.
87. **Okeke, B. C., Y. C. Chang, M. Hatsu, T. Suzuki, und K. Takamizawa.** 2001. Purification, cloning and sequencing of an enzyme mediating the reductive dechlorination of tetrachloroethene (PCE) from *Clostridium bifermentans* DPH-1. Can. J. Microbiol. **47**:448-456.
88. **Ou, Y. C., R. B. Conolly, R. S. Thomas, D. L. Gustafson, M. E. Long, I. D. Dobrev, L. S. Chubb, Y. Xu, S. A. Lapidot, M. E. Andersen, und R. S. Yang.** 2003. Stochastic simulation of hepatic preneoplastic foci development for four chlorobenzene congeners in a medium-term bioassay. Toxicol. Sci. **73**:301-314.

89. **Potrawfke, T., K. N. Timmis, und R.-M. Wittich.** 1998. Degradation of 1,2,3,4-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas chlororaphis* RW71. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 3798-3806.
90. **Rachel, B. K., und D. S. Waugh.** 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of peptides to which it is fused. Protein Science **8**:1668-1674.
91. **Regeard, C., J. Maillard, und C. Holliger.** 2004. Development of degenerate and specific PCR primers for the detection and isolation of known and putative chloroethene reductive dehalogenase genes. J. Microbiol. Methods **56**: 107-118.
92. **Reineke, W.** 2001. Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms, 1-161. In: Beek, B. (Hrsg.): The handbook of environmental chemistry, Vol. 2, Part K. Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
93. **Rhee, S.-K., D. E. Fennel, M. M. Häggblom, und L. J. Kerkhof.** 2003. Detection by PCR of reductive dehalogenase motifs in a sulfidogenic 2-bromophenol-degrading consortium enriched from estuarine sediment. FEMS Microbiol. Ecol. **43**:317-324.
94. **Ritalahti, K. M., und F. E. Löffler.** 2004. Populations implicated in anaerobic reductive dechlorination of 1,2-dichloropropane in highly enriched bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol. **70**:4088-4095.
95. **Rosner, B. M., P. L. McCarty, und A. M. Spormann.** 1997. *In vitro* studies on reductive vinyl chloride dehalogenation by an anaerobic mixed culture. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4139-4144.
96. **Rost, B.** 1999. Twilight zone of protein sequence alignments. Protein Eng. **12**:85-94.
97. **Saitou, N., und M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**:406-425.

98. **Sammeth, M., J. Rothgänger, W. Esser, J. Albert, J. Stoye, und D. Harmsen.** 2003. Qalign – quality-based alignments including dynamic phylogenetic analysis. *Bioinformatics* **19**:1592-1593.
99. **Schägger, H., und G. von Jagow.** 1991. Blue native electrophoresis of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**:223-231.
100. **Schrattenholz, A.** (Hrsg.). 2001. Methoden der Proteomforschung: Molekulare Analyse der Proteinexpression. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
101. **Schumacher, W., und C. Holliger.** 1996. The proton/electron ratio of the menaquinone-dependent electron transport from dihydrogen to tetrachloroethene in "*Dehalobacter restrictus*". *J. Bacteriol.* **178**:2328-2333.
102. **Schumacher, W., C. Holliger, A. J. B. Zehnder, und W. R. Hagen.** 1997. Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*. *FEBS Lett.* **409**:421-425.
103. **Scopes, R. K.** 1994. Protein purification: Principles and practice, third ed. Springer-Verlag, New York, 38-42.
104. **Smidt, H., A. D. L. Akkermans, J. van der Oost, und W. M. de Vos.** 2000. Halorespiring bacteria – molecular characterization and detection. *Enz. Microb. Technol.* **27**:812-820.
105. **Smidt, H., M. van Leest, J. van der Oost, und W. M. de Vos.** 2000b. Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in *ortho*-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J. Bacteriol.* **182**:5683-5691.
106. **Smidt, H.** 2001. Molecular characterization of anaerobic dehalogenation by *Desulfitobacterium dehalogenans*. Dissertation, University of Wageningen, Wageningen.

