

Untersuchungen zur Identifikation, Transkription und
Regulation der reduktiven Dehalogenasegene von
Dehalococcoides sp.

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Anke Wagner
geb. am 02.08.1980 in Bernburg

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. PD Dr. U. Lechner
2. Prof. H. Smidt
3. Prof. L. Adrian

Halle (Saale), den 29.04.2009

Erfahrung ist fast immer eine Parodie auf die Idee.

J. W. von Goethe

Meiner Tante Heidi gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	13
2.1 Chemikalien	13
2.2 Organismen und Plasmide	13
2.2.1 Herkunft und Kultivierung von <i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm DCMB5	15
2.3 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	17
2.3.1 Anaerobes Medium für die Kultivierung von <i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm DCMB5	17
2.3.2 Anaerobes Medium für die Kultivierung von <i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm CBDB1	19
2.3.3 Herstellung von Ti(III)-citrat- bzw. Ti(III)-NTA-Lösung	19
2.3.4 Herstellung von fermentiertem Hefeextrakt	20
2.3.5 Zugabe der chlorierten Verbindungen	20
2.3.5.1 Zugabe der Dioxine	20
2.3.5.2 Zugabe der Chlorbenzole aus einer Acetonstammlösung	20
2.3.5.3 Zugabe der Chlorbenzole über eine Hexadekanlösung (Zweiflüssigphasenkulturen)	21
2.3.6 Kultivierung von <i>Dehalococcoides</i> sp.	21
2.3.7 Medium zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	21
2.3.8 Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
2.4. Analytik	22
2.4.1 Aufarbeitung der Kulturen zur Analyse der chlorierten Dioxine und Benzole	22
2.4.2 Gaschromatographie (GC)	23
2.4.2.1 Dioxindetektion mit Flammenionisationsdetektor (FID)	23
2.4.2.2 Dioxindetektion mittels Elektroneneinfangdetektor (ECD)	24
2.4.2.3 Dioxindetektion mit Festphasenmikroextraktion (SPME)	24
2.4.2.4 Detektion der Chlorbenzole mit FID	25
2.4.3 Bestimmung der Chloridkonzentration	26
2.5 Molekularbiologische Methoden	26
2.5.1 Durchführung der Transkriptionsexperimente	26
2.5.2 Zellaufschluss und DNA-Isolierung aus den anaeroben Kulturen	27
2.5.2.1 Zellernte zur Präparation von DNA	27
2.5.2.2 Kugelmühlenaufschluss	27
2.5.2.3 Ethanol-fällung der DNA	28
2.5.3 Zellaufschluss und Isolierung der Gesamt-RNA	28
2.5.3.1 Zellernte zur Präparation von Gesamt-RNA	28

2.5.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA	28
2.5.4 Reverse Transkription (RT)	29
2.5.5 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch <i>primer extension</i>	29
2.5.6 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren	30
2.5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.5.7.1 Amplifikation der 16S rRNA Gene von Vertretern der Bacteria	35
2.5.7.2 Amplifikation von <i>rdhA</i> Genen aus <i>Dehalococcoides</i> sp. an DNA oder cDNA	35
2.5.7.3 Vektorette PCR	36
2.5.7.4 Kolonie-PCR	37
2.5.7.5 Amplifikation von <i>cbdbA1625</i>	38
2.5.8 Reinigung von PCR-Produkten	38
2.5.9 Ligation von gereinigten PCR-Produkten	38
2.5.9.1 Ligation in den Vektor pGEM [®] T-Easy	38
2.5.9.2 Ligation in die Vektoren pASK-IBA3 bzw. pASK-IBA5	39
2.5.10 Transformation von <i>E.coli</i>	39
2.5.10.1 Transformation durch Hitzeschock (CaCl ₂ -Methode)	39
2.5.10.2 Transformation durch Elektroporation	40
2.5.11 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	41
2.5.12 Plasmidisolierung	41
2.5.13 Sequenzierung	41
2.5.13.1 Auswertung von Sequenzdaten	41
2.5.14 Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	42
2.5.14.1 Restriktionsverdau der 6-FAM-markierten PCR-Produkte	42
2.5.14.2 Analyse der Restriktionsfragmente	43
2.5.15 Quantitative PCR (qPCR)	45
2.5.16 Agarosegelelektrophorese	46
2.5.16.1 Agarosegelelektrophorese von DNA	46
2.5.16.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA	47
2.6 Proteinbiochemische Methoden	47
2.6.1 Heterologe Synthese von Proteinen mit Hilfe des <i>Strep-tag</i> II-Expressionssystems	47
2.6.1.1 Proteinbiosynthese von <i>cbdbA1625-Strep-tag</i> II Konstrukten	47
2.6.1.2 <i>rapid screening</i> nach <i>cbdbA1625</i> -Strep exprimierenden Klonen	48
2.6.1.3 Zellaufschluss	48
2.6.1.4 Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose	48
2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	48
2.6.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.6.4 Coomassie-Färbung von Proteinen	49

2.6.5 Transfer von Proteinen auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen	50
2.6.6 Antikörpernachweis von <i>Strep-tag</i> II-Fusionsproteinen	50
2.6.7 <i>Gelshift</i> Experimente	50
2.6.8 Gelfiltration	52
2.6.9 Isotherme-Titrations-Kalorimetrie (ITC)	52
3. Ergebnisse	53
<hr/>	
3.1 Populationsstruktur von 1,2,3-TrCB dechlorierenden Mischkulturen nach Zugabe verschiedener Kombinationen an Elektronendonatoren und Inhibitoren	53
3.1.1 Erstellung von 16S rDNA Klonbibliotheken zur Identifikation weiterer t-RFLP Muster	53
3.1.2 Einfluss verschiedener Kombinationen an Elektronendonatoren auf die Dechlorierungsaktivität und die Populationsstruktur von 1,2,3-Trichlorbenzol-dechlorierenden Mischkulturen	55
3.1.3 Einfluss von Wasserstoff und Inhibitoren auf die Dechlorierungsaktivität und die Populationsstruktur in 1,2,3-Trichlorbenzol-dechlorierenden Mischkulturen	60
3.2 Abgrenzung des <i>Dehalococcoides</i> sp. Stammes DCMB5 von Stamm CBDB1	64
3.2.1 Charakterisierung der DNA-Bereiche, die das 16S rRNA Gen des Stammes DCMB5 <i>up-</i> und <i>downstream</i> flankieren	64
3.2.2 Identifikation von <i>rdhA</i> Genen im Genom von Stamm DCMB5	66
3.2.2.1 Nachweis von <i>rdhA</i> Genen im Stamm DCMB5 über <i>rdhA</i> -Gen-spezifische Primer	68
3.2.2.2 Nachweis von <i>rdhA</i> Genen des Stammes DCMB5 durch Einsatz von gruppenspezifischen Primern	70
3.2.2.3 Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus zur schnellen Detektion von <i>rdhA</i> Genen	71
3.3 Analyse der Transkription der 32 <i>rdhA</i> Gene von <i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm CBDB1 in Gegenwart verschiedener chlorierter Elektronendonatoren	74
3.3.1 Optimierung des Versuchsansatzes	74
3.3.2 Transkriptionsanalysen des Stammes CBDB1 mit 1,2,3- und 1,2,4-Trichlorbenzol	77
3.3.2.1 Amplifikation der <i>rdhA</i> Transkripte mit den Primerpaaren, die PCR-Produkte bis zu einer Länge von 1650 bp ergaben	77
3.3.2.2 Amplifikation der <i>rdhA</i> Transkripte mit den Primerpaaren, die PCR-Produkte bis zu einer Länge von 650 bp ergaben	79
3.3.2.2.1 Dechlorierung von 1,2,3- und 1,2,4-Trichlorbenzol	79
3.3.2.2.2 Transkription der <i>rdhA</i> Gene im Verlauf der Dechlorierung von 1,2,3- und 1,2,4-TrCB	80
3.3.2.2.3 Transkriptionsniveau der <i>rdhA</i> Gene des Stammes CBDB1 in Gegenwart von 1,2,3- und 1,2,4-TrCB	83
3.3.3 Transkriptionsanalysen mit 2,3-DCDD und 1,3-DCDD	86
3.3.3.1 Dechlorierung von 2,3- und 1,3-DCDD	86

3.3.3.2 Transkription der <i>rdhA</i> Gene während der Dechlorierung von 2,3-DCDD und 1,3-DCDD	87
3.3.3.3 Transkriptionsniveau der <i>rdhA</i> Gene des Stammes CBDB1 in Gegenwart von 2,3-DCDD und 1,3-DCDD	92
3.3.4 Transkriptionsniveau der <i>rdhA</i> Gene des Stammes CBDB1 in Gegenwart von Tetrachlorethen (PCE)	94
3.4 Untersuchung der Rolle von CbdbA1625 aus <i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm CBDB1 bei der Dechlorierung von Chlorbenzolen	95
3.4.1 Reinigung von CbdbA1625	96
3.4.2 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte von <i>cbdbA1624</i> , <i>cbdbA1453</i> und <i>cbrA</i>	96
3.4.3 Bindestudien mit den CbdbA1625- <i>Strep-tag</i> -Fusionsproteinen und der intergenen Region der Gene <i>cbdbA1624</i> und <i>cbdbA1625</i>	98
3.4.4 Lokalisierung der Bindestellen der CbdbA1625- <i>Strep-tag</i> -Fusionsproteine	99
3.4.5 Ligandenbindung durch CbdbA1625- <i>Strep</i>	100
 4. Diskussion	 102
<hr/>	
4.1 Anreicherung von obligat dechlorierenden Bakterien	102
4.1.1 Probenahme und Übergang aus den Mikrokosmen in Sediment-freie Kulturen	104
4.1.2 Wahl der Elektronendonatoren	104
4.1.3 Einfluss von Inhibitoren auf den Anreicherungsprozess	106
4.1.4 Zugabe undefinierter Zusätze	107
4.1.5 Konzentration und Toxizität der chlorierten Elektronenakzeptoren	108
4.1.6 Isolierung der dechlorierenden Bakterien	110
4.2 Wachstumserträge des Stammes DCMB5	111
4.3 Methoden zur Untersuchung der Populationstruktur	113
4.4 Mögliche Interaktionen zwischen Dechlorierern und Vertretern der Mischkultur	115
4.5 Methodische Ansätze zur Analyse von <i>rdhA</i> Genen und Transkripten	118
4.6 Identifikation von <i>rdhA</i> Genen im Genom des Stammes DCMB5	120
4.7 Transkriptionsanalysen des Stammes CBDB1 unter Nutzung verschiedener chlorierter Elektronenakzeptoren	124
4.8 Korrelation zwischen dem Nachweis bestimmter <i>rdhA</i> Gene und Transkripte in verschiedenen <i>Dehalococcoides</i> Stämmen und dem Dechlorierungspotential	126
4.9 Regulation der Transkription von <i>rdhA</i> Genen in <i>Dehalococcoides</i> sp.	129
 5. Zusammenfassung	 137
<hr/>	
6. Literaturverzeichnis	140
<hr/>	
7. Anhang	155

Abkürzungen

A	Adenin
A. bidest	zweifach entionisiertes Wasser
A. dest	destilliertes Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
AHT	Anhydrotetrazyklin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AQDS	Anthrachinon 2,6-Disulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BES	Bromethansulfonsäure
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Card	<i>catalyzed reporter deposition</i>
CbrA	Chlorbenzoldehalogenase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFB	<i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i>
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
3-CIOHPA	3-Chlor-4-hydroxyphenylacetat
Cm	Chloramphenicol
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DBD	Dibenzo- <i>p</i> -dioxin
DBrACN	Dibromacenaphthen
DCA	Dichlorethan
DCB	Dichlorbenzol
DCDD	Dichlor- <i>p</i> -dibenzodioxin
DCE	Dichlorethen
DCP	Dichlorphenol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	<i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
ECD	Elektroneneinfangdetektor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EPR	Elektronen Paramagnetische Resonanz
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
FID	Flammenionisationsdetektor
FISH	Fluoreszenz-In situ-Hybridisierung
for	<i>forward</i>
g	Fallbeschleunigung
G	Guanin
GC	Gaschromatographie/Gaschromatograph
HABA	2-(4'-Hydroxybenzylazo)-benzoat
HCB	Hexachlorbenzol
HeCDF	Hexachlordibenzofuran
HMN	Heptamethylnonan
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
i.d.	Innendurchmesser
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid

ITC	Isotherme-Titrations-Kalorimetrie
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Broth
M	Molar
MarR	<i>multiple antibiotic resistance regulator</i>
MCDD	Monochlor- <i>p</i> -dibenzodioxin
MOPS	N-(Morpholino)-Propansäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n.a.	nicht analysiert
n.d.	nicht detektiert
NA	Nähragar II
NB	Nährbouillon I
nt	Nukleotide
NTA	Nitrilotriacetat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCE	Tetrachlorethen
PceA	Tetrachlorethendehalogenase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PeCB	Pentachlorbenzol
PeCDD	Pentachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
PeCDF	Pentachlordibenzofuran
PeCP	Pentachlorphenol
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin
P _i	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PQQ	Pyrolochinolinchinon
psi	<i>pounds per square inch</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative PCR
<i>rdh</i>	<i>reductive dehalogenase homologous</i>
rDNA	Gensequenz der ribosomalen Nukleinsäure
rev	<i>reverse</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Art
SPME	Festphasenmikroextraktion
ssp.	Arten
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCE	Trichlorethen
TceA	Trichlorethendehalogenase
TeCDD	Tetrachlor- <i>p</i> -dibenzodioxin
TeCN	Tetrachlornaphthalen
TeCP	Tetrachlorphenol
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TENS	Tris/HCl-EDTA-NaCl-SDS
TrBB	Tribrombenzol

TrCB	Trichlorbenzol
TrCDD	Trichlor- <i>p</i> -dibenzodioxin
TrCDF	Trichlordibenzofuran
TrCP	Trichlorphenol
t-RF	terminale Restriktionsfragmente
t-RFLP	terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanacetat
Tween	<i>polyethylene glycol sorbitan monolaurate</i>
U	Unit
U•min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Van	Vancomycin
VB	Vinylbromid
VC	Vinylchlorid
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

1. Einleitung

Eine beeindruckende und unerlässliche Leistung von Mikroorganismen ist der Abbau organischer und anorganischer Materie. Von besonderer Bedeutung ist dabei das mikrobielle Vermögen, anthropogen erzeugte Verbindungen zu mineralisieren. Dies ist von großer Tragweite, da eine Vielzahl dieser Substanzen eine Gefährdung für die Umwelt und die menschliche Gesundheit darstellt. Zu diesen zum Teil extrem toxischen bzw. kanzerogen wirkenden Verbindungen zählen unter anderem aliphatische oder aromatische halogenierte Kohlenwasserstoffe, wie chlorierte Benzole, Dioxine, Furane oder auch Ethene. Da im Zusammenhang mit Dioxinunfällen (Seveso 1976; Bhopal 1984) bzw. Umweltbelastungen durch Chlor-Alkali-Elektrolysen immer öfter die Frage nach den Möglichkeiten zur Reinigung biologischer Systeme aufkam, wurden Mitte der 80iger Jahre erste Versuche durchgeführt, um das mikrobielle Dechlorierungspotential unter anaeroben (meist methanogenen) Bedingungen zu bestimmen (Bouwer und McCarty, 1983; Fathepure *et al.*, 1987; Fathepure *et al.*, 1988; Freedman und Gossett, 1989). In den 90iger Jahren gelang es dann, erste Organismen zu isolieren, die die reduktive Dechlorierung zur Energiekonservierung in einem anaeroben Atmungsprozess, der sogenannten Dehalorespiration, nutzen können (Utkin *et al.*, 1994; Gerritse *et al.*, 1996; Maymó-Gatell *et al.*, 1997). Nach näheren Untersuchungen der verwendeten Substrate und der Bedürfnisse dieser Bakterien gelang es letztendlich durch Biostimulation und/oder Bioaugmentation Standorte zu sanieren, die mit chlororganischen Verbindungen verunreinigt waren (Major *et al.*, 2002; Aulenta *et al.*, 2005; Aulenta *et al.*, 2006).

Ein Organismus, der seine Energie aus der Dehalorespiration halogener Verbindungen konserviert, ist *Dehalococcoides* sp. Phylogenetisch betrachtet wird die Gattung *Dehalococcoides* in das Phylum der *Chloroflexi* eingeordnet. Durchgeführte Umordnungen innerhalb der *Chloroflexi* führten zur Definition der neuen Klasse der *Dehalococcoidetes*, die neben *Dehalococcoides* weitere dehalogenierende Vertreter enthält (Hugenholz und Stackebrandt, 2004; Abb. 1). Obwohl *Dehalococcoides* bzw. die reduktive Dechlorierung in der Natur weit verbreitet sind (Hendrickson *et al.*, 2002), wurden bislang nur wenige *Dehalococcoidetes*-Reinkulturen isoliert. Während die Dehalorespiration bei Vertretern verschiedener phylogenetischer Gruppen nachgewiesen wurde (Deweerd und Suflita, 1990; Scholz-Muramatsu *et al.*, 1995; Sharma und McCarty, 1996; Maymó-Gatell *et al.*, 1997; Holliger *et al.*, 1998; Breitenstein *et al.*, 2001), sind Vertreter der

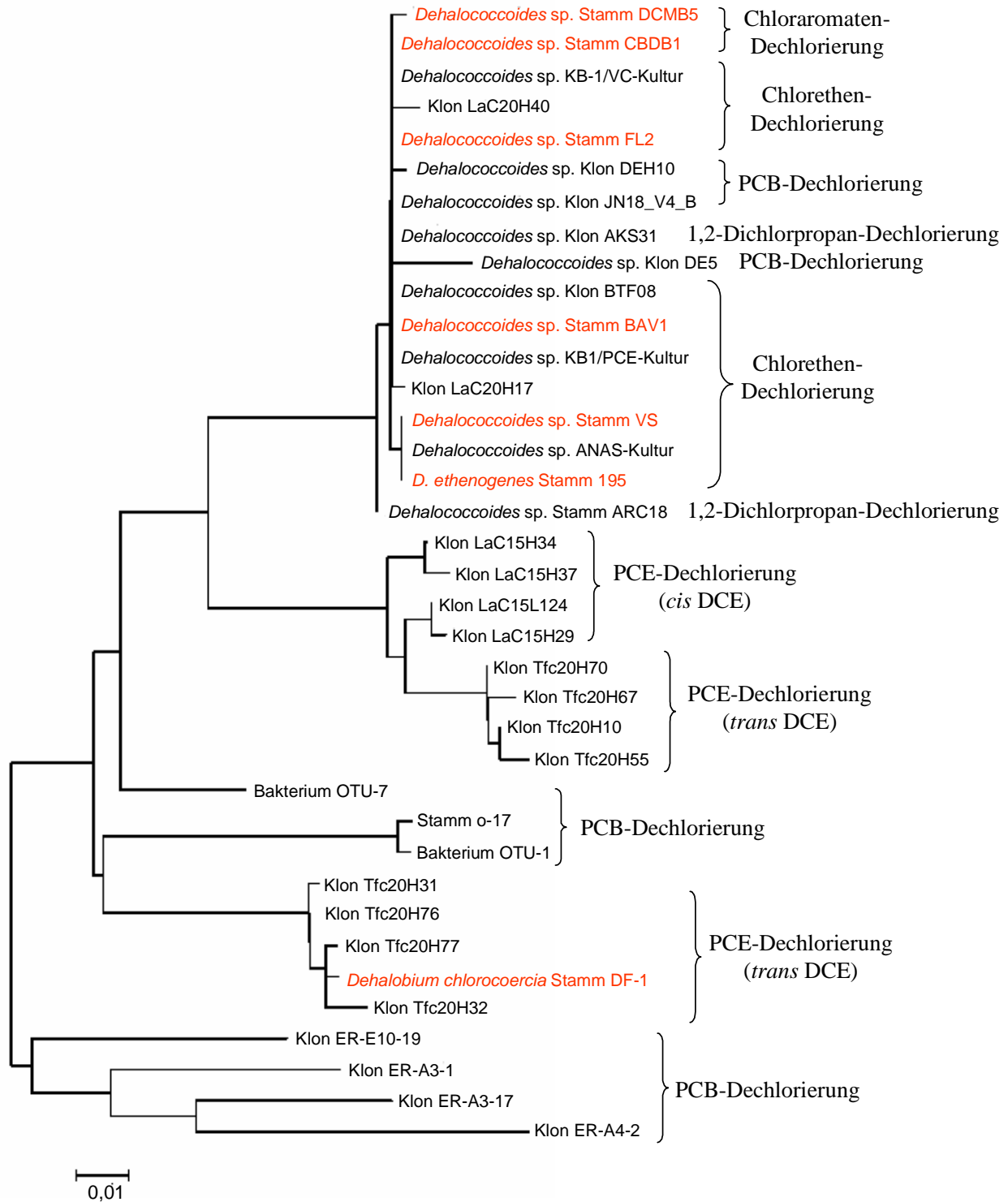


Abb. 1. Stammbaum einer Auswahl von Vertretern der *Dehalococcoidetes* basierend auf Teilsequenzen der jeweiligen 16S rRNA Gene (*E. coli* Nummerierung (Brosius *et al.*, 1981): Position 519-924). Zusätzlich ist das charakteristische Dechlorierungspotential der entsprechenden Rein- (rot) bzw. Mischkulturen angegeben. Die Länge des Balkens entspricht einem Sequenzunterschied von 1 %. In Klammern wird angegeben, ob die Tetrachlorethen-Dechlorierung hauptsächlich über *cis* oder *trans* DCE verläuft. PCB-polychlorierte Biphenyle; PCE-Tetrachlorethen; DCE-Dichlorethen

Dehalococcoides neben *Dehalobacter restrictus* die einzigen bislang bekannten obligaten Dehalorespirierer (Smidt und de Vos, 2004).