107. **Smidt, H., und W. M. de Vos.** 2004. Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:43-73.
108. **Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, und D. C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchonic acid. *Anal. Biochem.* **150**:76-85.
109. **Sonnhammer, E. L. L., G. von Heijne, und A. Krogh.** 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences, 175-182. In: Glasgow, J., T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, und C. Sensen (Hrsg.): Proceedings of the sixth international conference on intelligent systems for molecular biology, Menlo Park, Kalifornien, AAAI Press.
110. **Storm, C. E., und E. L. Sonnhammer.** 2002. Automated ortholog inference from phylogenetic trees and calculation of orthology reliability. *Bioinformatics* **18**:92-99.
111. **Suyama, A., M. Yamashita, S. Yoshino, und K. Furukawa.** 2002. Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *J. Bacteriol.* **184**:3419-3425.
112. **Sykes, P.** 1988. Reaktionsmechanismen der organischen Chemie: Eine Einführung. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
113. **Terpe, K.** 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**:523-533.
114. **Thibodeau, J., A. Gauthier, M. Duguay, R. Villemur, F. Lépine, P. Juteau, und R. Beaudet.** 2004. Purification, cloning, and sequencing of a 3,5-dichlorophenol reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4532-4537.
115. **U. S. Environmental Protection Agency.** 2001. Persistent organic pollutants (POPs). EPA 735F01008.

116. **van Agteren, M. H., S. Keuning, und D. B. Janssen.** 1998. Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 363-378.
117. **van de Pas, B. A., H. Smidt, W. R. Hagen, J. van der Oost, G. Schraa, A. J. M. Stams, und W. M. de Vos.** 1999. Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. J. Biol. Chem. **274**:20287-20292.
118. **van de Pas, B. A., S. Jansen, C. Dijkema, G. Schraa, W. M. de Vos, und A. J. M. Stams.** 2001. Energy yield of respiration on chloroaromatic compounds in *Desulfitobacterium dehalogenans*. Appl. Environ. Microbiol. **67**:3958-3963.
119. **Villemur, R., M. Saucier, A. Gauthier, und R. Beaudet.** 2002. Occurrence of several genes encoding putative reductive dehalogenases in *Desulfitobacterium hafniense/frappieri* and *Dehalococcoides ethenogenes*. Can. J. Microbiol. **48**:697-706.
120. **Vorgel, J.** 2003. Akkumulation von *trans*-Dichlorethen während der reduktiven Dechlorierung von Tetrachlorethen durch Mikroorganismen. Diplomarbeit, TU Berlin.
121. **von Wintzingerode, F., C. Schlötelburg, R. Hauck, W. Hegemann, und U. B. Göbel.** 2001. Development of primers for amplifying genes encoding CprA- and PceA-like reductive dehalogenases in anaerobic microbial consortia, dechlorinating trichlorobenzene and 1,2-dichloropropane. FEMS Microbiol. Ecol. **35**:189-196.
122. **Walter, J.** 2004. Vermutliche Dehalogenase-Ankerproteine aus *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1: Entwicklung einer Methode zur Aufreinigung von reduktiven Dehalogenasen über B-Protein/Dehalogenase-Interaktion. Diplomarbeit, Universität Witten/Herdecke, durchgeführt im Fachgebiet Technische Biochemie, TU Berlin.