Unter Dehalorespiration versteht man die Übertragung von Elektronen von einem Elektronendonator über eine Elektronentransportkette auf eine reduktive Dehalogenase. Chemisch betrachtet wird an der reduktiven Dehalogenase die Übertragung zweier Elektronen auf ein halogeniertes Substrat bei gleichzeitiger Abspaltung eines Halogensubstituenten katalysiert. Im Rahmen des Elektronentransportprozesses kommt es zum Aufbau eines Protonengradienten, der über eine ATPase zur Bildung von ATP aus ADP und P_i genutzt wird (Abb. 2). Die Dehalorespiration ist eine Form der anaeroben Atmung, die energetisch mit der Nitratatmung vergleichbar ist (Dolfing und Janssen, 1994). So liegt das Standard-Redoxpotential des Redoxpaares Aromat-Cl/Aromat-H in einem Bereich zwischen 266-478 mV (Dolfing und Harrison, 1992). Die Gibbs freie Energie (ΔG^0) beträgt für die Abspaltung eines Chloridions zwischen 130 und 180 kJ/mol (Dolfing und Janssen, 1994).

Für *Dehalococcoides* sp. wurde bislang nur die Nutzung von Wasserstoff als Elektronendonator beobachtet. In den Genomsequenzen der Stämme 195 und CBDB1 wurden Gene identifiziert, die sowohl für Ni/Fe- (Hup, Hyc, Ech, Vhu) als auch Fe-Hydrogenasen (Hym) kodieren (Kube *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005). Jayachandran *et al.* (2004) zeigten, dass die am Dehalorespirationsprozess beteiligte Hydrogenase sehr Sauerstoff-empfindlich, an der Zellmembran lokalisiert und nach außen orientiert ist. Da in Proteomic-Studien stets nur Unterheiten der Hup-Hydrogenase identifiziert wurden (Morris *et al.*, 2006; Adrian *et al.*, 2007 b; Morris *et al.*, 2007), ist zu vermuten, dass dies die Hydrogenase ist, die die Elektronen für die reduktiven Dehalogenasen zur Verfügung stellt. Hinzu kommt, dass von den 5 kodierten Hydrogenasen nur das Gen der kleinen Untereinheit der Hup-Hydrogenase für eine Tat-Signalsequenz kodiert (Seshadri *et al.*, 2005). Damit scheint sie die einzige periplasmatisch lokalisierte Hydrogenase zu sein.

Die reduktiven Dehalogenasen werden durch zwei Gene kodiert. Die katalytische Untereinheit wird durch das *rdhA* (*reductive dehalogenase homologous*) Gen kodiert. Es tritt stets in einem Operon mit einem zweiten, kleineren Gen (*rdhB*) auf, dessen Genprodukt als B-Protein bezeichnet wird (Hölscher *et al.*, 2004). Die reduktiven Dehalogenasen von *Dehalococcoides* sp. sind an der Zellmembran nach außen orientiert (Hölscher *et al.*, 2003; Nijenhuis und Zinder, 2005), besitzen aber nur eine kurze hydrophobe Domäne in der Tat-Signalsequenz (Magnuson *et al.*, 2000). Da es sich bei dem B-Protein um ein stark hydrophobes Protein mit drei transmembranen Domänen handelt, wird vermutet, dass dieses Protein den Membrananker der reduktiven Dehalogenase darstellt (Magnuson *et al.*, 2000).

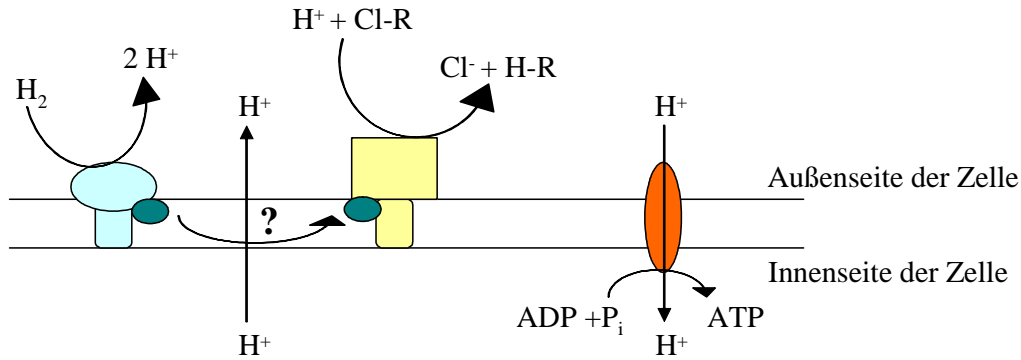


Abb. 2. Schematische Darstellung der Dehalorespiration. Die Hydrogenase stellt die für die Dehalogenase nötigen Elektronen zur Verfügung. Der Elektronentransport erfolgt über bislang unbekannte Carrier entlang der Membran. Die Dehalogenase ist nach außen orientiert und über das B-Protein an der Membran verankert. Die ATP-Synthase nutzt den erzeugten Protonengradienten zur Energiekonservierung.

Weitere typische Merkmale der *rdhA* Gene sind die Tat-Signalsequenz, Bindemotive für Fe/S-Zentren bzw. gegebenenfalls ein Corrinoïd-Kofaktor (Hölscher *et al.*, 2004).

Tat-Signalsequenzen wurden in den Gensequenzen aller bislang bekannten *rdhA* Gene verschiedener *Dehalococcoides* Stämme identifiziert (Hölscher *et al.*, 2004; Seshadri *et al.*, 2005; Kube *et al.*, 2005). Da über den Tat-Weg in der Regel nur gefaltete Proteine mit einem Kofaktor transportiert werden (Sargent, 2007), ist zu vermuten, dass auch die reduktiven Dehalogenasen von *Dehalococcoides* sp. im Cytoplasma gefaltet und mit dem Kofaktor versehen werden, bevor sie in den periplasmatischen Raum transportiert werden.

Obwohl Cobalamin-Bindemotive eher selten in *rdhA*-Gensequenzen identifiziert wurden (Hölscher *et al.*, 2004), besaßen die meisten bisher gereinigten reduktiven Dehalogenasen ein Corrinoïd als prosthetische Gruppe im aktiven Zentrum (Löfller *et al.*, 1996; Neuman *et al.*, 1996; Schumacher *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1998; Holliger *et al.*, 1999). Eine genauere Analyse des Cobalamin-Kofaktors führten Kräutler *et al.* (2003) durch und identifizierten ein Norpseudovitamin B12 im aktiven Zentrum der Tetrachlorethen (PCE)-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans*. Obwohl es aufgrund geringer Zellausbeuten bislang nicht gelang, den Kofaktor der reduktiven Dehalogenasen von *Dehalococcoides* sp. näher zu charakterisieren, weist eine Licht-reversible Hemmung durch Propyl- oder Ethyljodid auf die Anwesenheit eines Cobalamin-Kofaktors hin (Magnuson *et al.*, 1998; Hölscher *et al.*, 2003). Bei der reduktiven Dechlorierung kann das chlorierte Substrat nur mit dem enzymgebundenen Corrinoïd reagieren, wenn dieses in der Co^{1+} -Form vorliegt (Banerjee und Ragsdale, 2003). Der Mechanismus des Elektronentransfers am aktiven Zentrum der reduktiven Dehalogenasen konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Für PCE-Dehalogenasen von Nicht-*Dehalococcoides* Dechlorierern wurden allerdings verschiedene Wirkmechanismen postuliert. Bei

S. multivorans wurde ein Co^{3+} -Chlorethen-Komplex als Intermediat des reduktiven Dechlorierungsprozesses vorgeschlagen (Neumann *et al.*, 1996). Dieser Reaktionsmechanismus beinhaltet allerdings das Problem, dass Elektronen mit unterschiedlichen Redoxpotentialniveaus zur Verfügung gestellt werden müssen. Während für die Reduktion vom Co^{3+} zum Co^{2+} ein Redoxpotential von ≥ 0 V ausreichen würde, ist bei der Reduktion von Co^{2+} zu Co^{1+} ein Elektronendonator mit einem Redoxpotential von ≤ -360 mV nötig (Schumacher *et al.*, 1997). Schumacher *et al.* (1997) schlugen für die PCE-Dechlorierung durch *Dehalobacter restrictus* einen radikalischen Reaktionsmechanismus vor, weil eine dreiwertige Form des Cobalts in Analysen zur PCE-Dehalogenase nicht nachgewiesen werden konnte. Da Magnuson *et al.* (1998) eine Hemmung der Tetra- (PceA) bzw. Trichlorethendehalogenasen (TceA) des Stammes 195 nach Zugabe von Zyanid beobachteten, ist zu vermuten, dass Cob(III)alamin am katalytischen Zyklus der Dechlorierungsreaktion beteiligt ist (Holliger *et al.*, 1999). Eine genauere Aussage lässt sich allerdings erst nach weiterführenden Analysen treffen, da auch andere Metall-Kofaktoren, wie beispielsweise Fe/S-Zentren, durch Zyanid inhibiert werden können (Smith und McFeters, 1997).

Eine Untersuchung der *rdhA* Gensequenzen von *Dehalococcoides* ssp. ergab zwei putative Fe/S-Cluster-Bindestellen (Hölscher *et al.*, 2004). EPR-Analysen an gereinigten reduktiven Dehalogenasen weisen zudem auf die Bindung zweier Fe/S-Cluster hin (Schumacher *et al.*, 1997; van de Pas *et al.*, 1999). Zum Teil wurden zwei 4Fe-4S-Cluster identifiziert, zum Teil aber auch eine Kombination aus einem 4Fe-4S-Cluster und einem 3Fe-4S-Cluster. Das erste Bindemotiv der *rdhA* Gene von *Dehalococcoides* sp. zeigte stets die Sequenz des typischen Ferredoxin-Bindemotivs (CxxCxxCxxxCP; Bruschi und Guerlesquin, 1988). Das zweite Bindemotiv wies sowohl die Sequenz typischer 4Fe-4S-Cluster als auch davon abweichende Sequenzen auf. Dies ist möglicherweise ein Hinweis dafür, dass 3Fe-4S-Cluster gebunden werden (van de Pas *et al.*, 1999; Hölscher *et al.*, 2004). Da stets zwei Fe/S-Cluster vorhanden zu sein scheinen, ist zumindest die Möglichkeit gegeben, dass die für eine Co^{3+} -Corrinoid-Reduktion erforderlichen Elektronen auf verschiedenen Redoxpotentialniveaus angeliefert werden.

Über den Elektronentransport von der Hydrogenase zur reduktiven Dehalogenase ist bislang wenig bekannt. Für verschiedene dehalorespirierende Organismen wurde die Beteiligung von Cytochrom c oder b, Menachinon oder Ferredoxin an der Elektronenübertragung vermutet (Ni *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1996; Schumacher und Holliger, 1996; Holliger *et al.*, 1999). Bei Versuchen mit ganzen Zellen des *Dehalococcoides* Stammes CBDB1 konnten Chinon- oder Menachinonanaloga nicht als Elektronendonatoren für die Trichlorbenzoldehalogenase

genutzt werden (Jayachandran *et al.*, 2004). Obwohl Menachinone in der Regel an der Elektronenübertragung bei verschiedenen anaeroben Atmungsprozessen eine Rolle spielen (White *et al.*, 2005), kann eine Beteiligung von Menachinonen bei der Dehalorespiration von *Dehalococcoides* sp. nahezu ausgeschlossen werden, da Menachinon-Inhibitoren die Dechlorierung durch *Dehalococcoides* sp. Stamm 195 nicht hemmten (Nijenhuis und Zinder, 2005). Ein Einfluss von Chinonen ist hingegen durchaus denkbar, da zum einen die Chinoderivate Anthrachinon 2,6-Disulfonsäure (AQDS) und Pyrolochinolinchinon (PQQ) als Elektronendonatoren für TceA des Stammes 195 genutzt werden konnten (Nijenhuis und Zinder, 2005). Zudem zeigten Chinonanaysen von *Dehalococcoides* sp. einen für anaerobe Bakterien ungewöhnlich hohen Anteil an Ubichinon 8 (White *et al.*, 2005). Aufgrund des Redoxpotentials von Ubichinon/Ubichinol von + 0,11 V wäre so eine Übertragung von Elektronen auf die halogenierten Verbindungen theoretisch auch möglich (White *et al.*, 2005). Vertreter der *Dehalococcoidetes* sind in der Lage, eine Reihe chlororganischer Verbindungen als terminalen Elektronenakzeptor im Dehalorespirationsprozess zu nutzen (Tab. 1). Dazu zählen halogenierte Alkane und Alkene, aber auch chlorierte Benzole, Phenole, Biphenyle oder Dioxine. Nach neuestem Erkenntnisstand sind Vertreter der *Dehalococcoides* ssp. zudem in der Lage, 1,2-Dichlorpropan direkt zu Propan umzusetzen (Smidt und de Vos, 2004). Dabei scheint es sich allerdings eher um eine Dichloreeliminierung als um eine hydrogenolytische Reaktion zu handeln.

Während Chlorethen-dechlorierende Bakterien, die nicht zur Gattung *Dehalococcoides* zählen, PCE ausschließlich zu DCE dechlorieren (Neumann *et al.*, 1994, Miller *et al.*, 1997; Holliger *et al.*, 1998), können verschiedene *Dehalococcoides* Stämme Chlorethenderivate vollständig zu Ethen abbauen (Maymó-Gatell *et al.*, 1997; Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005, Sung *et al.*, 2006). Die Dehalogenierung von Chlorethenen ist der bislang am besten untersuchte Dechlorierungsprozess bei *Dehalococcoides* sp. Auch der überwiegende Teil der bisher näher charakterisierten Dehalogenasen ist an der Dechlorierung von Chlorethenen beteiligt (Magnuson *et al.*, 1998, Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2004).

Dehalococcoides ethenogenes Stamm 195 detoxifiziert PCE vollständig zu Ethen. Die ersten drei Schritte verlaufen metabolisch, d.h. sie sind mit einer Energiekonservierung verbunden (Tab. 1). Die Dechlorierung vom Vinylchlorid (VC) zum Ethen erfolgt hingegen kometabolisch (Maymó-Gatell *et al.*, 1999; Tab. 1). Im Gegensatz zu Stamm 195 sind die *Dehalococcoides* Stämme BAV1 und VS fähig, VC unter Energiekonservierung zu Ethen

Tab. 1. Halogenierte Verbindungen, die von Vertretern der *Dehalococcoides* entweder metabolisch oder cometabolisch umgesetzt werden.

Stamm	Metabolisches Substrat	Kometabolisches Substrat	Literatur
195	PCE; TCE; <i>cis</i> DCE; 1,1-DCE	<i>trans</i> DCE, VC	Maymó-Gatell <i>et al.</i> , 1997; 1999
	HCB; PeCB; 1,2,3,5-TeCB; 1,2,4,5-TeCB; 1,2,3,4-TeCB	1,2,3,4-TeCDD; 1,2,3,4- TrCDF; 1,2,3,4-TeCN; 2,3,4,5,6-PCB; 1,2,3-TrCB; 1,2,4-TrCB	Fennell <i>et al.</i> , 2004
	1,2,3,4,7,8-HeCDF; 1,3,4,7,8- PeCDF; 1,2,4,7,8-PeCDF		Liu und Fennell, 2008
	2,3-DCP; 2,3,4-TrCP; 2,3,6-TrCP		Adrian <i>et al.</i> , 2007 a
FL2	PCE; <i>cis</i> DCE; <i>trans</i> DCE	PCE; VC	He <i>et al.</i> , 2005
BAV1	<i>cis</i> DCE; <i>trans</i> DCE; 1,1-DCE; VC; Vinylbromid; 1,2-Dichlorethan	PCE; TCE	He <i>et al.</i> , 2003 a
VS	<i>cis</i> DCE; <i>trans</i> DCE; 1,1-DCE; VC		Cupples <i>et al.</i> , 2003; Müller <i>et al.</i> , 2004
GT	TCE; <i>cis</i> DCE, 1,1-DCE; VC		Sung <i>et al.</i> , 2006
CBDB1	1,2,3-TrCDD; 1,2,4-TrCDD; 2,3- DCDD; 1,2,3,4-TeCDD; 1,2,3,7,8- PeCDD		Bunge <i>et al.</i> , 2003
	HCB; PeCB		Jayachandran <i>et al.</i> , 2003
	1,2,3-TrCB; 1,2,4-TrCB; 1,2,4,5- TeCB; 1,2,3,4-TeCDD; 1,2,3,5- TeCB		Adrian <i>et al.</i> , 2000 b
	2,3-DCP; PeCP; alle 3 TeCP; alle 6 TrCP	2,5-DCP; 3,4-DCP	Adrian <i>et al.</i> , 2007 a
	PCE		Junick, 2007
DCMB5	1,2,3-TrCDD; 1,2,4-TrCDD		Ewald <i>et al.</i> , 2007
	1,2,3-TrCB		Bunge <i>et al.</i> , 2008
DF-1	PCE; TCE		Müller <i>et al.</i> , 2005
	einige PCB-Kongenere; Arochlor1260		May <i>et al.</i> , 2008
	HCB; PeCB; 1,2,3,5-TeCB		Wu <i>et al.</i> , 2002 a
o-17	2,3,4-PCB; 2,3,5-PCB; 2,4,5-PCB; 2,3,4,5-PCB; 2,3,4,6-PCB; 2,3,5,6-PCB; 2,3,4,5,6-PCB, 2,3,3',5,5',6-PCB		May <i>et al.</i> , 2006
	PCE		
	HCB; PeCB; 1,2,4,5-TeCB; 1,2,3-TrCB		

HeCDF-Hexachlordibenzofuran, PeCDF-Pentachlordibenzofuran, TrCDF-Trichlordibenzofuran, TeCN-Tetrachlornaphthalen, PeCDD-Pentachlordibenzo-*p*-dioxin, TeCDD-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin, TrCDD-Trichlordibenzo-*p*-dioxin, DCDD-Pentachlordibenzo-*p*-dioxin, HCB-Hexachlorbenzol, PeCB-Pentachlorbenzol, TeCB-Tetrachlorbenzol, TrCB-Trichlorbenzol, PCE-Perchlorethen, TCE-Trichlorethen, DCE-Dichlorethen, VC-Vinylchlorid, PeCP-Pentachlorphenol, TeCP-Tetrachlorphenol, TrCP-Trichlorphenol, DCP-Dichlorphenol, PCB-polychlorierte Biphenyle

umzusetzen (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004, Müller *et al.*, 2004). Beide Stämme können allerdings die höher chlorierten Ethene PCE und Trichlorethen (TCE) nicht oder nur kometabolisch dechlorieren (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004, Müller *et al.*, 2004; Tab. 1).

Neben den *Dehalococcoides* sp., die auf eine Dechlorierung von Chloralkenen spezialisiert scheinen, gibt es aber auch Stämme, die bevorzugt halogenierte Aromaten als terminalen Elektronenakzeptor verwenden (Adrian *et al.*, 2000 b, Bunge *et al.*, 2008). Stamm CBDB1 wurde beispielsweise auf Trichlorbenzolen isoliert (Adrian *et al.*, 2000 b). Mittlerweile zeigte

sich, dass dieser Stamm neben Chlorbenzolen auch chlorierte Phenole und Dioxine, aber auch PCE dechloriert (Bunge *et al.*, 2003; Adrian *et al.*, 2007 a; Junick, 2007).

Obwohl bislang überwiegend chlorierte Verbindungen als Substrate von *Dehalococcoides* sp. getestet wurden, lässt sich vermuten, dass diese nicht die natürlichen Substrate von *Dehalococcoides* darstellen, da chlororganische Verbindungen eher anthropogenen Ursprungs sind. In diesem Zusammenhang zeigten Analysen zur Enzymaktivität von TceA des *Dehalococcoides* sp. Stammes 195, dass der Austausch des Chlorsubstituenten gegen einen Bromsubstituenten zu einer erhöhten Enzymaktivität führte (Magnuson *et al.*, 2000). Auch Dechlorierungsversuche mit VC bzw. Vinylbromid (VB) zeigten, dass VB mit einer höheren Dechlorierungsrate umgesetzt wurde als VC (Gu *et al.*, 2003). Bei einer parallelen Zugabe von VC und VB zu den Kulturen kam es zu einer Hemmung der VC-Dechlorierungsaktivität. Das deutet darauf hin, dass beide Substanzen die Substrate eines Enzyms sind. Zieht man in Betracht, dass eine Vielzahl mariner Organismen (unter anderem Schwämme) eine Reihe bromierter Verbindungen produziert (Ahn *et al.*, 2003), lässt sich vermuten, dass *Dehalococcoides* sp. einen marinen Ursprung haben.

Die starke Spezialisierung von *Dehalococcoides* auf die Dehalorespiration spiegelt sich unter anderem in der großen Zahl an *rdhA* Genen im Genom wider. So finden sich in den Genomen der Stämme 195, CBDB1, BAV1 und VS jeweils 19, 32, 14 bzw. 34 *rdhA* Gene (Kube *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005). Trotz der Tatsache, dass eine Vielzahl von *rdhA* Gensequenzen bekannt ist, weiß man bislang nur sehr wenig über die Funktion der einzelnen Genprodukte. Bislang wurden nur die Tetrachlor- und Trichlorethen-reduktiven Dehalogenasen (PceA und TceA; Magnuson *et al.*, 1998, 2000) des Stammes 195, die Vinylchloriddehalogenase des Stammes VS (VcrA; Müller *et al.*, 2004) und die Chlorbenzoldehalogenase des Stammes CBDB1 (CbrA; Adrian *et al.*, 2007 b; entspricht CbdbA84 (Kube *et al.*, 2005)) in Bezug auf ihr Substratspektrum näher charakterisiert. Mit Hilfe von Transkriptionsanalysen wurde zudem das Gen der Vinylchloriddehalogenase (*bvcA*) des Stammes BAV1 identifiziert.

Bei genauerer Betrachtung der Regionen, die die *rdhA* Gensequenzen flankieren, fanden sich in der Nachbarschaft der *rdhAB*-Operone mit einer großen Häufigkeit Gene verschiedener Regulatoren (Kube *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005) und σ^{70} ähnliche Promotorbereiche (Magnuson *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2004; Fung *et al.*, 2007). So sind mit Ausnahme eines *rdhA* Gens (*tceA*) alle intakten *rdh*-Gene des Stammes 195 eng mit regulatorischen Genen assoziiert, die überwiegend für Zweikomponentensystem Regulatoren kodieren (Seshadri *et al.*, 2005). Von den 32 *rdh*-Genen des Stammes CBDB1 befinden sich 15 in der Nähe von

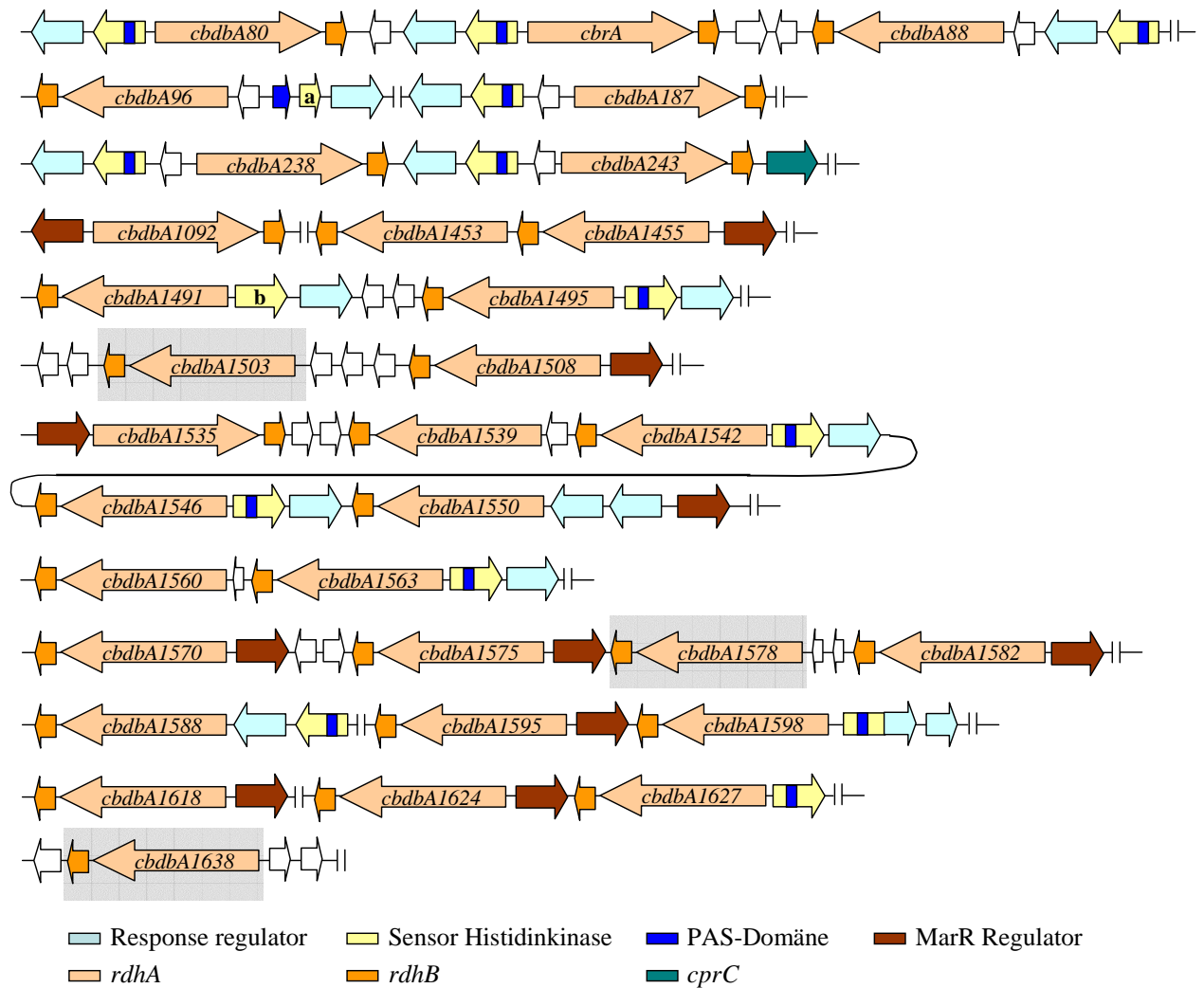


Abb. 3. Schematische Darstellung zur Anordnung von regulatorischen Genen in der Nachbarschaft von *rdhAB*-Operonen des *Dehalococcoides* Stammes CBDB1 (Kube *et al.*, 2005). Grau unterlegt sind die *rdhAB*-Operone, in deren Nähe sich keine regulatorischen Gene befinden. a: ATP-Bindedomäne einer Sensor Histidinkinase, b: ArcB Domäne

Genen von Zweikomponentensystem Regulatoren und 13 in der Nähe von Genen MarR-ähnlicher Regulatoren (Kube *et al.*, 2005; Abb. 3). Neben diesen beiden dominierenden Familien regulatorischer Gene wurden zusätzlich Gene weiterer Transkriptionsregulatoren in der Nachbarschaft von *rdhA* Genen identifiziert. Diese sind in die Familien der NosR/NirI- bzw. CRP/FNR-Familien einzuordnen (Müller *et al.*, 2004; Seshadri *et al.*, 2005).

MarR (*multiple antibiotic resistance regulator*)-ähnliche Regulatoren sind an der Kontrolle der Virulenzfaktorproduktion, der Antwort auf Antibiotika bzw. oxidativen Stress, und der Kontrolle des Katabolismus aromatischer Verbindungen beteiligt (Wilkinson und Grove, 2006). MarR-ähnliche Proteine treten sowohl in der freien als auch der DNA-gebundenen Form als Homodimere auf. Die Bindung der DNA erfolgt an palindromische oder pseudopalindromische Bindesequenzen über ein geflügeltes Helix-Motiv (Wilkinson und Grove, 2006). Die Erkennung der Bindesequenz erfolgt über die α -Helix, die sich in die große

Furche der DNA einlagert (Lim *et al.*, 2002). Die Flügel stabilisieren die Protein-DNA-Bindung über Wechselwirkungen mit den organischen Basen der kleinen Furche und/oder dem Phosphatrückgrat. Der Verlust eines Teils der Erkennungssequenz führt sofort zum Verlust der DNA-Bindefähigkeit (Lim *et al.*, 2002).

Ein weiteres Charakteristikum von MarR-ähnlichen Regulatoren ist, dass die DNA-Bindung durch anionische, lipophile Liganden beeinflusst wird (Wilkinson und Grove, 2006). Wie bereits erwähnt, spielen MarR-ähnliche Regulatoren eine Rolle im Abbau aromatischer Verbindungen. Das MarR Homologe CbaR aus *Comamonas testosteroni* scheint beispielsweise die Transkription des *cbaABC*-Operons zu reprimieren (Providenti und Wyndham, 2001). So setzen die Proteine CbaA, CbaB und CbaC 3-Chlorbenzoat zu Protocatechuat bzw. 5-Cl-Protocatechuat um. Im Promotorbereich des *cbaABC*-Operons finden sich zwei Bindestellen für CbaR, die aufgrund von Sequenzunterschieden verschiedene Affinitäten zu CbaR besitzen (Providenti und Wyndham, 2001). Die Bindung von 3-Chlorbenzoat an CbaR führt zu einer Aufhebung der Regulator-DNA-Interaktion und damit zur Expression des *cbaABC*-Operons (Abb. 4).

Genomanalysen des Stammes CBDB1 ergaben, dass Gene, die für MarR-ähnliche Regulatoren kodieren, nur in der zweiten Hälfte des Genoms zu finden sind (Kube *et al.*, 2005). Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die MarR-ähnlichen Gene der Stämme CBDB1 und 195, die in der Nähe von *rdh* Genen liegen, ein eigenes Cluster im Stammbaum der MarR Regulatoren bilden.

Ein ähnliches Phänomen findet sich im Genom von *Desulfitobacterium hafniense*, denn von den 17 im Genom kodierten CPR/FNR-Homologen bilden fünf ein eigenes distinktes Cluster (Smidt und de Vos, 2004). Mit einer Ausnahme befinden sich alle Gene in enger Nachbarschaft von *rdhAB*-Operonen. Diese fünf CPR/FNR-Regulatorgene weisen zudem eine hohe Sequenzidentität zu *cprK* aus *Desulfitobacterium dehalogenans* auf, das zur gleichen Regulatorfamilie zu zählen ist (Smidt und de Vos, 2004). CprK ist der einzige bisher näher untersuchte Regulator, der an der Transkriptionsregulation von *rdh* Genen beteiligt ist. CprK aktiviert die Transkription des *cprABCD*-Operons in Gegenwart des Wachstumssubstrates 3-Chlor-4-hydroxyphenylacetat (3-CIOHPA, Smidt *et al.*, 2000). Nach Zugabe von 3-CIOHPA wurde die Transkription innerhalb von 30 min 15 fach induziert. Genauere Analysen von CprK zeigten, dass die DNA-Bindung an spezifische Sequenzmotive (sogenannte Dehaloboxen) nur erfolgt, wenn sich das CprK-Dimer in reduzierter Form befindet und der Effektor gebunden wurde (Pop *et al.*, 2006; Abb. 4).

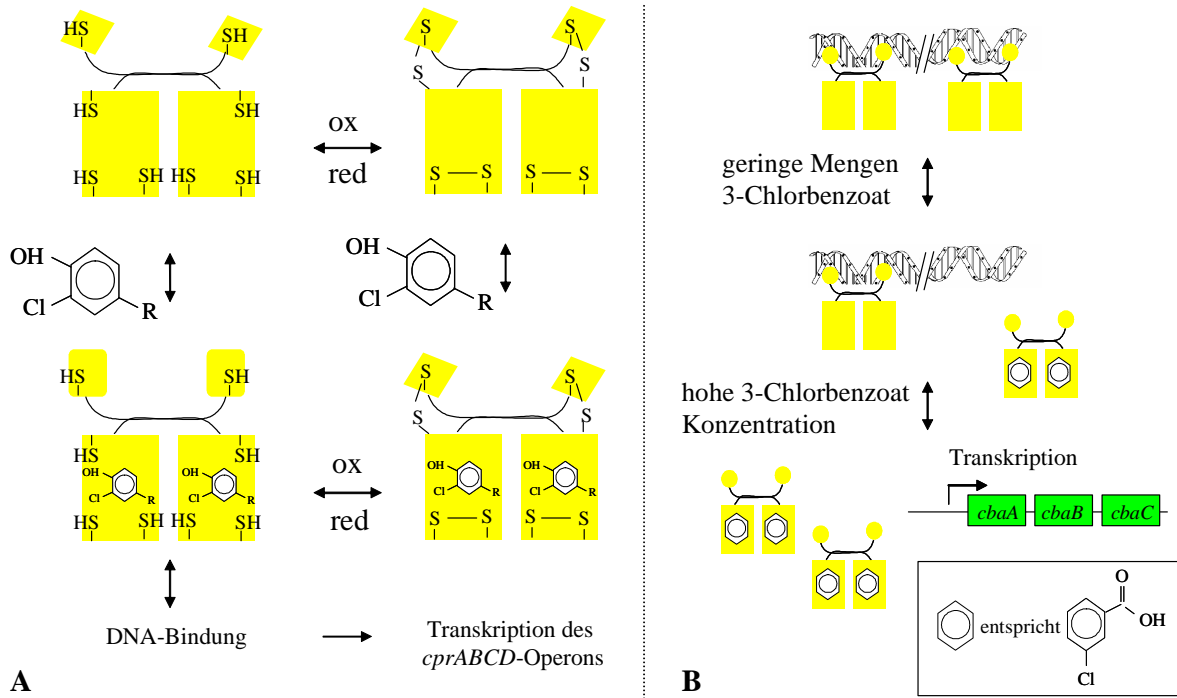


Abb. 4. Schematische Darstellung zum Reaktionsmechanismus der Proteine CprK (A, nach Pop *et al.*, 2006) und CbaR (B), die beide an der Regulation des Abbaus halogenierter, aromatischer Verbindungen beteiligt sind. CprK ist ein positiver Regulator des *cprABCD*-Operons von *Desulfitobacterium dehalogenans*. CprK ist in der Lage, den aromatischen Liganden 3-Chlor-4-hydroxyphenylacetat sowohl im reduzierten als auch im oxidierten Zustand zu binden. Eine Konformationsänderung, die für die DNA-Bindung essentiell ist, findet allerdings nur im reduzierten Zustand statt. CbaR zählt zur Klasse der MarR-ähnlichen Regulatoren und ist ein negativer Regulator des *cbaABC*-Operons in *Commamonas testosteroni*. CbaR besitzt im Promotorbereich des eben genannten Operons zwei Bindestellen mit unterschiedlich hoher Bindeaffinität. Nach Bindung des Wachstumssubstrates 3-Chlorbenzoat kommt es zur schrittweisen Ablösung beider Regulatordimere und damit zur Transkription der Gene *cbaA*, *cbaB* und *cbaC*.

Zweikomponenten Regulatorsysteme bestehen aus zwei Regulatorproteinen, den Sensor-Histidinkinasen und den Response-Regulatoren. Die Signalperzeption erfolgt über den N-Terminus des Sensorproteins durch Phosphorylierung eines konservierten Histidins (Laub und Goulian, 2007). Die Übertragung der Phosphatgruppe auf den Response-Regulator führt zu dessen Aktivierung und über die Modifikation der DNA-Bindekapazität zur Transkription der nachgeschalteten Gene.

Eine Besonderheit von Sensor-Histidinkinasen der *Dehalococcoides* Stämme CBDB1 und 195 ist ihre cytoplasmatische Lokalisierung, sofern sich das entsprechende Gen in der Nähe eines *rdhAB*-Operons befindet (Kube *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005). Die ansonsten typischen transmembranen Helices fehlen ihnen gänzlich. Daraus lässt sich schließen, dass diese Sensor-Histidinkinasen weniger auf extrazelluläre als auf intrazelluläre Signale reagieren (Seshadri *et al.*, 2005). Die *rdh* Gen-assoziierten Histidinkinasen verschiedener *Dehalococcoides* Stämme weisen stets die für Zweikomponenten Regulatoren typische PAS-Domäne auf (Kube *et al.*, 2005, Seshadri *et al.*, 2005). PAS-Domänen sind in der Lage,

Sauerstoff, Liganden, Licht aber auch Änderungen im Redoxpotential wahrzunehmen (Taylor und Zhulin, 1999). Es wird vermutet, dass die Sensor-Histidinkinasen nicht über die Bindung der halogenierten Substrate, sondern durch Veränderungen in der *proton motif force* oder im Redoxpotential aktiviert werden (Waller *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollten zwei *Dehalococcoides* Stämme näher untersucht werden, zum einen der auf Chlorbenzolen isolierte Stamm CBDB1 (Adrian *et al.*, 2000 b) und zum anderen der Stamm DCMB5 (Bunge *et al.*, 2008). Letzterer kann verschiedene Dioxinkongenere und 1,2,3-TrCB dechlorieren (Bunge *et al.*, 2008). Die 16S rRNA Gene der Stämme CBDB1 und DCMB5 sind identisch. Im Dechlorierungspotential beider Stämme finden sich aber einige charakteristische Unterschiede. Während Stamm CBDB1 sowohl 1,2,3- als auch 1,2,4-TrCB als Wachstumssubstrate nutzen kann (Adrian *et al.*, 2000 b), wächst Stamm DCMB5 nur mit 1,2,3-TrCB als terminalem Elektronenakzeptor der Dehalorespiration (Bunge *et al.*, 2008). Stamm DCMB5 wurde aus dem stark mit chlorierten Kohlenwasserstoffen verunreinigten Spittelwassersediment (Region Bitterfeld) angereichert (Bunge *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Stamm DCMB5-haltigen Mischkulturen und nicht mit der entsprechenden Reinkultur gearbeitet.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung verschiedener Strategien zur Anreicherung von Bakterium DCMB5 in Dioxin- und Chlorbenzol-dechlorierenden Mischkulturen. Zusätzlich sollte eine genetische Abgrenzung dieses *Dehalococcoides* Stammes von anderen *Dehalococcoides* Stämmen mit sehr ähnlicher oder gleicher 16S rRNA Gensequenz erfolgen. Dazu sollten zum einen die flankierenden Bereiche des 16S rRNA Gens charakterisiert und zum anderen *rdh* Gene an DNA des Stammes DCMB5 amplifiziert, differenziert und identifiziert werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten durch Analyse der Transkription der *rdhA* Gene von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 in Gegenwart verschiedener halogener Elektronenakzeptoren Hinweise auf die Funktion einzelner RdhA Proteine gewonnen werden. Anschließend sollten Einblicke in die Rolle MarR-ähnlicher Proteine bei der Transkriptionsregulation der *rdhA* Gene durch Interaktionsstudien von heterolog produzierten, ausgewählten MarR-Homologen mit den Promotorregionen der entsprechenden *rdhA* Gene erhalten werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die Substanzen für die Kultivierung und Analytik wurden von folgenden Firmen bezogen:

- AccuStandard Inc., New Haven, USA:	1,2,3,4-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin	(1,2,3,4-TeCDD)
	1,2,3-Trichlordibenzo- <i>p</i> -dioxin	(1,2,3-TrCDD)
	1,2,4-Trichlordibenzo- <i>p</i> -dioxin	(1,2,4-TrCDD)
	2,3-Dichlordibenzo- <i>p</i> -dioxin	(2,3-DCDD)
	1,3-Dichlordibenzo- <i>p</i> -dioxin	(1,3-DCDD)
	2,7-Dichlordibenzo- <i>p</i> -dioxin	(2,7-DCDD)
	1-Monochlordibenzo- <i>p</i> -dioxin	(1-MCDD)
	2-Monochlordibenzo- <i>p</i> -dioxin	(2-MCDD)
- Sigma-Aldrich, Steinheim	5,6-Dibromacenaphthen	(5,6-DBrACN)
	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan	(HMN)
	1,2,3-Trichlorbenzol	(1,2,3-TrCB)
	1,2,4-Trichlorbenzol	(1,2,4-TrCB)
	1,3,5-Tribrombenzol	(1,3,5-TrBB)
- AppliChem, Darmstadt	Dibenzo- <i>p</i> -dioxin	(DBD)
- Difco Laboratories, Detroit, USA	Hefeextrakt	
- Roth, Karlsruhe	<i>n</i> -Hexan	
	Aceton	
- Air Liquide Deutschland, Düsseldorf	Aligal 12 (80 % N ₂ / 20 % CO ₂)	
	Stickstoff 4.0	
	Stickstoff 5.0	
	Helium 5.0	
	Wasserstoff 5.0	
	Druckluft	

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Unternehmen Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) und Serva (Heidelberg) in den Reinheitsgraden *purum* oder höher bezogen.

2.2 Organismen und Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2 zusammengefasst. Die Reinkultur von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Lorenz Adrian (TU Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und deren Merkmale sind in Tab. 3 aufgeführt. Bei den verwendeten Vektoren handelte es sich um pGEM[®]T-Easy (Amp^r, lacPOZ⁻; Promega, Mannheim), pASK-IBA3 (Amp^R, fl-IG, *bla*, *ori*, t_{lpp}, *tet*-repressor, *tetA*-Promotor/Operator, *Strep-tag* II C-terminal, IBA, Göttingen) und pASK-IBA5 (Amp^R, fl-IG, *bla*, *ori*, t_{lpp}, *tet*-repressor, *tetA*-Promotor/Operator, *Strep-tag* II N-terminal; IBA).

Tab. 2. Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
<i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm CBDB1	Wildtyp	Adrian <i>et al.</i> , 2000 b
Mischkultur mit <i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm DCMB5	Wildtyp	Bunge <i>et al.</i> , 2008
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF ⁺	$\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, <i>endA1 supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F ⁺ <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^f Z Δ M15, Tn10(Tet ^r)]	Stratagene, Amsterdam
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)-CodonPlus-RIL	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> 1 (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU ileYleuW</i> Cm ^r]	Stratagene, Amsterdam

Tab. 3. Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide

Plasmid	Insert-Beschreibung [für die Amplifikation verwendetes Primerpaar]
Externer Standard für die quantitative PCR^a	
pMB3_2/10	16S rRNA Gen von <i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm DCMB5
pCBDBA84	Partialsequenz des <i>rdhA</i> Gens <i>cbrA</i> (67640-67841) ^b
pCBDBA1624	Partialsequenz des <i>rdhA</i> Gens <i>cbdbA1624</i> (1317403-1317574) ^b
pCBDBA1453	Partialsequenz des <i>rdhA</i> Gens <i>cbdbA1453</i> (1146531-1146698) ^b
pCBDBA1588	Partialsequenz des <i>rdhA</i> Gens <i>cbdbA1588</i> (1275489-1275705) ^b
pCBDBA187	Partialsequenz des <i>rdhA</i> Gens <i>cbdbA187</i> (171446-171640) ^b
pCBDBA1618	Partialsequenz des <i>rdhA</i> Gens <i>cbdbA1618</i> (1310147-1310352) ^b
pCBDBA243	Partialsequenz des <i>rdhA</i> Gens <i>cbdbA243</i> (214143-214376) ^b
pCBDBA80	Partialsequenz des <i>rdhA</i> Gens <i>cbdbA80</i> (61831-62027) ^b
pCBDBA88	Partialsequenz des <i>rdhA</i> Gens <i>cbdbA88</i> (73474-73717) ^b
pCBDBA1563	Partialsequenz des <i>rdhA</i> Gens <i>cbdbA1563</i> (1249556-1249774) ^b
pLUCI	Partialsequenz von <i>Photinus pyralis</i> Luziferase cDNA ^c
pRPO_A	Partialsequenz des Gens der DNA-abhängigen RNA Polymerase, Alpha Untereinheit (<i>rpoA</i>) (380021-380172) ^b
pRPO_B	Partialsequenz des Gens der DNA-abhängigen RNA Polymerase, Beta Untereinheit (<i>rpoB</i>) (476866-477046) ^b
pEF_TU	Partialsequenz des Gens des Translations Elongations Faktors Tu (<i>tuf</i>) (784779-784935) ^b
Gel shift assays^a	
pP1-P2	Intergener Bereich der Gene <i>cbdbA1624/1625</i> , PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar P1/P2 (1318368-1318656) ^b
pP1-P3	Intergener Bereich der Gene <i>cbdbA1624/1625</i> , PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar P1/P3 (1318368-1318465) ^b
pP4-P5	Intergener Bereich der Gene <i>cbdbA1624/1625</i> , PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar P4/P5 (1318448-1318554) ^b
pIR-CBDBA84	Intergener Bereich der Gene <i>cbdbA83/84</i> , PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar CbdbA84-for/CbdbA84-rev (67248-67598) ^b
pIR-CBDBA1453	Intergener Bereich der Gene <i>cbdbA1453/1454</i> , PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar CbdbA1453-for/CbdbA1453-rev (1147493-1147968) ^b
Expression von <i>cbdbA1625</i>	
pCBDBA1625-IBA5 ^d	Amp ^R , PCR-amplifiziertes Gen <i>cbdbA1625</i> , ligiert in die BsaI Schnittstelle des pASK-IBA5 Vektors (1318640-1319122) ^b
pCBDBA1625-IBA3 ^e	Amp ^R , PCR-amplifiziertes Gen <i>cbdbA1625</i> , ligiert in die BsaI Schnittstelle des pASK-IBA3 Vektors (1318637-1319122) ^b