123. **World Health Organization.** 1991. Chlorobenzenes other than hexachlorobenzene. Environmental Health Criteria 128, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
124. **Wu, Q., J. E. Watts, K. R. Sowers, and H. D. May.** 2002. Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:807-812.
125. **Wu, Q., C. E. Milliken, G. P. Meier, J. E. Watts, K. R. Sowers, and H. D. May.** 2002b. Dechlorination of chlorobenzenes by a culture containing bacterium DF-1, a PCB dechlorinating microorganism. *Environ. Sci. Technol.* **1**:3290-3294.
126. **Yadav, J. S., R. E. Wallace, and C. A. Reddy.** 1995. Mineralization of mono- and dichlorobenzenes and simultaneous degradation of chloro- and methyl-substituted benzenes by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:677-80.
127. **Yang, Y., and J. Zeyer.** 2003. Specific detection of *Dehalococcoides* species by fluorescence *in situ* hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2879-2883.
128. **Zehnder, A. J. B., and K. Wuhrmann.** 1976. Titanium(III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* **194**:1165-1166.
129. **Zhou, J., M. E. Davey, J. B. Figueras, E. Rivkina, D. Gilichinsky, and J. M. Tiedje.** 1997. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian Tundra soil DNA. *Microbiology* **143**:3913-3919.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1. Phylogenetische Einordnung von Dehalorespiration betreibenden Bakterien ..6	6
Abb. 2. Elektronenmikroskopisches Bild von Stamm CBDB1	7
Abb. 3. Reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TCB und 1,2,4-TCB durch Stamm CBDB1.....	7
Abb. 4. Organisation der Dehalogenase-Operons von <i>Sulfurospirillum multivorans</i> und <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	12
Abb. 5. Reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TCB mit Methylviologen als Elektronen- donor.....	35
Abb. 6. Aerotoleranz und Stabilität der TCB-Dehalogenase-Aktivität in Rohextrakt ...	37
Abb. 7. pH-Abhängigkeit der TCB-Dehalogenase-Aktivität in Rohextrakt	38
Abb. 8. Abhängigkeit der TCB-Dehalogenase-Aktivität von verschiedenen Puffer- spezies.....	38
Abb. 9. Thermische Stabilität der TCB-Dehalogenase-Aktivität in Rohextrakt	39
Abb. 10. Erste Schritte der PeCB-Dechlorierung in Rohextrakt	41
Abb. 11. Beobachtete Dechlorierungswege für Chlorbenzole in Rohextrakt von Stamm CBDB1.....	43
Abb. 12. Dechlorierung einer 1,2,3-TCB-/1,2,3,4-TeCB-Mischung	44
Abb. 13. Dechlorierung einer 1,2,3-TCB/PeCB-Mischung	45
Abb. 14. Photometrische Bestimmung der Dechlorierung von TCA und 1,2,3,4-TeCB durch Stamm CBDB1.....	48
Abb. 15. Freisetzung von Chloridionen aus 1,2,3,4-TeCB	48
Abb. 16. Photometrische Bestimmung der Dechlorierung von TCA durch Stamm CBDB1 und Vitamin B ₁₂ enthaltendes abiotisches Kulturmedium.....	49
Abb. 17. Eichgerade zur Proteinbestimmung mit Hilfe des NanoOrange Tests	50
Abb. 18. Lokalisierung der TCB-Dehalogenase.....	52
Abb. 19. Direkte Solubilisierung der TCB-Dehalogenase-Aktivität aus intakten Zellen.	53
Abb. 20. Elution der 1,2,3-TCB-Dehalogenase-Aktivität aus einer MonoQ-Säule durch Erhöhung der NaCl-Konzentration	54
Abb. 21. Schematische Darstellung der Aufreinigung der Chlorbenzol-Dehalogenase über TDC- und SDS-PAGE	55
Abb. 22. TDC-PAGE von Membranproteinen aus Stamm CBDB1	57
Abb. 23. Auftrennung eluierter aktiver Proteinfractionen über PAGE	58
Abb. 24. Restriktionsanalyse von RDH-Sequenzen	61
Abb. 25. Organisation der aus Stamm CBDB1 und Stamm FL2 amplifizierten RDH- Gene	62

Abb. 26. Sequenzalignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von <i>rdhA9</i> _{CBDB1} aus Stamm CBDB1 und <i>tceA</i> aus Stamm 195.....	63
Abb. 27. Phylogenetische Analyse von RDH-Genen aus <i>Dehalococcoides</i>	66
Abb. 28. Sequenzalignment von RDH-Genen aus <i>Dehalococcoides</i>	70
Abb. 29. Theoretische Verteilung der RDH-Genprodukte von Stamm CBDB1 im zweidimensionalen Gel	71
Abb. 30. Modell des respiratorischen Elektronentransports in Stamm CBDB1	80

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Eigenschaften reduktiver Dehalogenasen.....	10
Tabelle 2. Bestandteile des Mediums zur Kultivierung von Stamm CBDB1	16
Tabelle 3. Herstellung der SDS- und TDC-Lämmli-Gele	22
Tabelle 4. Herstellung der nativen Gradientengele.....	22
Tabelle 5. Silberfärbung der Polyacrylamid-Gele.....	24
Tabelle 6. Zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung von RDH-Genen eingesetzte Oligonukleotide	28
Tabelle 7. Temperaturprogramme für die gaschromatographische Analyse von Chlorbenzolen.....	32
Tabelle 8. TCB-Dehalogenase-Aktivität in zellfreiem Rohextrakt mit verschiedenen Elektronendonoren	36
Tabelle 9. Dehalogenase-Aktivität in zellfreiem Rohextrakt mit hochchlorierten Chlorbenzolkongeneren als Elektronenakzeptoren.....	40