Fortsetzung Tab. 3

Plasmid	Insert-Beschreibung [für die Amplifikation verwendetes Primerpaar]
Klonbibliothek von 16S rRNA-Genen^a	
pSPIT5-9/24	16S rRNA Gen, ARDRA-Muster 33 (Tab. 13)
pSPIT5-2/4	16S rRNA Gen, ADRDA-Muster 34 (Tab. 13)
pSPIT5-2/11	16S rRNA Gen, ARDRA-Muster 35 (Tab. 13)
pSPIT5-2/30	16S rRNA Gen, ARDRA-Muster 36 (Tab. 13)
pSPIT5-3/28	16S rRNA Gen, ARDRA-Muster 37 (Tab. 13)
pSPIT5-3/47	16S rRNA Gen, ARDRA-Muster 38 (Tab. 13)
pSPIT9-4B-13	16S rRNA Gen, ARDRA-Muster 39 (Tab. 14)
RFLP und Sequenzierung von <i>rdhA</i> Genen des Stammes DCMB5^a	
p4/1-1a, p4/20-1a, p1/11-1a	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA3</i> [cl-1a-f/cl-1a-r]
p4/15-1a	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA1</i> [cl-1a-f/cl-1a-r]
p4/18-1a	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA4</i> [cl-1a-f/cl-1a-r]
pD1-1b, pD6-1b, pD16-1b	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA5</i> [cluster 1b_f/cl-1b-r]
pD1-1c, pD9-1c, pD28-1c	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA6</i> [cl-1c-f/cl-1c-r]
pD6-1c	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA3</i> [1-1c-f/cl-1c-r]
p+D1-2a, p+D6-2a	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA9</i> [cluster 2a_f/cl-2a-r]
p+D9-2a, pD29-2a, pD60-2a	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA11</i> [cluster 2a_f/cl-2a-r]
p+D35-2a, p++D31-2a	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA7</i> [cluster 2a_f/cl-2a-r]
pD1-2b, pD76-2b, pD83-2b	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA15</i> [cluster 2b_f/cl-2b-r]
pD68-2b	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA13</i> [cluster 2b_f/cl-2b-r]
pD3-3, pD14-3, pD61-3, pD62-3	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA14</i> [cluster 3_f/cl-3-r]
pD5-3	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA17</i> [cluster 3_f/cl-3-r]
pD7-3, pD13-3, pD30-3, pD44-3	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA16</i> [cluster 3_f/cl-3-r]
pD1-4b, pD2-4b, pD30-4b	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA18</i> [cluster 4_f/cluster 4b_r]
p1/27-uni, p1/5-uni	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA9</i> [RRF2/B1R]
p1/23-uni, p3/18-uni, p3/23-uni	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA13</i> [RRF2/B1R]
p1/21-uni, p2/11-uni	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA6</i> [RRF2/B1R]
p1/1-uni, p3/10-uni	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA12</i> [RRF2/B1R]
p3/26-uni	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA7</i> [RRF2/B1R]
p3/5-uni	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA8</i> [RRF2/B1R]
p1/8-uni	Partialsequenz von DCMB <i>rdhA10</i> [RRF2/B1R]

^aVektor: pGEM[®]T-Easy, ^bPosition im Genom von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1, ^cerhalten durch reverse Transkription von Luziferase mRNA (*luciferase control* RNA, Promega), ^dVektor: pASK-IBA5, ^eVektor: pASK-IBA3

2.2.1 Herkunft und Kultivierung von *Dehalococcoides* sp. Stamm DCMB5

Aus einem 1,2,3,4-TeCDD-dechlorierenden primären Mikrokosmos, inokuliert mit Spittelwassersediment, wurden 1,2,4-TrCDD-dechlorierende Anreicherungskulturen erhalten (Bunge *et al.*, 2001). Nach dem vierten Transfer mit 1,2,4-TrCDD (Spit 1, Tab. 4) folgten erste Dechlorierungsversuche mit 1,2,3-TrCB (Spit 3), das über eine Hexadekanphase in einer Zweiflüssigphasenkultur zugegeben wurde. An die Zweiflüssigphasenkultur mit 1,2,3-TrCB schloss sich eine Zweiflüssigphasenkultur mit 1,2,3,4-TeCDD (Spit 4) an, die zusätzlich mit Bromethansulfonsäure (BES), einem Inhibitor gegen Methanogene, versetzt wurde. Es folgten Subkulturen mit 1,2,4-TrCDD als Elektronenakzeptor unter dem Zusatz von BES oder/und Vancomycin (Van), einem Antibiotikum gegen grampositive Bakterien (Wagner, 2004).

Diese Kulturen dienten als Inoculum für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit. Auf drei Transfers mit 40 µM 1,2,4-TrCDD (Spit 5-7) folgten drei Transfers mit 10 mM

Tab. 4. Kultivierungsschema der untersuchten dioxinchlorierenden Mischkulturen.

Kultur	Parallelansätze	C-Quelle		Elektronendonator					Elektronenakzeptor			Inhibitoren			Inoculum	weitere Zusätze	Referenz	
		Acetat [mM]		Pyruvat [mM]	Fumarat [mM]	Formiat [mM]	Benzoat [mM]	Butyrat [mM]	Wasserstoff	1,2,3,4-TeCDD [μ M]	1,2,4-TrCDD [μ M]	1,2,3-TrCB [mM] ¹	BES	Vancomycin [mg/l]				Penicillin [mg/l]
Primärer Mikrokosmos 4 Transfers		5		2,5	2,5	2,5	2,5		50						Spittelwassersediment		Bunge <i>et al.</i> , 2001	
Spit 1 (4. Transfer)		5		2,5	2,5	2,5	2,5			25							Bunge <i>et al.</i> , 2003 Bunge, 2004	
Spit 3		2,5		1,25	1,25	1,25	1,25				10			Spit 1			Bunge, 2004	
Spit 4		5		2,5	2,5	2,5	2,5		3,3 mM ¹			5		Spit 3			Bunge, 2004	
"TeCDD"-Vorkultur	a	2,5		1,25	1,25	1,25	1,25			50				Spit 4			Wagner, 2004	
	b	2,5		1,25	1,25	1,25	1,25			50		5		Spit 4			Wagner, 2004	
	c	2,5		1,25	1,25	1,25	1,25			50		5	5	Spit 4			Wagner, 2004	
"TeCDD"-Hauptkultur	a	2,5		1,25	1,25	1,25	1,25			50				"TeCDD"-Vorkultur-a			Wagner, 2004	
	b	2,5		1,25	1,25	1,25	1,25			50		5		"TeCDD"-Vorkultur-b			Wagner, 2004	
	c	2,5		1,25	1,25	1,25	1,25			50		5	5	"TeCDD"-Vorkultur-c			Wagner, 2004	
Spit 5	a	2,5		1,25	1,25	1,25				40				"TeCDD"-Hauptkultur-a			diese Arbeit	
	b	2,5		1,25	1,25	1,25				40		5		"TeCDD"-Hauptkultur-b			diese Arbeit	
	c	2,5		1,25	1,25	1,25				40		5	5	"TeCDD"-Hauptkultur-c			diese Arbeit	
Spit 6	a	2,5		1,25	1,25	1,25				40				Spit 5-a			diese Arbeit	
	b	2,5		1,25	1,25	1,25				40		5		Spit 5-b			diese Arbeit	
	c	2,5		1,25	1,25	1,25				40		5	5	Spit 5-c			diese Arbeit	
Spit 7	a	2,5		1,25	1,25	1,25				40				Spit 6-a	fermentierter Hefeextrakt oder steriler Kulturüberstand Stamm 195 oder DCMB5- Mischkultur		diese Arbeit	
	b	2,5		1,25	1,25	1,25				40		5		Spit 6-b				diese Arbeit
	c	2,5		1,25	1,25	1,25				40		5	5	Spit 6-c				diese Arbeit
	d	2,5						x		40		5	5	Spit 6-c				diese Arbeit
	e	2,5					1,25	x		40				Spit 6-c				diese Arbeit
Spit 8	a	2,5		1,25	1,25	1,25					10			Spit 7-a			diese Arbeit	
	b	2,5		1,25	1,25	1,25					10	5		Spit 7-a			diese Arbeit	
Spit 9	4B	2,5		1,25	1,25	1,25					10			Spit 8-a			diese Arbeit	
	2B	2,5						x			10			Spit 8-b			diese Arbeit	
Spit 10	a	2,5		1,25	1,25	1,25					10	5		Spit 9-4B			diese Arbeit	
	b	2,5		1,25	1,25	1,25					10	5	5	Spit 9-2B			diese Arbeit	
	c	2,5		1,25	1,25	1,25					10	5		Spit 9-2B		5	diese Arbeit	
	d	2,5		1,25	1,25						10	5		Spit 9-4B			diese Arbeit	
	e	2,5		1,25							10	5		Spit 9-4B			diese Arbeit	
	f	2,5			1,25						10	5		Spit 9-4B			diese Arbeit	
	g	2,5				1,25					10	5		Spit 9-4B			diese Arbeit	
	h	2,5				1,25		x			10	5		Spit 9-4B			diese Arbeit	
	i	2,5						x			10	5	5	Spit 9-2B			diese Arbeit	

¹ Zweiflüssigphasensystem

Tab. 5. Zusammensetzung des anaeroben Basismediums 204 und der Spurenelementlösung SL10 (Widdel *et al.*, 1983).

Basismedium 204		Spurenelementlösung SL10	
Substanz	Endkonzentration	Substanz	Endkonzentration [mg/l]
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,26 mM	FeCl ₂ x 4H ₂ O	1500
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,28 mM	ZnCl ₂	70
NH ₄ HCO ₃	5,30 mM	MnCl ₂ x 4H ₂ O	100
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,82 mM	H ₃ BO ₄	6
SL10	1 ml/l	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190
Vitaminlösung	1 ml/l	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2
Selenit/Wolframat-Lösung	16/14 µM	NiCl ₂ x 6H ₂ O	24
Resazurin	4 µM	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	36
Na/K-Phosphatpuffer	3,3 mM	Konz. HCl	10 ml/l
Na ₂ S	1 mM		
Ti-(III)-NTA	1 mM		
FeS	0,15 mM		
Hefeextrakt	0,05 g/l		

1,2,3-TrCB (Spit 8-10, Zweiflüssigphasensystem), um die Elektronenakzeptorkonzentration im Medium zu erhöhen. Die Anzahl der zugesetzten Elektronendonatoren wurde z.T. bis auf Wasserstoff reduziert, wobei gleichzeitig verschiedene Inhibitoren wie beispielsweise Van zugesetzt wurden. Der Einfluss von komplexen Zusätzen (z.B. fermentierter Hefeextrakt) im Anreicherungsprozess wurde näher untersucht. Das Kultivierungsschema der auf dem Spittelwassersediment basierenden Anreicherungskulturen ist in Tab. 4 zusammengefasst.

2.3 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.3.1 Anaerobes Medium für die Kultivierung von *Dehalococcoides* sp. Stamm DCMB5

Die Anzucht der anaeroben Mischkulturen erfolgte im Basismedium 204 (Tab. 5), wobei bei der Herstellung wie folgt vorgegangen wurde:

Zunächst wurde 1 l Aqua bidest (A. bidest, zweifach entionisiertes Wasser) auf 100 °C erhitzt und während des Abkühlens durch Begasung mit Aligal 12 anaerobisiert. Nach ca. 30 min wurden die Mineralsalze und 0,05 g/l Hefeextrakt zugesetzt. Nach Ergänzung des Mediums durch Resazurinlösung, Spurenelementlösung SL10 und Selenit/Wolframatlösung (siehe DSM-Medium 385) wurde der pH-Wert mit kristallinem NaHCO₃ auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurden die Serumflaschen mit Butylgummistopfen und Aluminiumschraubkappen verschlossen und der Gasraum weitere 10 min mit Aligal 12 begast. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf Raumtemperatur (Rt) wurden dem Medium Vitaminlösung (modifiziert nach Holliger *et al.*, 1993, Tab. 6), Na/K-Phosphatpuffer

Tab. 6. Zusammensetzung von Mineralsalz-, Spurenelemente- und Vitaminlösung (modifiziert nach Holliger *et al.*, 1993), die zur Kultivierung des *Dehalococcoides* Stammes CBDB1 verwendet wurden. Die Vitaminlösung wurde ebenfalls für die Kultivierung der Stamm DCMB5-haltigen Mischkulturen verwendet.

Mineralsalzlösung		Spurenelementelösung SL9		Vitaminlösung	
Substanz	Endkonzentration in g/l	Substanz	Endkonzentration in mg/l	Substanz	Endkonzentration in mg/l
KH ₂ PO ₄	10	Nitrilotriacetat (NTA)	12800	L-Liponsäure	5
NH ₄ Cl	13,5	FeCl ₂ x 4H ₂ O	2	D(+)-Biotin	2
NaCl	50	ZnCl ₂	70	Nicotinsäure	5
MgCl ₂ x 6H ₂ O	20,5	MnCl ₂ x 2H ₂ O	80	Ca-D(+)-Pantothenat	5
KCl	26	H ₃ BO ₃	6	Pyridoxinhydrochlorid	10
CaCl ₂ x 2H ₂ O	7,5	CoCl ₂ x 6H ₂ O	190	Thiaminchlorid-dihydrochlorid	5
		CuCl ₂ x 2H ₂ O	2	Folsäure	2
		NiCl ₂ x 6H ₂ O	24	Riboflavin	5
		Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	36	Cyanocobalamin	50
		NaOH ad pH 6,0		p-Aminobenzoesäure	5
				1,4-Naphthochinon	10

(autoklaviert; pH 7,0) und eine frisch zubereitete 400 mM Na₂S-Lösung zugegeben. Die Zugabe erfolgte aus filtersterilisierten (Celluloseacetat, 0,22 µM Porendurchmesser (Sartorius, Göttingen)) Stammlösungen mit sterilen Einwegspritzen und Kanülen. Als reduzierende Agenzien wurden Titan(III)-Nitrilotriacetat (NTA) und frisch hergestelltes FeS (hergestellt nach Mc Cue *et al.*, 1996) verwendet.

Zur Kultivierung wurde das Medium unter Aligal 12-Begasung auf sterile Kulturröhrchen verteilt. Nach dem Verschließen der Gefäße mit Teflonsepten und Aluminiumkappen wurde der Gasraum weitere 15 min mit Aligal 12 begast. Dabei wurde ein Überdruck von 0,2 bis 0,3 bar eingestellt. Abschließend wurde das Medium, je nach Ansatz, durch Zugabe folgender Substanzen steril vervollständigt:

- organische Säuren (Na-Pyruvat, Na-Formiat, Na-Fumarat (Endkonzentration: je 1,25 mM))
- Natriumacetat (Endkonzentration: 2,5 mM)
- Inhibitoren (BES (Endkonzentration: 5 mM), Van (Endkonzentration: 5 mg/l) bzw. Penicillin (Pen; Endkonzentration: 5 mg/l))
- Fermentierter Hefeextrakt (Endkonzentration: 10 µl/ml)
- Steriler Überstand aus *Dehalococcoides ethenogenes* oder Stamm DCMB5-haltigen Kulturen

Die Zugabe der Dioxine und Chlorbenzole erfolgte wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben.

Tab. 7. Bestandteile des Mediums zur Kultivierung des *Dehalococcoides* Stammes CBDB1.

Komponente	Endkonzentration
Mineralsalzlösung	20 ml/l
Spurenelementlösung SL9	10 ml/l
Vitaminlösung	10 ml/l
Na-Acetat	5 mM
Resazurin	1 µM
Na ₂ S	0,1 mM
NaHCO ₃	10 mM
Ti-(III)-citrat	2 mM

2.3.2 Anaerobes Medium für die Kultivierung von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1

Bei der Kultivierung von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 wurde ein Schwefel-limitiertes, synthetisches, Bicarbonat-gepuffertes Mineralmedium verwendet (Adrian *et al.*, 1998). Bei der Herstellung des Mediums (Tab. 6, Tab. 7) wurde wie folgt verfahren:

Zunächst wurde 1 l A. dest (destilliertes Wasser) auf 100 °C erhitzt und während des Abkühlens durch Begasung mit Aligal 12 anaerobisiert. Nach ca. 30 min wurden dem Wasser Mineralsalzlösung, Spurenelementlösung SL9 (Tab. 6), Natriumacetat und Resazurin (Tab. 7) zugesetzt. Nachfolgend wurde die Serumflasche mit Butylgummistopfen und Aluminiumschraubkappe verschlossen und der Gasraum für weitere 10 min mit Aligal 12 begast. Anschließend wurde die Na₂S-Lösung zugegeben (Tab. 7), die Lösung autoklaviert und im Anschluss unter Aligal 12-Begasung auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde das Medium unter anaeroben Bedingungen mit Vitaminlösung und Natriumhydrogencarbonat vervollständigt (Tab. 7).

Zur Kultivierung wurde das Medium auf Aligal 12-begaste Kulturröhrchen verteilt. Nach dem Verschließen der Gefäße mit Teflonsepten und Aluminiumkappen wurde der Gasraum weitere 15 min mit Aligal 12 begast und das Medium nachfolgend mit Ti(III)-citrat reduziert. In den Kulturgefäßen wurde mit Aligal 12 ein Überdruck von 0,2 bis 0,3 bar erzeugt. Als Elektronendonator diente Wasserstoff. Die Zugabe erfolgte durch Begasung mit einem Druck von ca. 0,5 bar für wenige Sekunden.

2.3.3 Herstellung von Ti(III)-citrat- bzw. Ti(III)-NTA-Lösung

Zur Herstellung der Ti(III)-citrat-Lösung wurden 5,14 ml einer 15 %igen Ti(III)-chlorid-Lösung und 10 ml einer anoxischen 1 M Natriumcitrat-Lösung miteinander gemischt. Anschließend wurde der pH-Wert mit kristallinem Na₂CO₃ auf 7,0 eingestellt und die Lösung

auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt. Die Herstellung erfolgte unter konstanter Begasung mit Aligal 12. Die Endkonzentration an Ti(III)-Ionen in der Lösung betrug 0,3 M.

Bei der Herstellung von Ti(III)-NTA wurde anstelle der 1 M Natriumcitratlösung eine 1 M Natrium-NTA-Lösung verwendet.

2.3.4 Herstellung von fermentiertem Hefeextrakt

Die Herstellung des fermentierten Hefeextrakts erfolgte nach Holliger *et al.* (1993). Dazu wurde anaerobisiertes Basismedium 204 mit 4 % Hefeextrakt versetzt und 10%ig mit Saalesediment inokuliert. Die Kultivierung erfolgte in verschlossenen Serumflaschen bei 37 °C für 6 Wochen. Nach dieser Zeit wurden die Zellen abzentrifugiert (20 min, 2800 x g) und der Überstand (fermentierter Hefeextrakt) sterilfiltriert.

2.3.5 Zugabe der chlorierten Verbindungen

2.3.5.1 Zugabe der Dioxine

Die Dioxine wurden in einer Konzentration von 300 µM in Aceton gelöst. Aus den Dioxin-Aceton-Stammlösungen wurde das erforderliche Volumen für die gewünschte Endkonzentration von 25 bis 40 µM mit autoklavierten Glasspritzen unter der Laminarbox entnommen und in die Kulturgefäße überführt. Nach dem Verschließen der Kulturgefäße wurde das Aceton unter steriler Aligal 12-Begasung (Sterilfilter, SRP25 (Sartorius), Porendurchmesser 0,2 µm) unter dem Abzug abgedampft. Zum Befüllen wurden die Gefäße geöffnet und das Nährmedium unter Aligal 12-Begasung eingefüllt.

2.3.5.2 Zugabe der Chlorbenzole aus einer Acetonstammlösung

Die Zugabe der Chlorbenzole erfolgte über sterile Glasspritzen aus Acetonstammlösungen (Endkonzentration im Medium: 40 bis 60 µM). Zur Herstellung der Stammlösungen wurden jeweils 1 g TrCB in 1 g Aceton gelöst.

2.3.5.3 Zugabe der Chlorbenzole über eine Hexadekanlösung (Zweiflüssigphasenkulturen)

Die Zweiflüssigphasenkulturen wurden nach Holliger *et al.* (1992) erstellt. Zur Herstellung einer sterilen Trichlorbenzol-Hexadekan-Stammlösung wurde das Hexadekan zunächst unter Stickstoffbegasung anaerobisiert. Nach dem Autoklavieren erfolgte der Zusatz der Trichlorbenzole (Endkonzentration: 200 mM) unter der Laminarbox bei gleichzeitiger steriler Begasung. Abschließend wurden 2,5 ml der in Hexadekan gelösten Trichlorbenzole mittels steriler Glasspritzen zu 50 ml Medium gegeben (nominale Konzentration der Trichlorbenzole im Medium: 10 mM).

2.3.6 Kultivierung von *Dehalococcoides* sp.

Die Kultivierung von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 erfolgte während der Transkriptionsexperimente in 60 ml-Kulturgefäßen mit einem Kulturvolumen von 50 ml. Die Zweiflüssigphasenkulturen wurden in einem Kulturvolumen von 50 ml in 110 ml-Kulturgefäßen angezogen. Das Inokulum betrug 10 % des Kulturvolumens und wurde mit sterilen Einwegspritzen unter Aufwendung eines geringen Drucks direkt ins Medium überführt. Die Inkubation erfolgt bei 28 bis 30 °C schüttelnd (130 Upm; Infors, Basel).

Die den Stamm DCMB5 enthaltenden Mischkulturen wurden im Zweiflüssigphasensystem mit Chlorbenzolen in einem Kulturvolumen von 50 ml in 60 ml- oder 110 ml-Kulturgefäßen bei 30 °C ohne Schütteln inkubiert. Das Inokulum betrug 5 % des Kulturvolumens.

Die Anzucht auf Dioxinen erfolgte sowohl für Stamm CBDB1 als auch für die Stamm DCMB5 enthaltenden Mischkulturen entweder in einem Volumen von 3 ml in 20 ml-Headspace-Vials (Supelco, Bellefonte, USA) oder in einem Volumen von 50 ml in 110 ml-Kulturgefäßen. Die 3 ml-Kulturen dienen der Dioxinanalytik (Kap. 2.4.2.1, 2.4.2.2, 2.4.2.3), während die 50 ml-Kulturen zur DNA/RNA Extraktion (Kap. 2.5.2, 2.5.3) genutzt wurden.

2.3.7 Medium zur Kultivierung von *E. coli*

Zur Anzucht von *E. coli* XL1-Blue_MRF' wurden Nährbouillon I (NB, Immunopräparate, Berlin) oder Nähragar II (NA, Immunopräparate, Berlin) verwendet. Das Antibiotikum Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 125 µg/ml nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Zur Identifizierung positiver Klone mittels Blau-Weiß-Selektion wurden dem

Nähragar neben Ampicillin zusätzlich X-Gal (Endkonzentration: 80 µg/ml) und IPTG (Endkonzentration: 0,5 mM) zugesetzt.

Die Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL erfolgte zusätzlich in Luria-Broth (LB)-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl; pH 7,0) oder LB-Agar (LB-Medium, 1,5 % Agar), denen die Antibiotika Ampicillin (Amp, Endkonzentration: 100 µg/ml) und Chloramphenicol (Cm, Endkonzentration: 30 µg/ml) zugesetzt wurden.

2.3.8 Kultivierung von *E. coli*

E. coli XL1-Blue_MRF' wurde zur Plasmidisolierung in 3 ml-Flüssigkulturen (Kap. 2.3.7) angezogen. Beimpft wurde mit Einzelkolonien oder direkt aus der Glycerinkultur. Die Kulturen wurden über Nacht oder für mindestens 8 h bei 37 °C und 125 U•min⁻¹ inkubiert. Die Anzucht auf Nähragar-Platten erfolgte bei 37 °C.

E. coli BL21(DE3)-CodonPlus-RIL wurde in 20 ml- oder 200 ml-Flüssigkulturen (Kap. 2.3.7) bei 37 °C schüttelnd (125 U•min⁻¹) inkubiert. Die Kultivierung auf LB-Agar-Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Eine kurzfristige Lagerung von *E. coli*-Kulturen oder -Agarplatten erfolgte bei 4 °C. Eine langfristige Lagerung erfolgte bei -80 °C in Nährbouillon I mit 20 % Glycerin.

2.4. Analytik

2.4.1 Aufarbeitung der Kulturen zur Analyse der chlorierten Dioxine und Benzole

Die Dioxine wurden mit *n*-Hexan extrahiert, wobei die 3 ml Kulturen komplett aufgearbeitet wurden. Dazu wurden die Kulturen mit je 2 ml *n*-Hexan versetzt und 12 h bei 30 °C geschüttelt (200 U•min⁻¹). Nachfolgend wurde das *n*-Hexan abgenommen und die Extraktion mit frischem *n*-Hexan zweimal wiederholt. Die gesammelten Hexanphasen wurden mit 50 µl eines internen Standards (Surrogat-Standard: 78 µg 5,6-DBrACN/ml 2,2,4,4,6,8,8-HMN) versetzt und im Stickstoffstrom, auf Eis und unter dem Abzug bis auf die HMN-Phase eingengt. Die Proben wurden mit 200 µl *n*-Hexan verdünnt und in 1,5 ml-GC-Röhrchen mit 250 µl Einsatz überführt.

Zur Analyse der Chlorbenzole wurden 0,5 ml-Proben aus den Kulturen mit 1 ml *n*-Hexan durch Schütteln (120 U•min⁻¹) bei 28 °C für 15 min extrahiert. Anschließend wurden 100 µl des Extrakts in 1,5 ml-GC-Röhrchen mit 150 µl Einsatz überführt und mit 25 µl des internen

Standards 1,3,5-TrBB (Stammlösung: 2,5 mM in *n*-Hexan) in einer Endkonzentration von 0,5 mM versetzt.

2.4.2 Gaschromatographie (GC)

Die Analytik der Dioxine wurde an dem Gaschromatographen GC14A (Shimadzu Europe, Duisburg) durchgeführt. Der Gaschromatograph war mit dem Autoinjector AOC20i und dem Autosampler AOC20s (Shimadzu Europe, Duisburg) gekoppelt. Die Steuerung des GC und die Auswertung der Analysen erfolgten mit Hilfe der Software CLASS-VP 4.2 (Shimadzu Europe).

2.4.2.1 Dioxindetektion mit Flammenionisationsdetektor (FID)

Mittels FID wurden das Monochlordibenzo-*p*-dioxin und die dichlorierten Dioxine analysiert. Die Auftrennung der Kongenere (Probenvolumen 4 µl) erfolgte auf einer DB608 Megabore-Kapillarsäule (30 m x 0,331 mm i.d., Filmdicke: 0,5 µm; J&W Scientific, Folsom, USA) mit Helium 5.0 als Trägergas (linearer Fluß: 0,3 m/s, Säulendruck 35 psi), Stickstoff 5.0 als „Make up“-Gas, Wasserstoff 5.0 und Druckluft als Brennergase der Wasserstoffflamme und einem Splitverhältnis des Injektors von 1:10. Die Injektor- und Detektortemperaturen lagen bei 250 bzw. 280 °C. Das Ofenprogramm lief wie folgt ab:

Rate in °C/min	Temperatur [°C]	Verweilzeit [min]
	170	3
1	175	0
5	290	5

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer kombinierten 9-Stufen-Kalibrierung im Bereich von 0,39 µM bis 100 µM je Kongener über die Peakfläche (Wagner, 2004). Die sich bei Anwendung des oben aufgeführten Ofenprogramms ergebenden Retentionszeiten sind nachfolgend aufgeführt:

Substanz	Retentionszeit [min]
DBD	9,01
2-MCDD	13,47
1-MCDD	14,24
1,3-DCDD	17,19
2,3-DCDD	17,98
5,6-DBrACN	26,43

2.4.2.2 Dioxindetektion mittels Elektroneneinfangdetektor (ECD)

Die Analyse der trichlorierten Dioxine am GC/ECD erfolgte mit Split/Splitlos-Injektor und ^{63}Ni -Elektroneneinfangdetektor. Die gaschromatographische Trennung der Kongenere (Probenvolumen 0,5 μl) wurde auf einer DB5-Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm i.d., Filmdicke 0,25 μm) unter Nutzung von Helium 5.0 als Trägergas (linearer Fluß; 0,298 m/s; Säulendruck 35 psi), Stickstoff 5.0 als „Make up“-Gas und einem Splitverhältnis von 1:50 durchgeführt. Die Injektor- und Detektortemperaturen lagen bei 290 bzw. 340 °C. Das Ofenprogramm wurde wie folgt gewählt:

Rate in °C/min	Temperatur [°C]	Verweilzeit [min]
	150	5
3	170	1
0,5	175	2
5	222	0
30	250	0
40	290	10

Die Kongenere wurden im Vergleich der Retentionszeiten mit der des internen Standards (5,6-DiBrACN) identifiziert und unter Verwendung einer kombinierten 9-Stufen-Kalibrierung im Bereich von 0,195 μM bis 200 μM über die Peakhöhe quantifiziert. Nachfolgend sind die analysierten Substanzen und deren Retentionszeiten aufgelistet:

Substanz	Retentionszeit [min]
1,2,4-TrCDD	29,93
1,2,3-TrCDD	31,25
5,6-DiBrACN	33,40

2.4.2.3 Dioxindetektion mit Festphasenmikroextraktion (SPME)

Das flüchtige Dioxinkongener 2-MCDD wurde zusätzlich mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) aus dem „Headspace“ der 3 ml-Kulturen in den Headspace-Vials analysiert. Die Proben wurden zunächst 2 h bei 80 °C äquilibriert. Zur Sorption der Dioxine wurde die Faser (100 μm , Polydimethylsiloxan; Supelco) in die Gasphase der Headspace-Vials gebracht und 35 min bei 80 °C dort belassen. Die Desorption erfolgte im Injektor des GC bei einer Injektortemperatur von 260 °C über einen Zeitraum von 195 s. Daran schloss sich die splitlose Injektion (0,7 min) an. Als Detektor wurde der FID bei einer Temperatur von 300 °C genutzt. Die Auftrennung erfolgte auf einer DB608-Megabore-Kapillarsäule (Kapitel 2.4.2.1)

mit Helium 5.0 als Trägergas (linearer Fluß: 0,3 m/s, Säulendruck 35 psi), Stickstoff 5.0 als „Make up“-Gas, Wasserstoff 5.0 und Druckluft als Brennergase der Wasserstoffflamme. Das Ofenprogramm war wie folgt vorgegeben:

Rate in °C/min	Temperatur [°C]	Verweilzeit [min]
	170	3
1	175	0
5	290	5

Für die Quantifizierung der Kongenere wurde eine 6-Stufen-Kalibrierung verwendet (Bunge, 2004). Dazu wurden die Dioxine in einem Konzentrationsbereich von 0,78 bis 25 µM in Minimalmedium gegeben und aus dem Gasraum beprobt.

Die Retentionszeiten der verwendeten Dioxine, die sich bei dem angewendeten Ofenprogramm ergaben, finden sich in der folgenden Übersicht:

Substanz	Retentionszeit [min]
DBD	9,05
2-MCDD	13,54
1-MCDD	14,31
1,3-DCDD	17,38
2,3-DCDD	18,08

2.4.2.4 Detektion der Chlorbenzole mit FID

Die gaschromatographische Trennung der Chlorbenzole erfolgte auf einer DB608-Megabore-Kapillarsäule (Kapitel 2.4.2.1) mit Helium 5.0 als Trägergas (linearer Fluß: 0,3 m/s, Säulendruck 35 psi), Stickstoff 5.0 als „Make up“-Gas, Wasserstoff 5.0 und Druckluft als Brennergase. Die Injektor- und Detektortemperaturen lagen bei 250 °C bzw. 280 °C. Es wurde ein Probenvolumen von 4 µl mit einem Split von 1:10 injiziert. Das Ofenprogramm lief wie folgt ab:

Rate in °C/min	Temperatur [°C]	Verweilzeit [min]
	40	1,1
40	70	1,9
20	140	1,2
40	160	1,2
25	220	0,5
40	280	5,0

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer zehnstufigen Kalibrierung über die Peakfläche im Bereich von 0,7 μM bis 363 μM je Kongener. Die sich bei Anwendung des oben aufgeführten Ofenprogramms ergebenden Retentionszeiten sind nachfolgend aufgeführt:

Substanz	Retentionszeit [min]
1,3-Dichlorbenzol (DCB)	6,2
1,4-DCB	6,4
1,2-DCB	6,98
1,2,3-TrCB	9,1
1,2,4-TrCB	8,42
1,3,5-TrBB	11,64

2.4.3 Bestimmung der Chloridkonzentration

Die Bestimmung der Chloridkonzentration erfolgte mittels coulometrischer Titration am Chlor-o-counter Mark II (Flohr Instrumenten, Nieuwegen, Niederlande).

Zur Messung wurde am Gerät ein Probenvolumen von 100 μl eingestellt. Anschließend wurden die in der Messlösung (20 ml Basislösung A gemischt mit 1 ml Gelatinelösung (Gieseler, 2001)) enthaltenen Chloridionen titriert. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung der Chloridionen in zentrifugiertem Kulturüberstand (je 400 μl) durchgeführt. Um die erhaltenen *counts* in mM umrechnen zu können, wurde im Bereich von 0,1 bis 10 mM eine Kalibrierkurve mit NaCl, gelöst in A. bidest, erstellt. Die Kalibrierung erfolgte, wie bei Fischer (2007) beschrieben, mit einem Probenvolumen von 400 μl .

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Durchführung der Transkriptionsexperimente

Zur Erzielung hoher Zellzahlen wurde *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 im Vorfeld aller Transkriptionsexperimente im Zweiflüssigphasensystem (Kap. 2.3.5.3) kultiviert.

Im Rahmen der Transkriptionsanalysen mit Trichlorbenzolen erfolgte eine 10%ige Inokulierung in komplettiertes Medium (Kap. 2.3.2) ohne Chlorbenzole. Nach einer 72-stündigen Hungerphase ohne chloriertes Substrat wurden die Transkriptionsversuche mit Zugabe von 40 bis 60 μM 1,2,4- oder 1,2,3-TrCB gestartet. In den Kontrollkulturen ohne chlorierten Elektronenakzeptor wurde Aceton in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben, da dieses als Lösungsmittel der chlorierten Benzole verwendet wurde. In den Transkriptionsexperimenten mit Dichlor-*p*-dibenzodioxinen wurde der Versuch mit dem

Beimpfen (10%ig) des komplettierten Mediums, das bereits das entsprechende Dioxin-Kongener enthielt, gestartet. Aufgrund der Art der Dioxinzugabe (Kap. 2.3.5.1) war eine 72 stündige Inkubation ohne chlorierten Elektronenakzeptor nicht möglich. Als Kontrollen dienten Kulturen, denen kein halogeniertes Substrat zugegeben wurde.

Eine Beprobung der Kulturen erfolgte stets zu Beginn des Versuches (0 h), nach 24 h, 48 h, 72 h und 168 h. Zu jedem dieser Zeitpunkte wurden 1 ml Probe für die DNA-Isolierung (Kap. 2.5.2), 0,5 ml für die Chlorbenzolanalytik (Kap. 2.4.1, 2.4.2.4) und 45 ml für die RNA-Präparation (Kap. 2.5.3) entnommen. Die Dioxindechlorierung wurde in separaten 3 ml-Kulturen verfolgt (Kap. 2.4.1, 2.4.2.1, 2.4.2.3). Eine Analyse der Transkription erfolgte nach DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA (Kap. 2.5.3.2), dem Umschreiben in cDNA (Kap. 2.5.4) mittels terminalem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (t-RFLP, Kap. 2.5.14) nach Amplifikation der *rdhA*-Transkripte (Kap. 2.5.7.2) und quantitativer PCR (qPCR, Kap. 2.5.15).

2.5.2 Zellaufschluss und DNA-Isolierung aus den anaeroben Kulturen

2.5.2.1 Zellernte zur Präparation von DNA

Bei der Zellernte wurde 1 ml Probe aus den *Dehalococcoides* sp. Kulturen entnommen und 30 min bei 10206 x g und 7 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl A. bidest gewaschen (Zentrifugation: 15 min, 10206 x g, 7 °C). Der Überstand wurde entfernt.

2.5.2.2 Kugelmühlenaufschluss

Bei der Verwendung dieser Methode wurde das Pellet in 300 µl A. bidest aufgenommen und mit 300 µl 2 x TENS-Puffer (50 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethansäure (Tris)-HCl, pH 8,0; 20 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); 100 mM NaCl; 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)) gemischt. Die gesamten 600 µl wurden auf 1,2 g autoklavierte Glaskugeln (Durchmesser 0,25 bis 0,5 mm) in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben. Die Zellen wurden 15 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Kugelmühle (Retsch, Haan) aufgeschlossen. Nach kurzer Wartezeit (ca. 5 min) wurde der Ansatz zentrifugiert (2 min, 8518 x g und Raumtemperatur). Zur weiteren Präparation wurden 200 µl des Überstandes abgenommen.

2.5.2.3 Ethanolfällung der DNA

Nach dem Aufschluss der Zellen wurde die DNA gefällt. Dazu wurden dem Ansatz 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und das 2,5 fache Volumen an 99%igem Ethanol zugegeben. Nach Zentrifugation (20 min, 10206 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen (10 min, 10206 x g, 4 °C). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in der SpeedVac SVC 100 (Savant, Minnesota, USA) getrocknet. Die DNA wurde in 40 µl A. bidest aufgenommen und über Nacht schüttelnd bei 4 °C inkubiert (120 U•min⁻¹). Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.5.3 Zellaufschluss und Isolierung der Gesamt-RNA

Alle im Verlauf von RNA-Arbeiten verwendeten Lösungen wurden zur Inhibierung der RNasen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) in einer Endkonzentration von 0,1 % versetzt. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Lösungen autoklaviert. Die verwendeten Reaktionsgefäße wurden doppelt autoklaviert.

2.5.3.1 Zellernte zur Präparation von Gesamt-RNA

Bei der Zellernte wurden 45 ml der Kulturen in sterilen 50 ml-Greiner Röhrchen (Greiner Bio-one, Essen) geerntet (3500 x g, 45 min, 4 °C). Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde im verbliebenen Überstand gelöst und in 1,7 ml-Schraubdeckelröhrchen (Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA) überführt. Nach Zentrifugation (5000 x g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand bis auf 100 µl abgenommen und verworfen.

2.5.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das „*Total RNA-Kit*“ (A&A Biotechnology, Gdynia, Polen) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Zur Verfolgung von RNA-Verlusten während der RNA-Präparation oder der cDNA Synthese wurde dem Zellpellet zu Beginn 1 µl Coleoptera Luziferase mRNA (9,9•10⁸ Kopien/µl) als interner Standard zugesetzt. Die Wiederfindungsraten der Luziferase mRNA lagen meist in einem Bereich von 5 bis 50 %.

DNA-Kontaminationen wurden durch die Anwendung des DNaseI-Kits (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben entfernt. Der Ansatz wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C. Zur Überprüfung des DNaseI-Verdau wurde eine Amplifikation der 16S rDNA mit den Primern fD1/796r (Tab. 8) durchgeführt (Kap. 2.5.7.1).

2.5.4 Reverse Transkription (RT)

Im Rahmen eines jeden Experiments wurden jeweils gleiche Mengen an RNA im Bereich von 0,1 bis 1µg in die reverse Transkription eingesetzt. Die cDNA Synthese erfolgte mit *random hexamer*-Primern und dem „*RevertAidTM Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*“ (Fermentas) nach Herstellerangaben. Zur Überprüfung der reversen Transkription wurde eine Amplifikation der 16S rRNA cDNA mit den Primern fD1/796r (Tab. 8) durchgeführt (Kap. 2.5.7.1).

2.5.5 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch *primer extension*

Die Transkriptionsstartpunkte der *rdhA* Gene *cbrA*, *cbdbA1624* und *cbdbA1453* wurden mittels *primer extension* identifiziert. In einem Volumen von 20 µl wurden 0,5 bis 1 µg RNA (isoliert aus Zellen, die mit 1,2,4-TrCB inkubiert worden waren) mit 1 µM der 6-Carboxyfluorescein (FAM)-markierten Primer FAM-PE-84, FAM-PE-1624 und FAM-PE-1453 (Tab. 8) inkubiert. Die reverse Transkription wurde mit dem „*RevertAidTM Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde das Protokoll zur Synthese des Primärstranges mit einem spezifischen Primer angewendet. Das *primer extension* Produkt wurde mit Ethanol gefällt. Dazu wurde der Ansatz mit 1/10 Volumen an 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und dem 2,5 fachen Volumen von 99%igem Ethanol gemischt und zentrifugiert (20 min, 8518 x g, Raumtemperatur). Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen (8518 x g, 10 min, Raumtemperatur) und nach Entfernung des Überstandes maximal 5 min in der SpeedVac SVC 100 getrocknet. Die *primer extension* Produkte wurden mit Hilfe eines Genetic Analyser 3100 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Die Größenzuordnung erfolgte über einen internen Standard (ROX Genescan 500 (-250), PE Applied Biosystems) mit Hilfe der Genemapper 3.7 Software (PE Applied Biosystems).

2.5.6 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt (Gene Quant, Pharmacia, Freiburg). Zusätzlich wurde die Reinheit der DNA durch Berechnung des Quotienten $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$, ermittelt. Da ein Bestandteil der anaeroben Medien (Ti(III)-Ionen) die photometrischen Messungen beeinflusste, wurde die RNA-Konzentration zusätzlich anhand der Stärke der 16S bzw. 23S rRNA Banden in den RNA-Gelen im Vergleich zum Marker abgeschätzt.

Tab. 8. In der Arbeit verwendete Primer. Grau unterlegt sind Linker-Regionen, die in einigen Fällen zwischen die spezifische Primersequenz und die 6-FAM-Markierung eingefügt werden mussten, um ein PCR-Produkt amplifizieren zu können. Die 6-FAM markierten Primer dienten als *forward* Primer zur Amplifikation der PCR-Produkte für spätere t-RFLP Analysen (Kap. 2.5.14).