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AQDS	Anthrachinon-2,4-disulfonsäure
ATP	Adenosyltriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
Bistris	2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DCB(s)	Dichlorbenzol(e)
DCE	Dichlorethen
DCP	Dichlorphenol
DTT	Dithiothreitol
E'_0	Standard-Redoxpotential bei pH 7, 25°C
E_{578}	Extinktion bei 578 nm
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
E_h	Redoxpotential einer Lösung
EPR	paramagnetische Elektronenresonanz
h	Stunden
HCB	Hexachlorbenzol
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
MCB	Monochlorbenzol
MCP	Monochlorphenol
min	Minuten
orf	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCE	Perchlorethen, Tetrachlorethen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PeCB	Pentachlorbenzol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TCA	Trichloracetat
TCB(s)	Trichlorbenzol(e)
TCE	Trichlorethen
TeCB	Tetrachlorbenzol
TRICIN	N-tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
U	Units
V	Volt
vol/vol	Volumen/Volumen

DANKSAGUNG

Dr. Lorenz Adrian danke ich für die hervorragende Betreuung, fachliche und organisatorische Hilfe, unzählige Anregungen, interessante Diskussionen und ganz besonders für seine große Motivationsfähigkeit.

Mein Dank gilt **Prof. Dr. Helmut Görisch** für die große Unterstützung in allen fachlichen Fragen, die ausgezeichnete Betreuung und dafür, dass ich diese Arbeit im Fachgebiet Technische Biochemie durchführen konnte.

Ich danke **Prof. Dr. Ulrich Szewzyk** für sein großes Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Berichts.

Gaby Wagner möchte ich für die hervorragende praktische Unterstützung danken. **Gopalakrishnan Jayachandran** danke ich für die gute Zusammenarbeit und viele interessante Gespräche. **Juliane Walter** war in Form einer Diplomarbeit über B-Proteine an der vorliegenden Arbeit beteiligt. Ihr danke ich für die exzellente Arbeit und ihr großes Engagement.

Prof. Dr. Frank E. Löffler ermöglichte mir einen dreimonatigen Forschungsaufenthalt am Georgia Institute of Technology in Atlanta, USA. Ihm danke ich für die fachliche und finanzielle Unterstützung und viele interessante Diskussionen. **Rosa Krajmalnik-Brown** danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen dieses Forschungsprojekts. Allen Mitarbeitern des *Löffler-Labs* der School of Civil and Environmental Engineering danke ich für ihre Hilfe.

Dr. Ute Lechner, Universität Halle, danke ich für die Bereitstellung der fdehal/rdehal-Primersequenzen.

D. S. Mern war in Form einer Studienarbeit an der Amplifikation des Gens *rdh9A_{CBDB1}* beteiligt. **Stefanie Rittmann** und **Stefanie Kurth** wirkten jeweils für einige Monate im Rahmen einer studentischen Mitarbeit bzw. eines Betriebspraktikums mit. **Edgar Benko** und **Gregory von Abendroth** trugen in Form eines studentischen Praktikums zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bei. Bei **Jessica Vorgel** möchte ich mich für die Hilfe bei der Chlorethen-Analyse bedanken.

Bina Mennenga, Nicole Gliese und **Viola Khodaverdi** danke ich für vielfache Hilfe und ihr Interesse an meiner Arbeit. Allen Mitarbeitern des Fachgebiets Technische Biochemie danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke **Jutta Hölscher, Jürgen Hollatz, Eckhard Helmke, Eva Müller-Helmke** und ganz besonders **Wolfgang Fabarius**, die immer für mich da waren.

Die Untersuchungen wurden mit der finanziellen Unterstützung der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 193, Teilprojekt D2, und eines anschließenden Projekts unter Leitung von Dr. L. Adrian (Projektnummer AD 178/1) durchgeführt.