Primer	Sequenz 5'→3'	Zielgen/Charakteristika	Größe des PCR Produkts
Amplifikation von <i>rdhA</i> Genen (Hölscher <i>et al.</i>, 2004) mit spezifischen Primern			
rdhA1f	TTGCTACCATGTACAGGT	<i>cbdbA1560</i>	304 bp
rdhA1r	GGCATAACCGATAAACAT		
rdhA2f	ACCATAGAGGTAGACTTC	<i>cbdbA1638</i>	587 bp
rdhA2r	CCAGAGCTCATTGACCC		
rdhA3f	GTGAAATACCGGGAGGCG	<i>cbdbA1455</i>	569 bp
rdhA3r	CTGTTTATTGGACGGCAG		
rdhA4f	GGAAGGTGCAAAGCGTAG	<i>cbdbA1618</i>	437 bp
rdhA4r	CGGAACATCTCTTTGTTT		
rdhA5f	TTGGCAGGTGCCGGTATA	<i>cbdbA1627</i>	674 bp
rdhA5r	GTTGGGGATAATAAAGTG		
rdhA6f	GGGGCAGGGCTGGGTGTG	<i>cbdbA1542</i>	807 bp
rdhA6r	TTGGTACCCCAAATCTGC		
rdhA7f	AGGAGTTGGGGCATTGTT	<i>cbdbA1563</i>	1087 bp
rdhA7r	ATTCATACCGTCACAATG		
rdhA8f	AGGTCACATCTTCGGCAA	<i>cbdbA1453</i>	124 bp
rdhA8r	AGTGGGTCTGGGTAAAGT		
rdhA9f	GCTACGTCTTCAACCCTT	<i>cbdbA1624</i>	77 bp
rdhA9r	ACTTTTGACCAGTCTATA		
rdhA10f	CCAACCCTGTCCGGCTCAGG	<i>cbdbA1595</i>	159 bp
rdhA10r	TGTCCGGTTGTCTCCCAG		
rdhA11f	AATAATGGCAACCGGAGG	<i>cbdbA1535</i>	934 bp
rdhA11r	AGGTTTTGTCCATGCTTC		
rdhA12f	TTGGTCTTACAGGGGTAA	<i>cbdbA1575</i>	738 bp
rdhA12r	AACCCGTCACATGAAATA		
rdhA13f	CATTTACACGACCAAGGT	<i>cbdbA1546</i>	265 bp
rdhA13r	CCTACTAAACTGAAAACCT		
rdhA14f	CAGGGAATTCGGGGATAT	<i>cbdbA1578</i>	146 bp
rdhA14r	CGCTTTCCATACCCTGCA		
rdhA15f	CTGTTTGGGGCTGAGGAC	<i>cbdbA1495</i>	304 bp
rdhA15r	TGTAACCCAGGCCTCTGG		
rdhA16f	AAGAGAACTACAAAACCG	<i>cbdbA1550</i>	212 bp
rdhA16r	GTATGGCATACTCGTCGC		

Fortsetzung Tab.8

Primer	Sequenz 5'→3'	Zielgen/Charakteristika	Größe des PCR Produkts
FAM-markierte <i>rdhA</i>-PCR-Produkte mit einer Größe zwischen 350 und 650 bp für t-RFLP Analysen			
cluster 1a_f	FAM-GTWTTYCAYGAYKTGGATGA	<i>cbdbA1453, cbdbA1624, cbdbA1550, cbdbA1570,</i>	~510 bp
cluster 1a_r	TCSGGHGTRCCYTSCCA	<i>cbdbA1595</i>	
cluster 1b_f	FAM-GAWTTYATGAARGGYTTGGG	<i>cbdbA1495, cbdbA1508</i>	~640 bp
cluster 1b_r	TTATRTCKTCRTCAAMTWYTA		
cluster 1c_f	FAM-GYGGYACCAARTRKCAGGG	<i>cbdbA1588, cbdbA96,</i>	~600 bp
cluster 1c_r	TCVGCACARATACCGCAGG	<i>cbdbA1535, cbdbA1582</i>	
cluster 1d_f	FAM-TTYCRTGAYYTRGATGAA	<i>cbdbA1578, cbdbA1546,</i>	~650 bp
cluster 1d_r	ATBACRTAYTTDTGMGAAG	<i>cbdbA1575</i>	
cluster 2a_f	FAM-GTYTTTCMAKGAYHTKGACGA		
cluster 2a-1_r	TCRATTTMTYAGGYAKCAC	<i>cbdbA84, cbdbA1563</i>	~570 bp
cluster 2a-2_r	TGTATTTTTTCGTTGTTGGAG	<i>cbdbA1638</i>	~530 bp
cluster 2a-3_r	GTWAYCASCCARMGRGSTTT	<i>cbdbA1560, cbdbA1627</i>	~650 bp
cluster 2b_f	FAM-GATTTTMMABGAYBTDGATGA		
cluster 2b-1_r	CGYAWCATTCCGGSTRTTTT	<i>cbdbA1542, cbdbA1491</i>	~400 bp
cluster 2b-2_r	CTKSTCYACATCTTCAA	<i>cbdbA238, cbdbA1455</i>	~580 bp
cluster 2b-3_r	ACWTTAKCAGGGAACKACCA	<i>cbdbA1598, cbdbA1618</i>	~570 bp
cluster 3_f	FAM-GARGGTACHCCWGAABAMAA	<i>cbdbA88, cbdbA80, cbdbA243</i>	~480 bp
cluster 3_r	CCRAAATYRAYBGGWTTA		
cluster 4_f ¹	FAM-GTTGAYAWRCCXRTWGATTTT		
cluster 4a_r ¹	CATKRCCCAGWRCCACCATT	<i>cbdbA1503, cbdbA1092</i>	~450 bp
cluster 4b_r ¹	TMCCMAMWATACCTAAAA	<i>cbdbA187, cbdbA1539</i>	~360 bp
RFLP und t-RFLP Analysen mit <i>rdhA</i>-PCR-Produkten bis zu einer Länge von 1650 bp			
RRF2 ^{2,3}	SHM GBM GWG ATT TYA TGA ARR	Generelle <i>rdhA</i> Primer	~1650 bp
BIR ³	CHA DHA GCC AYT CRT ACC A		
cl-1a-f	TTYCRYGAYXTRGATGA	<i>cbdbA1453, cbdbA1624,</i>	~1100 bp
FAM-cl-1a-f	FAM-GTTTTTYCRYGAYXTRGATGA	<i>cbdbA1595, cbdbA1578,</i>	
cl-1a-r	TCMGCRCARHTWCCGCA	<i>cbdbA1546</i>	
cbdbA1535-f ²	GTTTTCCATGACATAGATGA	<i>cbdbA1535</i>	~1100 bp
cbdbA1535-r	TCCGCACAAATACCGCA		
cbdbA1575-f ²	CAATTTTCGTGATCTGGATGA	<i>cbdbA1575</i>	~1100 bp
cbdbA1575-r	TCAGCACAGATACCGCA		
cluster 1b_f ⁴	Siehe oben	<i>cbdbA1495, cbdbA1508</i>	~1300 bp
cl-1b-r	ATGGGGCAGTGGGGGC		
cl-1c-f	TDTTYCRTGAYBTKGATGAA	<i>cbdbA1550, cbdbA1570,</i>	~1100 bp
FAM-cl-1c-f	FAM- CGG TDTTYCRTGAYBTKGATGAA	<i>cbdbA1588, cbdbA96,</i>	
cl-1c-r	TCDGCACARATACCGCAGG	<i>cbdbA1582</i>	
cluster 2a_f ⁴	Siehe oben	<i>cbdbA1560, cbdbA1638,</i>	~1550 bp
cl-2a-r	AWHABCCAYTCRWACCAG	<i>cbdbA1627, cbdbA84,</i>	
		<i>cbdbA1563</i>	
cluster 2b_f	Siehe oben		~1250 bp
cl-2b-f	TTTMABGAYBTDGATGA		
cl-2b-r	TCTGCHTKCCAMARGAA	<i>cbdbA1491, cbdbA1455,</i>	
		<i>cbdbA1598, cbdbA1618</i>	
cbdbA1542-r	TCTGCTTTCCAAAGGAA	<i>cbdbA1542</i>	
cbdbA238-r	TCTGCATTCCAAAGGAA	<i>cbdbA238</i>	
cluster 3_f ⁴	Siehe oben		~1100 bp
cl-3-r	ATRMMAAKVADCCATTCATA	<i>cbdbA88, cbdbA80</i>	
cbdbA243-r	ATGAAAAGCAACCATTCATA	<i>cbdbA243</i>	
cl-5a-f	ARGGWACBCCWGGRGAVAA	<i>tceA_{FL2}, tceA₁₉₅, vcrA, bvcA,</i>	~1100 bp
cl-5a-r	GGGTATAGGTAATAAACCA	<i>FL2 <i>rdhA7</i></i>	

Fortsetzung Tab. 8

Primer	Sequenz 5'→3'	Zielgen/Charakteristika	Größe des PCR Produkts
Quantitative PCR			
DET-539f	AGG AAG CAA GCG TTA TCC	16S rRNA Gene von <i>Dehalococcoides</i> Stämmen der Pinella Gruppe	209 bp
DET-731r	GAC AAC CTA GAA AAC CGC		
Eub341 f ⁵	CCTACGGGAGGCAGCAG	16S rRNA Gen von <i>Bacteria</i> - Vertretern	169 bp
Eub534 r ⁵	ATTACCGCGGCTGCTGG		
cbdbA1588_f	CTGAAAGGAATAGGTCTGG	<i>cbdbA1588</i>	216 bp
cbdbA1588_r	GTAGACTGGGATCCATGC		
cbdbA84_f	CTTATATCCTCAAAGCCTGA	<i>cbdbA84</i>	201 bp
cbdbA84_r	TGTTGTTGGCAACTGCTTC		
cbdbA1453_f	AATCTCTCGAGGGCACTC	<i>cbdbA1453</i>	167 bp
cbdbA1453_r	CCAGAGGGCTGGTAAGGT		
cbdbA1624_f	CAGTCACTCGAAGCTACCA	<i>cbdbA1624</i>	171 bp
cbdbA1624_r	CTGCTAAAGGATTAGCCAAAA		
cbdbA187_f	CCAGTGAAGTTGATACCGTA	<i>cbdbA187</i>	194 bp
cbdbA187_r	CCAGCTTAACCAAGAACGG		
cbdbA1618_f	AGACTGAATAGACCAACGCA	<i>cbdbA1618</i>	205 bp
cbdbA1618_r	CGGTATAGCCAGTTCTCTAT		
cbdbA243_f	ACGCTCGCGAATTGCATC	<i>cbdbA243</i>	234 bp
cbdbA243_r	GCACTCTTGAGCATAAGG		
cbdbA80_f	ATTGGGGTTGGGCATCGC	<i>cbdbA80</i>	197 bp
cbdbA80_r	CAACTTCAAGGCCGAGCG		
cbdbA88_f	ATGTAGCCATACGGCACC	<i>cbdbA88</i>	244 bp
cbdbA88_r	GCCATGCGGATAAAGGGCA		
cbdbA1563_f	CCTCAAGTTGCGTATGCC	<i>cbdbA1563</i>	219 bp
cbdbA1563_r	TGGGCTGCCCATGCCATA		
Luci_f	TTCCAGGGATACGACAAGG	Luziferase	200 bp
Luci_r	CGGACATAATCATAGGTCCT		
rpoA_f	ACCCTTGATTCAGATGATGC	<i>cbdbA466</i>	151 bp
rpoA_r	GTGGTAAAGTTCACCTTGCG		
rpoB_f	ATCCAGTCCAGTATTGACCG	<i>cbdbA586</i>	180 bp
rpoB_r	TAACCTTGTAACGGCCTACC		
EF-Tu_f	GTCATTCTGGTAGTTTCCGC	<i>cbdbA960</i>	156 bp
EF-Tu_r	GAACCTCAAGCTCAACCAG		
Vektorette PCR			
UV-verkürzt	AGCGATTCTCGTACGAAC	Universeller Vektorette- Primer	
AB-for	GAAGGAGAGGACGCTGTCGTGCGA AGGTAAGGAACGGACGAGAGAAG GGAGAG	Oligo zur Bildung der Vektorette	
AB-rev	GACTCTCCCTTCTCGAATCGTAACC GTTTCGTACGAGAATCGCTGTCTCT CCTTC	Oligo zur Bildung der Vektorette	
DET-1260f	AACAGTGCGAAGCTGGAGCT	16S rRNA Gen von Stamm DCMB5	
DET-730r	GACAACCTAGAAAACCGC		
DET-249r	GCCATTACCCACCAACTAG		
T-RFLP zur Analyse der Mischkulturzusammensetzung und Überprüfung der cDNA Synthese			
fD1 ^{2,6}	FAM-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG		
Eub534 r ⁵	Siehe oben	Amplifikation des 16S rRNA Gens von Vertretern der <i>Bacteria</i>	464 bp
796r ⁷	GGGTTGCGCTCGTTG	Amplifikation des 16S rRNA Gens von Vertretern der <i>Bacteria</i>	1106 bp

Fortsetzung Tab. 8

Primer	Sequenz 5'→3'	Zielgen/Charakteristika	Größe des PCR Produkts
Kolonie-PCR			
PG1 ⁸	TGGCGGCCGCGGGAATCC	p-GEM [®] T-Easy-spezifische Primer	
PG2 ⁸	GGCCGCGAATTCAGTAGTG		
primer extension			
FAM-PE-1624	FAM-AGAGTGTGGAATGAAACTCTTT	Zieltranskript: <i>cbdbA1624</i>	
FAM-PE-84	FAM-AGAGTGTGGAATGGAAATTAGA	Zieltranskript: <i>cbrA</i>	
FAM-PE-1453	FAM-GCCGCACCAAGCCCAACGCCTG	Zieltranskript: <i>cbdbA1453</i>	
Gelshift Experimente			
P1-f	AGTGTGGAATGAAACTCTTT	Amplifikation des intergenen Bereichs der Gene	288 bp
P2-r	AGAGTCTCAAATTCGTTTCAT		
P3-r	AGGGTGATAGCAAGCTTA	<i>cbdbA1624-1625</i> (Abb. 6)	97 bp
P4-f	TAAGCTTGCTATCACCT		106 bp
P5-r	GCCAAATCTCCGTACACA		
CbdbA84-for	CGGCATTGGATATATGCTGA	Amplifikation des intergenen Bereichs der Gene <i>cbdbA83-84</i>	350 bp
CbdbA84-rev	CACCAAGCCCAACGCCTG		
CbdbA1453-for	AGTGTGGAATGGAAATTAGA	Amplifikation des intergenen Bereichs der Gene	475 bp
CbdbA1453-rev	GCGTATAAAGAAAGCCTGA		
Expression von <i>cbdbA1625</i>			
CbdbA1625-IBA3-for	ATGGTAGGTCTCAAATGAACGAAT	Amplifikation von <i>cbdbA1625</i> zur Ligation in pASK-IBA3	485 bp
CbdbA1625-IBA3-rev	TTTAAACGGGGTCAGGGT		
CbdbA1625-IBA5-for	ATGGTAGGTCTCAGCGCCAACGAA	Amplifikation von <i>cbdbA1625</i> zur Ligation in pASK-IBA5	482 bp
CbdbA1625-IBA5-rev	TTTAAACGGGGTCAGGGT		

¹Die Primer dienten zusätzlich der Amplifikation von PCR-Produkten, die nach Ligation in den Vektor pGEM[®]T-Easy, Transformation in *E. coli* XL1-Blue_MRF' und Reamplifikation in RFLP Analysen untersucht wurden. Der Primer cluster 4_f wurde dazu unmarkiert verwendet. ²Die Primer wurden für die Analyse der PCR-Produkte mittels t-RFLP 6-FAM-markiert verwendet. ³Krajmalnik-Brown *et al.* (2004), ⁴Die Primer wurden ohne 6-FAM-Markierung zur Amplifikation von PCR-Produkten genutzt, die nach Ligation in den Vektor pGEM[®]T-Easy, Transformation in *E. coli* XL1-Blue_MRF' und Reamplifikation in RFLP Analysen näher charakterisiert wurden. ⁵Muyzer *et al.* (1993), ⁶Weisburg *et al.* (1991), ⁷Sawada *et al.* (1993), ⁸Ballerstedt *et al.* (2004)

2.5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Primus 25 advanced[®], Peqlab, Erlangen/ Mastercycler[®] personal, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Für alle PCR-Ansätze wurden dünnwandige, besonders wärmeleitende, 0,2 ml Reaktionsgefäße (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) verwendet. Als Kontrollen wurden jeweils eine Negativkontrolle (Wasser an Stelle des *templates*) und eine Positivkontrolle (*template*, das mit den genutzten Primern ein Produkt ergeben sollte) mitgeführt. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes ist in Tab. 9 aufgeführt. Je nach Verwendungszweck kamen die *HotStarTaq* DNA Polymerase (Qiagen, Hilden) oder die Phusion[™]

Tab. 9. Zusammensetzung eines PCR Ansatzes

Komponente	<i>HotStarTaq</i> DNA Polymerase	Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase
MgCl ₂ (25 mM) ^a	3 mM	-
PCR-Puffer	1 x	1 x ^b
<i>forward</i> Primer (7 μM)	0,21 μM	0,21 μM
<i>reverse</i> Primer (7 μM)	0,21 μM	0,21 μM
dNTPs (2,5 mM)	200 μM	200 μM
DNA-Polymerase (5 U/μl)	2,5 U	1 U
<i>template</i>	1 μl/ 30 μl	1 μl/ 30 μl

^aZugabe fakultativ, ^bHigh Fidelity Puffer

High Fidelity (NEB, Frankfurt) DNA Polymerase zur Anwendung. Die dNTPs wurden von der Firma Bioline (Luckenwalde) und die Primer von Metabion (Martinsried) bezogen.

Die den DNA Polymerasen entsprechenden PCR-Programme sind in Tab. 10 zusammengefasst. Die Elongationszeiten richteten sich nach der Länge des zu erwartenden PCR-Produktes und der verwendeten DNA Polymerase (*HotStarTaq* DNA Polymerase: 1kb/min, Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase: 2 kb/min). Die Bindetemperatur eines Primers wurde nach der Formel $4 \cdot (\text{Guanin} + \text{Cytosin}) + 2 \cdot (\text{Adenin} + \text{Thymin}) - 3$ berechnet und gegebenenfalls im praktischen Versuch optimiert.

Tab. 10. Temperaturprogramm der PCR-Reaktionen mit *HotStarTaq* DNA Polymerase oder Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase.

Schritt	<i>HotStarTaq</i> DNA Polymerase		Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	98 °C	30 sec
1. Denaturierung	94 °C	30 sec	98 °C	10 sec
2. Annealing	45-60 °C	30 sec	60 °C	30 sec
3. Elongation	72 °C	1 min-1,5 min	72 °C	30 sec
Wiederholung der Zyklen 1.-3.	33 bis 50 Zyklen		10 Zyklen	
4. Denaturierung	-	-	98 °C	10 sec
5. Annealing	-	-	70 °C	30 sec
6. Elongation	-	-	72 °C	30 sec
Wiederholung der Zyklen 4.-6.	-		24 Zyklen	
Finale Elongation	72 °C	10 min	72 °C	7 min
Pause	8 °C	max. über Nacht	8 °C	max. über Nacht

2.5.7.1 Amplifikation der 16S rRNA Gene von Vertretern der Bacteria

Zur Überprüfung des DNaseI-Verdau und der reversen Transkription wurde die 16S rRNA cDNA mit den Primern fd1 (Weisburg *et al.*, 1991) und 796 (Sawada *et al.*, 1993) amplifiziert (Tab. 8). Die verwendete Primer-Bindetemperatur lag bei 51 °C. Es wurde mit 33 PCR-Zyklen gearbeitet.

Zur Untersuchung der Populationsstruktur von Mischkulturen mittels t-RFLP (Kap. 2.5.14) wurde eine Kombination der Primer FAM-fd1 (6-FAM-markiert) und EUB534r (Weisburg *et al.*, 1991; Muyzer *et al.*, 1993) genutzt (Tab. 8). Es wurden 40 PCR-Zyklen und eine Annealing-Temperatur von 51 °C verwendet.

Bei der Amplifikation der 16S rRNA Gene kam die *HotStarTaq* DNA Polymerase zur Anwendung.

2.5.7.2 Amplifikation von *rdhA* Genen aus *Dehalococcoides* sp. an DNA oder cDNA

Die Amplifikation der *rdhA* Gene erfolgte mit der *HotStarTaq* DNA Polymerase mit einer finalen MgCl₂-Konzentration von 3 mM im PCR-Ansatz.

Zur Identifizierung von *rdhA* Genen im Stamm DCMB5 wurden zunächst, basierend auf publizierten Sequenzen (Hölscher *et al.*, 2004), spezifische Primer für die bekannten *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 abgeleitet (Tab. 8, *rdhA1f/r* bis *rdhA16f/r*). Als *template* für die PCR diente isolierte Gesamt-DNA einer den Stamm DCMB5 enthaltenden Mischkultur. Als Positivkontrolle wurde Gesamt-DNA des Stammes CBDB1 verwendet. Um weitere *rdhA* Gene im Stamm DCMB5 zu identifizieren, wurde neben den spezifischen Primern ein degeneriertes Primerpaar (RRF2, B1R (Tab. 8); Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004) verwendet, mit dem es bereits gelang, *rdhA* Gene in den Stämmen FL2, BAV1 und CBDB1 zu finden.

Nach der Veröffentlichung der Genomsequenz des Stammes CBDB1 (Kube *et al.*, 2005) sollten, basierend auf den Sequenzen aller *rdhA* Gene des Stammes CBDB1, weitere *rdhA* Gene im Stamm DCMB5 nachgewiesen werden. Die Primer RRF2 und B1R erfassten nur einen begrenzten Teil der *rdhA* Gene des Stammes CBDB1. Daher mussten zur Amplifikation der *rdhA* Gene neue Primer abgeleitet werden. Aufgrund der starken Variabilität der *rdhA* Gensequenzen war es aber nicht möglich, nur ein degeneriertes Primerpaar abzuleiten. Deshalb wurden die *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 entsprechend eines phylogenetischen Baums (Kube *et al.*, 2005) und aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in vier Haupt-Cluster und insgesamt 13 Sub-Cluster untergliedert. Für jede dieser 13 Gruppen wurde anschließend ein in

der Regel degeneriertes Primerpaar abgeleitet (Tab. 8). Die amplifizierten PCR-Produkte wiesen eine Länge zwischen 350 und 1650 bp auf. Diese Primer wurden zur Amplifikation der *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 genutzt. Die PCR-Produkte wurden nach Klonierung durch Restriktionsanalyse (Kap. 2.5.11) und Sequenzanalyse (Kap. 2.5.13) sowie einer Analyse mittels t-RFLP (Kap. 2.5.14) näher charakterisiert. Für die t-RFLP Untersuchungen wurden die entsprechenden *forward* Primer mit 6-FAM am 5'-Ende markiert. Bei einigen Primern war es nötig, einen Linker mit einer Länge von 3 bp zwischen 6-FAM-Markierung und Primersequenz einzuführen (FAM-cl-1a-f, FAM-c1c-f, cluster 2b-f, cluster 4-f), um die PCR-Effizienz zu erhöhen. Die 6-FAM-markierten Primer wurden stets über HPLC gereinigt. Zur Analyse der Transkription aller 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 wurden t-RFLP Analysen an cDNA durchgeführt. Dabei kamen zunächst die 6-FAM-markierten Primer zur Anwendung, die im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurden und die PCR-Produkte bis zu einer Länge von 1650 bp ergaben. Dabei zeigte sich, dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit zunehmender Länge der amplifizierten PCR-Produkte abnahm. Um kürzere PCR-Produkte zu erhalten, wurden deshalb die meisten *rdhA* Gene in neuen Sub-Clustern organisiert (Ausnahmen: *cbdbA187*, *cbdbA1539*, *cbdbA1503*, *cbdbA1092* - entsprechen den Sub-Clustern 4a und 4b). Anschließend wurden, bei in der Regel gleich bleibenden *forward* Primern, entsprechend neue *reverse* Primer abgeleitet (Tab. 8). Die *forward* Primer der Cluster 1a und 1c wurden leicht modifiziert, wobei die Bindestelle der Primer im Genom von Stamm CBDB1 erhalten blieb. Die neu abgeleiteten Primerpaare ergaben PCR-Produkte einer Länge von 350 bis 650 bp. Die Bindetemperaturen dieses Primersatzes (45 °C bis 51 °C) und die verwendeten Zyklenzahlen (34 bis 50 Zyklen) sind in der Arbeit von J. Junick (2007) zusammengefasst. Als *template* diente cDNA aus den Transkriptionsanalysen und als Positivkontrolle wurde Gesamt-DNA des Stammes CBDB1 verwendet.

2.5.7.3 Vektorette PCR

Die Vektorette-PCR ermöglicht die Amplifikation von unbekanntem DNA-Bereichen, die an bekannte Sequenzabschnitte angrenzen. Im Rahmen der Methode wurde die Gesamt-DNA einer den Stamm DCMB5 enthaltenden Mischkultur mit einer Restriktionsendonuklease verdaut, die glatte Enden an den Restriktionsfragmenten erzeugte. Alle entstandenen Enden wurden anschließend mit einer bekannten kurzen doppelsträngigen DNA-Sequenz, der so genannten Vektorette (Abb. 5), verbunden. Diese diente nach Synthese des Primärstranges

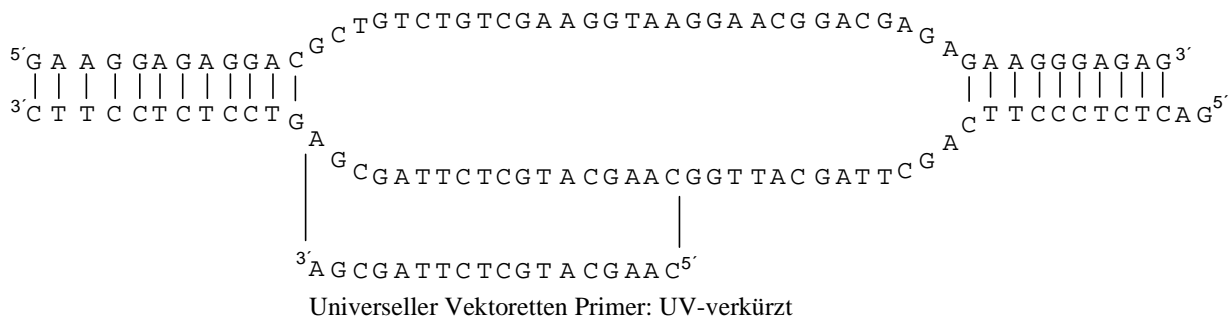


Abb. 5. Struktur der Vektorette und Position des Vektor-spezifischen Primers UV-verkürzt. Die Bindestelle dieses Primers wird erst nach Synthese des Primärstranges mit dem Gen-spezifischen Primer geschaffen. Die Ligation der Vektorette erfolgte gerichtet über das glatte Ende.

mit einem spezifischen Primer aus dem bekannten Sequenzbereich als Zielsequenz für den zweiten Primer (Primer UV-verkürzt). Die Ligation der Vektorettens erfolgte gerichtet über die glatten Enden.

Die Herstellung der Vektorettens erfolgte in einem 100 µl Ansatz. Dazu wurden 5 µl der einzelsträngigen Vektorettens-Primer (AB-for, AB-rev (Tab. 8); je 100 µM) mit 84 µl A. bidest gemischt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 6 µl einer 25 mM MgCl₂ Lösung zugeben und das Gemisch langsam zur Bildung des Doppelstranges auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lagerung des Ansatzes erfolgte bei -20 °C.

Nach dem Verdau der Gesamt-DNA des Stammes DCMB5 in einem 20 µl Ansatz mit 1 U/µl eines Restriktionsenzymes (DraI, SspI oder NaeI (Fermentas)) im jeweiligen Puffer (Endkonzentration: 1 x) bei 37 °C über Nacht und Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10 min erfolgte die Ligation der Vektorettens. Dazu wurden in einem 50 µl Ansatz 20 µl Restriktionsansatz mit 5 µl 10 x T4-Ligasepuffer, 1 µl der Vektorettens, 2 µl T4-Ligase (5 U/µl; Promega), 5 µl 50 % Polyethylenglycol (PEG) und 17 µl A. bidest gemischt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 16 °C über Nacht.

Die Amplifikation der PCR-Produkte erfolgte mit *HotStarTaq* Polymerase mit den *Dehalococcoides* sp. 16S rDNA Primern 249r, 730r oder 1260f und dem Vektorettens-spezifischen Primer UV-verkürzt (Tab. 8).

2.5.7.4 Kolonie-PCR

Nach der Ligation von PCR-amplifizierten Fragmenten der *rdhA* Gene oder 16S rRNA Gene der Stamm DCMB5-haltigen Mischkulturen in den Vektor pGEM[®]T-Easy, Transformation in den *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ und Identifikation positiver Klone mittels Blau-Weiß-Screening erfolgte eine Reamplifikation des Plasmid-Inserts mit dem Vektor-spezifischen Primerpaar

PG1/PG2 (Tab. 8, Ballerstedt *et al.*, 2004). Die PCR-Produkte wurden mit der *HotStarTaq* DNA Polymerase bei einer Bindetemperatur der Primer von 56 °C amplifiziert. Als Template dienten Kolonien positiver Klone suspendiert in A. bidest nach einer Inkubation von 10 min bei 95 °C. Die PCR-Produkte wurden abschließend in Restriktionsanalysen (Kap. 2.5.11) näher charakterisiert.

2.5.7.5 Amplifikation von *cbdbA1625*

Das Gen des MarR-ähnlichen Transkriptionsregulators *CbdbA1625* wurde an chromosomaler DNA des *Dehalococcoides* Stammes CBDB1 mit dem Primerpaaren *CbdbA1625-IBA3-for/rev* oder *CbdbA1625-IBA5-for/rev* (Tab. 8) amplifiziert und nach Verdau mit *BsaI* (New England Biolabs) in den Vektor *pASK-IBA3* bzw. in den Vektor *pASK-IBA5* ligiert. Die Amplifikation erfolgte mit der *PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase* mit dem in Tab. 9 gezeigten Ansatz und dem in Tab. 10 aufgeführten PCR-Programm.

2.5.8 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten mittels „*QIAquick PCR Purification Kit*“ (Qiagen) erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die PCR-Produkte wurden mit 30 bis 50 µl A. bidest eluiert.

Zum anderen wurden die PCR-Produkte durch Gelelektion gereinigt. Die PCR-Produkte wurden hierzu in einem 1%igen Agarosegel (Kap. 2.5.16.1) aufgetrennt und die gewünschte Bande wurde anschließend aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der PCR-Produkte aus der Gelmatrix erfolgte mittels „*QIAquick II Gel Extraction Kit*“ (Qiagen) nach Herstellerangaben.

2.5.9 Ligation von gereinigten PCR-Produkten

2.5.9.1 Ligation in den Vektor *pGEM[®]T-Easy*

Nach der Amplifikation von 16S rRNA- und *rdhA* Genen aus den *Dehalococcoides* enthaltenden Mischkulturen und Reinigung der PCR-Produkte (Kap. 2.5.8) erfolgte die Ligation der gereinigten PCR-Produkte in den Vektor *pGEM[®]T-Easy* mit dem „*pGEM[®]*

T-Easy Vector System“ (Promega) nach Herstellerangaben. Die Ligation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur und weiter über Nacht bei 4 °C.

2.5.9.2 Ligation in die Vektoren pASK-IBA3 bzw. pASK-IBA5

Die Ligation des *cbdbA25* Amplifikates sollte über die BsaI Schnittstellen in die Vektoren pASK-IBA3 bzw. pASK-IBA5 erfolgen. Dazu wurden sowohl das PCR-Produkt als auch der Vektor (je ca. 1 µg) mit 3 U BsaI im entsprechenden Puffer über Nacht bei 50 °C verdaut. Danach wurde das geschnittene PCR-Produkt mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ gereinigt (Kap. 2.5.8).

Die Vektoren wurden durch Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, Promega) dephosphoryliert, um eine Selbstligation zu verhindern. Dazu wurde dem Restriktionsansatz 1 U des Enzyms zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Enzym bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Anschließend erfolgte die Reinigung der Vektoren durch Gelelektion mit dem „QIAquick II Gel Extraction Kit“ (Kap. 2.5.8).

Die Ligation erfolgte im 20 µl-Ansatz mit 0,1 U/µl T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim). Vektor- (ca. 15 ng) und Fragment-DNA (ca. 150 ng) wurden 5 min bei 45 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Puffer (Endkonzentration: 1 x) und Enzym. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Da die Ligationsprodukte anschließend mittels Elektroporation transformiert werden sollten, wurden diese zur Entfernung von Salzen einer 30-minütigen Mikrodialyse gegen A. bidest unterzogen. Dabei kamen Nitrocellulose-Filter (Millipore, Eschborn) mit einem Porendurchmesser von 0,025 µm zum Einsatz.

2.5.10 Transformation von *E.coli*

2.5.10.1 Transformation durch Hitzeschock (CaCl₂-Methode)

Die amplifizierten 16S rRNA- oder *rdhA*-Gene wurden nach Ligation in den Vektor pGEM[®]T-Easy mittels CaCl₂-Methode in *E. coli* XL1-Blue MRF[™] transformiert.

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* XL1-Blue MRF[™] Zellen wurden 70 ml NB-Medium mit 700 µl einer über Nacht angezogenen Kultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde anschließend zentrifugiert (20 min, 4500 x g, 4 °C) und das Pellet in 21 ml einer 70 mM CaCl₂/ 20 mM MgSO₄-Lösung

resuspendiert. Der Ansatz wurde 45 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 4500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 7 ml einer 70 mM CaCl₂/ 20 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert und 45 min auf Eis gelagert. Darauf folgend wurden 1,75 ml steriles Glycerin langsam zum Ansatz pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen in 200 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden pro Ansatz 200 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2-10 µl des Ligationsansatzes versetzt und nach vorsichtigem Mischen 30 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz 1 min bei 42 °C und 2 min auf Eis gelagert. Dann wurden 800 µl NB-Medium zugegeben und die Zellen 60 min, schüttelnd, bei 37 °C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden jeweils 200µl und 300 µl auf Selektivmedium (NA; 125 µg/ml Amp, 80 µg/ml X-Gal, 0,5 mM IPTG) ausgestrichen.

2.5.10.2 Transformation durch Elektroporation

Das in die Vektoren pASK-IBA3 bzw. pASK-IBA5 ligierte PCR-Produkt des Gens *cbdbA1625* wurde mittels Elektroporation in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL übertragen. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 200 ml NB-Medium mit 2 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 kultiviert. Die Kultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (20 min, 4500 x g, 4 °C). Das Zellpellet wurde zweimal mit je 200 ml eiskaltem A. bidest und einmal mit 30 ml 10%igem Glycerin gewaschen, anschließend in 0,5-0,7 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und in 40 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

Die Elektroporation erfolgte mit einem 'Gene PulserTM' (Biorad, München). Pro Ansatz wurden 40 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Ligationsansatz versetzt und in sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF und einer Feldstärke von 12,5 kV/cm. Anschließend wurden dem Ansatz 1 ml NB-Medium zugegeben und die Zellen 60 min bei 37 °C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden jeweils 100 µl und 200 µl auf Selektivmedium (NA, 100 µg/ml Amp, 30 µg/ml Cm) ausgestrichen.

2.5.11 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Nach Ligation der 16S rDNA- und *rdhA*-Amplifikate in den Vektor pGEM[®]T-Easy, Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF[®] und Reamplifikation der Inserts mittels Kolonie-PCR wurden die PCR-Produkte (ca. 200 ng/μl) über Nacht bei 37 °C mit einem Gemisch der Enzyme MspI und RsaI (je 0,6 U/μl; Fermentas) verdaut. Die verdauten Fragmente wurden in 2,5%igen Agarosegelen mit 1 x TAE-Laufpuffer aufgetrennt (Kap. 2.5.16.1). Die Inserts ausgewählter Klone wurden anschließend durch Sequenzierung näher charakterisiert (Kap. 2.5.13).

2.5.12 Plasmidisolierung

Die Ernte der Zellen aus den 3 ml-Flüssigkulturen erfolgte durch Zentrifugation über 5 min bei 8518 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet weiter verwendet. Die Plasmide, die als *template* für PCR- und Sequenzreaktionen verwendet werden sollten, isolierte man anschließend mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde mit 70 μl A. bidest eluiert.

2.5.13 Sequenzierung

Zur Sequenzierung kam der „ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator v 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit“ (PE Applied Biosystems) zum Einsatz (Durchführung nach Herstellerangaben). In die Sequenzierreaktion wurden gereinigte PCR-Produkte (Kap. 2.5.8) oder isolierte Plasmide (Kap. 2.5.12) eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte am automatischen Sequenzer ABI PRISM 377 Version 4.0 (PE Applied Biosystems, Langen).

2.5.13.1 Auswertung von Sequenzdaten

Sequenzvergleiche mit Einträgen in der Datenbank des „European Molecular Biology Laboratory“ (EMBL) wurden mit BLAST (*basic local alignment search tool*, Altschul *et al.*, 1997) über das „National Center for Biotechnological Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. 16S rDNA-Teilsequenzen aus verschiedenen Sequenzierreaktionen wurden mit dem Programm DNASIS miteinander verknüpft. Die Bestimmung der Identitäten bzw. der Vergleich verschiedener Sequenzen erfolgte durch Alignments im Programm CLUSTAL W

(Thompson *et al.*, 1994) über das „*European Bioinformatics Institute*“ (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>). Für den theoretische Verdau von DNA-Sequenzen kam das Programm „*Clone*“ (Version 4.0, *Scientific & Educational Software*, Durham/NC, USA) zur Anwendung.

2.5.14 Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Diese Methode wurde genutzt, um die Populationsstruktur der *Dehalococcoides* sp. enthaltenden Anreicherungskulturen zu beschreiben, die Transkription der 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 zu untersuchen und *rdhA* Gene im Genom des Stammes DCMB5 zu identifizieren.

2.5.14.1 Restriktionsverdau der 6-FAM-markierten PCR-Produkte

Die 6-FAM markierten *rdhA*-PCR-Produkte (Kap. 2.5.7.1, 2.5.7.2) wurden mittels „*QIAquick PCR Purification Kit*“ (Kap. 2.5.8) gereinigt und auf 1%igen Agarosegelen (Kap. 2.5.16.1) analysiert. Nachfolgend wurden die Amplifikate jedes (degenerierten) Primerpaars in Aliquots unterteilt und jedes Aliquot wurde mit 1 U/μl eines Restriktionsenzym im vorgeschlagenen Puffer 5 h bei 37 °C verdaut.

Im Fall der amplifizierten 16S rRNA Gene (Kap. 2.5.7.1) aus den Mischkulturen wurden ca. 800 ng DNA mit je einem der Enzymen *MspI*, *RsaI*, *AluI* oder *BsuRI* (Fermentas) geschnitten. Eine Zuordnung der Restriktionsmuster zu bestimmten Bakterien erfolgte auf der Grundlage bereits früher analysierter Klonbibliotheken (Wagner (2004), Tab. 11).

Der Verdau der *rdhA* Amplifikate (100 bis 500 ng DNA) wurde mit den Enzymen *MspI*, *RsaI*, *AluI*, *MboI*, *FnuDII*, *PstI* oder *BsuRI* (Fermentas) durchgeführt. Dabei wurde jedes PCR-Produkt mit einem bis vier Restriktionsenzymen verdaut, um spezifische terminale Fragmente aller 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 sichtbar zu machen (Tab. 12).

Nach Restriktion der PCR-Produkte wurde die DNA mit Ethanol gefällt. Hierzu wurde nach der Zugabe von 1,5 μl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 60 μl 99%igem eiskaltem Ethanol 20 min bei 8518 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 500 μl 70%igem Ethanol gewaschen (8518 x g, 10 min, Raumtemperatur) und nach Entfernung des Überstandes mittels SpeedVac SVC 100 getrocknet.

Tab. 11. Theoretische^a terminale Restriktionsfragmente von 16S rRNA Genen, die in 16S rDNA Genbibliotheken der Anreicherungskulturen Spit 1, Spit 2 und Spit 3 identifiziert wurden (modifiziert nach Wagner (2004)).

Muster (Klon)	Höchste 16S rRNA Gen-Ähnlichkeit	% Identität	Terminales Fragment [bp]			
			MspI	RsaI	AluI	BsuRI
1 (Spit 3-1/1)	Uncultured bacterium clone BAO53	99	509	57	130	271
7 (Spit 3-2/9)	Unidentified bacterium clone vadinHA60	99	166	247	153	208
24 (Spit 3-2/37)	Uncultured Nitrospirae bacterium clone Ev219h1bfT3b4	91	359		93	308
			[221] ^a			
3 (Spit 3-3/7)	<i>Clostridium lituseburense</i> ATCC 25759	97	195	117	191	270
4 (Spit 3-2/7)	Uncultured bacterium clone HDBW-WB57	99	280		191	256
9 (Spit 3-3/16)	Uncultured Clostridiales bacterium clone 12-10F	99		438	224	210
12 (Spit 2-2/218)	<i>Sedimentibacter</i> sp. B4	99	160	123	234	281
13 (Spit 3-2/4)	<i>Clostridium hastiforme</i>	95	299		255	302
15 (Spit 3-1/24)	Uncultured bacterium clone BFE-P2	99		451	237	257
16 (Spit 2-2/205)	<i>Clostridium peptidovorans</i>	99		448	234	298
21 (Spit 3-2/34)	Uncultured bacterium clone AuSVC14	98	520	451	237	257
				[443]		
30 (Spit 2-2/212)	Uncultured <i>Clostridium</i> clone PSB-M-2	95	492	422	208	193
22 (Spit 3-1/32)	<i>Thermovirga lienii</i> strain Cas60314	100	181		76	132
23 (Spit 3-1/39)	Uncultured bacterium clone YK21	98	167	469	94	238
25 (Spit 2-2/209)	Uncultured bacterium clone:LS4-242	97	288	484	74	200
27 (Spit 2-2/224)	Bacterium ROME195Asa	98	221	468	252	
28 (Spit 1-1/46)	Unidentified eubacterium clone vadinHA73	99	40	398	50	
2 (Spit 3-1/2)	<i>Trichococcus patagoniensis</i> PMagG1	99	154		76	215
10 (Spit 3-3/35)	<i>Trichococcus palustris</i> DSM 9172	99	156		77	217
5 (Spit 3-2/10)	<i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm CBDB1	99	509	443	131	168
8 (Spit 3-2/17)	Anaerobic filamentous bacterium KIBI-1	93	25	443	229	32
6 (Spit 3-2/12)	Uncultured bacterium clone E16	99		311	328	408
29 (Spit 2-2/28)	Uncultured bacterium IIB-29	99	94	476	242	38
18 (Spit 3-2/28)	Uncultured bacterium clone SJA-168	98	209	296	237	212
19 (Spit 3-2/29)	Uncultured bacterium clone AME E35	95	160		201	281
20 (Spit 3-2/32)	Bacterium DCE25	99	123		238	76
11 (Spit 3-2/3)	Uncultured bacterium clone B51	99	200	212	75	

^aTheoretischer Verdau mit der Software „Clone 4.0“, ^bTerminales Restriktionsfragment erhalten nach MspI-Verdau des 16S rDNA PCR-Produktes amplifiziert an Plasmid-DNA des Klons Spit 3-2/37 mit dem Primerpaar PG1/PG2.

2.5.14.2 Analyse der Restriktionsfragmente

Die Analyse der 6-FAM-markierten terminalen Restriktionsfragmente (t-RFs) erfolgte entweder am automatischen Sequenzer ABI PRISM 377 Version 4.0 oder am ABI Prism 3100 Genetic Analyzer. Die Fragmentlänge wurde durch den Vergleich mit einem internen Standard (ROX Genescan 500 (PE Applied Biosystems) oder ROX Genescan (-250)) in einem Bereich von 50 bis 550 bp bestimmt. Die Analyse der Daten wurde mit der Genescan

Tab. 12. Terminale Restriktionsfragmente (t-RFs) baierend auf einem theoretischen Verdau der *rdhA* Gensequenzen des Stammes CBDB1 mit dem Programm „Clone 4.0“.

<i>Forward Primer</i>	Amplifizierte <i>rdh</i> Gene	Länge der t-RFs [bp]						
		MspI	RsaI	AluI	MboI	FnuDII	PstI	BsuRI
cluster 1a_f	<i>cbdbA1453</i>	179	94	162	-	-	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1624</i>	127	194	162	-	-	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1550</i>	163	204	-	234	-	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1570</i>	266	419	433	-	-	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1595</i>	33 ^a	43 ^a	20 ^a	85	494	n.a.	n.a.
	BAV1 <i>rdhA5</i>	35 ^a	43 ^a	20 ^a	85	494	n.a.	n.a.
FAM-cl-1a-f	<i>cbdbA1595</i>	32 ^a	40 ^a	n.a.	82	491	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1578</i>	176	311	n.a.	277	-	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1535</i>	137	134	n.a.	412	181	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1575</i>	176	651	n.a.	7 ^a	130	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1453</i>	176	91	n.a.	-	-	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1624</i>	124	191	n.a.	-	-	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1546</i>	175	135	n.a.	820	121	n.a.	n.a.
cluster 1b_f	<i>cbdbA1495</i>	32 ^a	101	228	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1508</i>	241	384	24 ^a	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
cluster 1c_f	<i>cbdbA1588</i>	52	19 ^a	-	-	351	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA96</i>	433	4 ^a	56	-	-	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1535</i>	24 ^a	4 ^a	32 ^a	344	513	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1582</i>	93	510	32 ^a	-	-	n.a.	n.a.
FAM-cl-1c-f	<i>cbdbA1588</i>	159	40	26 ^a	147	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA96</i>	252	469	383	150	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1582</i>	171	960	482	273	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1550</i>	162	203	1037	233	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1570</i>	265	418	432	-	n.a.	n.a.	n.a.
cluster 1d_f	<i>cbdbA1578</i>	176	311	95	277	-	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1546</i>	175	135	25 ^a	-	121	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1575</i>	176	-	30 ^a	7 ^a	130	n.a.	n.a.
cluster 2a_f	<i>cbdbA84</i>	226	139	189	10 ^a	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1563</i>	-	-	507	216	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1638</i>	248	386	39 ^a	-	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1560</i>	46 ^a	171	20 ^a	229	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA1627</i>	239	-	159	-	n.a.	n.a.	n.a.
cluster 2b_f	<i>cbdbA1542</i>	239	233	174	n.a.	n.a.	-	n.a.
	<i>cbdbA1491</i>	367	251	198	n.a.	n.a.	-	n.a.
	<i>cbdbA238</i>	185	451	18 ^a	n.a.	n.a.	-	n.a.
	<i>cbdbA1455</i>	69	377	352	n.a.	n.a.	-	n.a.
	<i>cbdbA1598</i>	69	-	24 ^a	n.a.	n.a.	218	n.a.
	<i>cbdbA1618</i>	137	114	204	n.a.	n.a.	-	n.a.
cluster 3_f	<i>cbdbA88</i>	214	5 ^a	283	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA80</i>	505	5 ^a	101	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>cbdbA243</i>	69	5 ^a	229	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	BAV1 <i>rdhA1</i>	24 ^a	5 ^a	209	85	-	n.a.	n.a.
cluster 4_f	<i>cbdbA1503</i>	182	70	82	n.a.	n.a.	n.a.	75
	<i>cbdbA1092</i>	7 ^a	235	82	n.a.	n.a.	n.a.	-
	<i>cbdbA187</i>	217	-	287	n.a.	n.a.	n.a.	253
	<i>cbdbA1539</i>	-	-	75	n.a.	n.a.	n.a.	270
FAM-RRF2	<i>DETO173</i>	34 ^a	49 ^a	224	81	-	-	494

^aT-RF war außerhalb des analysierten Bereichs (50 bis 550 bp); n.a.: Sequenzen wurden nicht analysiert; -: Schnittstelle war in dem entsprechenden Sequenzbereich nicht vorhanden.

2.1 Software (PE Applied Biosystems) oder der GeneMapper 3.7 Software durchgeführt. Die Zuordnung der terminalen Fragmente zu spezifischen *rdhA* Genen erfolgte basierend auf den Ergebnissen eines theoretischen Verdau (Clone 4.0) der *rdhA* Nukleotidsequenzen. Die theoretisch bestimmten Fragmentlängen wurden durch Nutzung genomischer DNA des

Stammes CBDB1 als template für die PCR experimentell bestätigt. Dabei zeigte sich, dass Abweichungen zwischen 2 bis 5 bp in der Länge der theoretisch bestimmten und praktisch erhaltenen terminalen Fragmente auftraten. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch Unterschiede in der Nukleotidsequenz des internen Standards und der Zielsequenz (Takeshita *et al.*, 2007).

2.5.15 Quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR Reaktionen erfolgten in einem Ansatz von 20 µl, der 10 µl des „QuantiTect SYBR Green PCR master mix“ (Qiagen), 1,2 µl eines jeden Primers (Endkonzentration: 0,3 µM), 6,6 µl A. bidest und 1 µl template DNA oder cDNA enthielt. Die qPCR wurde in einer „Rotor Gene 6.0 qPCR machine“ (Corbett Research, Sydney, Australien) durchgeführt. Das Temperaturprogramm lief wie folgt ab: 15 min bei 95 °C, gefolgt von 40 bis 44 Zyklen aus 15 sec bei 94 °C, 30 sec bei 50 bis 59 °C und 30 sec bei 72 °C. Nach jeder Elongationsphase erfolgte die Messung der Fluoreszenz bei 72 °C und 80 °C. Eine Schmelzkurve wurde erstellt durch Messung der Fluoreszenz bei Erhöhung der Temperatur von 60 °C auf 99 °C in 1 °C-Schritten. Die Temperatur wurde dabei im ersten Schritt für 15 sec und in allen weiteren Schritten für 5 sec gehalten.

Die Primer 539f/730r (Ewald *et al.*, 2007, Tab. 8) wurden genutzt um die 16S rRNA Gene oder cDNA der *Dehalococcoides* Stämme CBDB1 und DCMB5 spezifisch zu amplifizieren. Zur Quantifizierung bakterieller 16S rRNA Gene in Mischkulturen wurden die Primer Eub341f/Eub534r (Muyzer *et al.*, 1993, Tab. 8) genutzt. Die Primerpaare *cbdbA84 f/r*, *cbdbA1624 f/r*, *cbdbA1453 f/r*, *cbdbA1588 f/r*, *cbdbA1618 f/r*, *cbdbA187 f/r*, *rpoA f/r*, *rpoB f/r*, *EF-Tu f/r* und *Luci f/r* wurden für die Amplifikation von *rdhA* Genen (*cbrA*, *cbdbA1624*, *cbdbA1453*, *cbdbA1588*, *cbdbA1618*, *cbdbA187*), putativen *house keeping* Genen (*rpoA*, *rpoB*, *tuf*) und der Luziferase cDNA verwendet. Die Primersequenzen sind in Tab. 8 zusammengefasst.

Ein Plasmid, das als Insert das 16S rRNA Gen (bp 8-1512; Brosius *et al.*, 1981) des Stammes DCMB5 trägt, wurde als Standard für die Quantifizierung der 16S rRNA Genkopienzahl verwendet. Für die Quantifizierung aller anderen Gene wurden mit den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Primern PCR-Produkte amplifiziert. Diese wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ gereinigt, in den Vektor pGEM[®]T-Easy ligiert und in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ transformiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration der isolierten Plasmide (Kap. 2.5.6) bestimmt und die Kopienzahl aus der molekularen Masse

aller Nukleotide des doppelsträngigen Plasmids, der Molarität bei einer gegebenen Konzentration und unter Nutzung der Avogadro Konstante errechnet. Für die Erstellung der Standardkurve wurden die Plasmide in 10er Schritten von 10^9 bis 10^1 Kopien/ μ l verdünnt und jede Verdünnungsstufe wurde in Dreifach-Ansätzen gemessen. Für die Quantifizierung von Proben wurden drei Verdünnungsstufen des jeweiligen Plasmids als externer Standard verwendet. Die Proben und Standards wurden in Duplikaten analysiert.

Das Transkriptionsniveau der *rdhA* Gene wurde aus dem Quotienten der Kopienzahl der *rdhA* Transkripte (normiert durch die Wiederfindungsraten der Luziferase mRNA) und der Kopienzahl der entsprechenden *rdhA* Gene in einem ml Probe berechnet.

2.5.16 Agarosegelelektrophorese

2.5.16.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 1%ige bzw. 2,5%ige Agarose-Gele verwendet. Die Gele wurden mit 0,5 x TAE-Puffer (20 mM Tris-Acetat, pH 8; 0,5 mM EDTA) hergestellt. Dieser Puffer kam anschließend auch als Laufpuffer zum Einsatz. Die 1%igen Gele dienten der Überprüfung von PCR-Reaktionen, der Analyse von Plasmidisolierungen und der Reinigung von PCR-Produkten. Die 2,5%igen Gele wurden für Restriktionsanalysen genutzt (Kap. 2.5.11). Durch Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 μ g/ml) zum Gel konnten die Banden nach erfolgter Auftrennung durch UV-Licht (Gelimager, Pharmacia) sichtbar gemacht werden. Vor dem Auftragen wurden die Proben entweder mit einem Volumen 1 x Blue/Orange Loading Dye (Promega) gemischt oder für die Restriktionsanalysen mit 1/5 Volumen des sechsfach konzentrierten Blue/Orange Loading Dyes versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 80 bis 100 V. Um Fragmentgrößen und DNA-Mengen abschätzen zu können, wurden folgende DNA-Marker mit auf das Gel aufgetragen:

p-GEM[®] DNA Marker (Promega)

2645, 1605, 1198, 676, 517, 460, 396, 350, 222, 179, 126, 75, 65, 51 bp

GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp

2.5.16.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA

Gesamt-RNA von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 wurde in 1,2%igen Agarosegelen aufgetrennt, die 3 % Formaldehyd enthielten. Die Gele wurden mit 1 x MOPS-Puffer (20 mM 3-(N-Morpholino)-Propansäure (MOPS), pH 7,0; 5 mM Na-Acetat) hergestellt, der später auch als Laufpuffer diente. Vor dem Auftragen wurde die RNA-Lösung 1:1 mit 2 x RNA Ladepuffer (inkl. Ethidiumbromid, Fermentas) versetzt, 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V in horizontalen Kammern für ca. 2 h. Als Größenstandard wurde der RiboRuler™ RNA Ladder, High Range (Fermentas) verwendet.

RiboRuler™ RNA Ladder, High Range (Fermentas)

6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500, 200 nt

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Heterologe Synthese von Proteinen mit Hilfe des *Strep-tag* II-Expressionssystems

Die Überproduktion von CbdbA1625 als *Strep-tag* II-Fusionsprotein (CbdbA1625-Strep) erfolgte mit den Vektoren pASK-IBA3 (CbdbA1625-Strep_{C-terminal}) und pASK-IBA5 (CbdbA1625-Strep_{N-terminal}) im Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL.

2.6.1.1 Proteinbiosynthese von *cbdbA1625-Strep-tag* II Konstrukten

Die Synthese der *Strep-tag* II-Fusionsproteine erfolgte mit den genannten Wirt-Vektorsystemen (Kap. 2.6.1) in 600 ml LB-Medium (100 µg/ml Amp, 30 µg/ml Cm) nach Beimpfen aus einer über Nacht angezogenen Kultur. Die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) zu Beginn des Versuches lag bei 0,1. Die Kultivierung wurde schüttelnd bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 durchgeführt. Nach Induktion mit Anhydrotetrazyklin (AHT, Endkonzentration: 0,2 µg/ml) wurden die Zellen weitere 3h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Abschließend wurden die Zellen in 100 ml (CbdbA1625-Strep_{C-terminal}) oder 200 ml (CbdbA1625-Strep_{N-terminal}) Aliquots geerntet (15 min, 5000 x g, 4 °C). Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei -20 °C.

2.6.1.2 *rapid screening* nach *cbdbA1625*-Strep exprimierenden Klonen

Das Zellpellet von je 1 ml Kultur wurde vor und 3 h nach Induktion mit 0,2 µg/ml AHT in Puffer W (100 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA; 2 mM Dithiothreitol (DTT)) resuspendiert (1/10 Volumen der OD₆₀₀ [µl]). Acht Mikroliter des Zellysates wurden mit 3 µl 5 x SDS-Probenpuffer (315 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10 % SDS; 50 % Glycerin; 0,05 % Bromphenolblau; 25 % β-Mercaptoethanol) versetzt und 10 min bei 96 °C inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 2.6.3) und die Visualisierung durch Coomassie-Färbung (Kap. 2.6.4).

2.6.1.3 Zellaufschluss

Das Zellpellet aus 100 ml Kultur wurde in 1 ml Puffer W aufgenommen und nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in einer Endkonzentration von 0,1 µM und 5 µg/ml DNaseI 30 min bei 37 °C inkubiert. An der French-Press (SLM Instruments, Rochester/NY, USA) erfolgte der Aufschluss der Zellen in zwei Passagen bei 1260 psi. Nach Zugabe von Avidin (25 mg/ml) und einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 42722 x g, 4 °C). Der Überstand (Rohextrakt) wurde auf Eis gelagert.

2.6.1.4 Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose

Die Reinigung der *Strep-tag* II-Fusionsproteine erfolgte über StrepTactin-Sepharose Säulen (1 ml Bettvolumen, IBA). Nach Äquilibration der Säulenmatrix mit 5 ml Puffer W wurde der Rohextrakt auf die Säule pipettiert. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit 5 x 1 ml Puffer W von der Säule entfernt. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 6 x 0,5 ml Puffer E (Puffer W mit 2,5 mM α-Desthiobiotin (Sigma, Taufkirchen)). Die Säulenmatrix wurde durch Zugabe von 3 x 5 ml Puffer R (Puffer W mit 1 mM 2-(4'-Hydroxybenzylazo)-benzoat (HABA, Sigma)) und 2 x 5 ml Puffer W regeneriert.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm am NanoDropTM 1000 Spektralphotometer (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA).

Parallel wurde die Methode nach Bradford (1976) angewendet. Dazu wurden 20 µl Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz (0,007 % Serva Blue G-250, 5 % Ethanol, 8,5 % H₃PO₄) gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption wurde bei 595 nm an einem Spekol 1200 (Carl-Zeiss-Technology, Jena) durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Erstellung einer Kalibriergeraden mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) in einem Bereich von 50 bis 500 µg/ml.

2.6.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) in einer vertikalen Minigel-Apparatur (Biometra, Göttingen). Sammelgel (5 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1); 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,05 % Ammoniumpersulfat (APS); 7 mM N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)) und Trenngel (15 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1); 376 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,05 % APS; 6 mM TEMED) wurden entsprechend vorbereitet. Acht Mikroliter der Proteinlösung wurde mit 3 µl 5 x SDS-Probenpuffer (Kap. 2.6.1.2) versetzt und nach Denaturierung (5 min, 95 °C) auf die Gele aufgetragen. Die Proben wurden zunächst bei 10 mA für 15 min und anschließend bei 25 mA mit Tris/Glycin-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS) aufgetrennt.

Als Molekulargewichtsmarker dienten der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa; Fermentas) und der Broad Range Precision Protein Marker (10, 15, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa, BioRad).

2.6.4 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die Färbung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine geschah durch Schwenken der Gele 30 bis 60 min in Coomassie-Färbelösung (0,2 % Serva Blue R250, 0,05 % Serva Blue G250, 42,5 % Ethanol, 5 % Methanol, 10 % Essigsäure). Anschließend wurden die Gele innerhalb von 1 bis 2 h mit schnellem Entfärber (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) oder über Nacht mit langsamem Entfärber (7 % Essigsäure) entfärbt.

2.6.5 Transfer von Proteinen auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen

Die Übertragung von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran (Pierce, Rockford/IL, USA) erfolgte mit einer Fastblot B34-Apparatur (Biometra, Göttingen). Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel 10 min in Transferpuffer (50 mM Na-Borat pH 9,0; 10 % Methanol) inkubiert und die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Membran nacheinander je 1 min in Methanol, Wasser und Transferpuffer geschwenkt. Anschließend wurde von der Anode aus folgende Schichtung luftblasenfrei vorgenommen: drei Lagen Transferpuffer-getränktes Whatman-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel), PVDF-Membran, Polyacrylamidgel und abschließend drei weitere Lagen Whatman-Papier. Der Transfer erfolgte für 60 min bei RT und 1,2 mA pro cm² Membranfläche.

2.6.6 Antikörpernachweis von *Strep-tag* II-Fusionsproteinen

Der Nachweis der rekombinanten, mit einem *Strep-tag* II fusionierten Proteine erfolgte mittels StrepTactin-*horse radish peroxidase* (HRP)-Konjugat (IBA). Nach dem Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese 30-60 min in 1 x PBS-Puffer (4 mM KH₂PO₄; 16 mM Na₂HPO₄; 115 mM NaCl) mit 3 % BSA und 0,5 % Tween 20 inkubiert. Nach einer Inkubation von 5 min in 1 x PBS wurden 0,25 µl StrepTactin-HRP-Konjugat pro ml Puffer zugesetzt, gefolgt von einer weiteren 30-minütigen Inkubation. Anschließend wurde die Membran 3 mal 5 min mit 1 x PBS-Puffer gewaschen. Danach wurde die Detektion in 1 x PBS-Puffer mit 0,06 % 4-Chloronaphthol, 1 % eiskaltem Ethanol und 0,04 % H₂O₂ durchgeführt. Nachdem die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten, wurde die Reaktion durch intensives Spülen der Membran mit Wasser beendet.

2.6.7 *Gelshift* Experimente

Die intergenen Bereiche der Gene *cbdbA1624-cbdbA1625*, *cbdbA1453-cbdbA1454* und *cbdbA83-cbdbA84* wurden mit den Primerpaaren P1/P2, P1/P3, P4/P5, *cbdbA1453* for/*cbdbA1454* rev und *cbdbA83* for/*cbdbA84* rev (Tab. 8) mit *HotStarTaq* DNA Polymerase (Tab. 9, Tab. 10) bei einer MgCl₂-Konzentration von 3 mM amplifiziert. Die Bindestellen der Primer P1, P2, P3, P4 und P5 in der intergenen Region zwischen *cbdbA1624* und *cbdbA1625* sind in Abb. 6 schematisch dargestellt. Die PCR-Produkte wurden mittels „QIAquick PCR

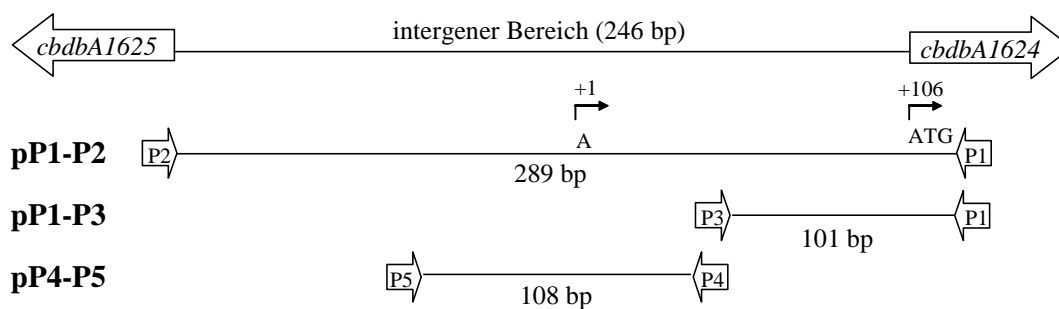


Abb. 6. Schematische Darstellung der DNA-Fragmente, die für die Gelshift Experimente verwendet wurden und die unterschiedliche Teile des intergenen Bereiches der Gene *cdbA1624-cdbA1625* repräsentieren. Die jeweiligen Fragmente wurden an Plasmid-DNA (links neben dem Fragment) amplifiziert. Die Pfeile P1 bis P5 stellen die Primerbindestellen dar.

Purification Kit“ (Kap. 2.5.8) gereinigt, in den Vektor pGEM[®]T-Easy ligiert und in *E. coli* XL1-Blue MRF[™] transformiert. Dabei entstanden die Plasmide pP1-P2, pP1-P3, pP4-P5, pIR-CBDBA84 und pIR-CBDBA1453 (Tab. 3).

Die *templates* für die *Gelshift* Experimente wurden durch Reamplifikation der Inserts der Plasmide pP1-P2, pP1-P3, pP4-P5, pIR-CBDBA84 und pIR-CBDBA1453 (Tab. 3) mit den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Primern erhalten. Die PCR-Produkte wurden mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ (Kap. 2.5.8) gereinigt. Danach wurden jeweils abnehmende Konzentrationen (10 μ M; 3,3 μ M; 1,1 μ M; 0,4 μ M; 0,1 μ M) der Proteine CbdbA1625-Strep_{C-terminal} und CbdbA1625-Strep_{N-terminal} mit 13 bis 18 nM der Ziel-DNA (Amplifikate der intergenen Bereiche der untersuchten *rdhA* Gene) in 1 x Reaktionspuffer (20 % Glycerin; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 2,5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 3 mM DTT, 1 μ g/ μ l Poly(dI-dC)•Poly(dI-dC) (Sigma-Aldrich)) für 30 min bei 24 °C inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 200 μ l. Der Einfluss von Trichlorbenzolen auf die DNA-Protein Interaktion wurde durch Zugabe von 1,2,3-, 1,2,4- oder 1,3,5-TrCB (Endkonzentration je 40 μ M) untersucht.

Zwanzig Mikroliter des Reaktionsansatzes wurden in die Elektrophorese auf einem nicht-denaturierenden 8%igen Polyacrylamidgel in 0,5 x TBE-Puffer (1,78 mM Tris, 1,78 mM Borsäure, 0,04 mM EDTA; pH 8,0) eingesetzt. Das Gel (200x170x1,5 mm) wurde einem 30 minütigen Vorlauf bei 80 V unterzogen. Die Auftrennung erfolgte nach dem Auftragen der Proben bei 120 bis 140 V. Zur Visualisierung der DNA kam der Farbstoff „GelRed[™] Nucleid Acid Stain“ (Biotium Inc., Hayward, USA) zur Anwendung.

2.6.8 Gelfiltration

Vor dem Beladen der Proteinproben auf eine Superdex 75 oder Superdex 200 Säule wurde die Proteinlösung von CbdbA1625-Strep_{C-terminal} 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden NaCl und Glycerin in Endkonzentrationen von 250 mM bzw. 20 % zugegeben. Die Säulen wurden zunächst mit aerobem Puffer S (50 mM Tris, pH 7,5; 250 mM NaCl, 20 % Glycerin) und später mit anaerobem Puffer S_a (Puffer G mit 2 mM DTT) äquilibriert. Die Gelfiltration erfolgte mit dem ÄktaTM Purifier (GE Healthcare, München) und die Auswertung der Daten mit Hilfe der Unicorn 5.1 Software (GE Healthcare).

2.6.9 Isotherme-Titrations-Kalorimetrie (ITC)

Die ITC Experimente wurden bei einer Temperatur von 30 °C an einem VP-ITC Kalorimeter durchgeführt. Nach der Reinigung des Proteins CbdbA1625-Strep_{C-terminal} über StrepTactin Sepharose Säulen wurde es gegen Puffer S_a (Kap. 2.6.8) dialysiert. Die Reaktionszelle wurde mit einer 10 µM-Lösung des dialysierten Proteins befüllt. Die titrierten Liganden 1,2,3- und 1,2,4-TrCB wurden in Konzentrationen von 50 und 120 µM in entgastem Puffer S_a über Nacht bei 30 °C gelöst. Die freigesetzten Wärmemengen wurden im Verlauf von 29 Injektionen à 10 µl bei einer Rührgeschwindigkeit von 307 rpm aufgezeichnet. Die Thermogramme wurden mit der Origin 7.0 Software ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Populationsstruktur von 1,2,3-TrCB dechlorierenden Mischkulturen nach Zugabe verschiedener Kombinationen an Elektronendonatoren und Inhibitoren

Durch Bunge (2004) konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des Elektronenakzeptors über ein Zweiflüssigphasensystem zur Anreicherung von *Dehalococcoides* sp. Stamm DCMB5 führte. Zudem wurden methanogene Archaea durch Zugabe von BES aus der Mischkultur entfernt (Bunge, 2004) und der Anteil grampositiver Bakterien durch Zusatz von Vancomycin verringert (Wagner, 2004). Trotz einer starken Anreicherung von Stamm DCMB5 gelang die Isolierung auf diesem Wege nicht. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit durch Verringerung der Anzahl der verwendeten Elektronendonatoren und Zusatz verschiedener Inhibitoren eine weitere Anreicherung oder gar die Isolierung erzielt werden. Die Dechlorierungsaktivität wurde dabei durch Bestimmung der Chloridkonzentration im Medium analysiert. Die Populationsstruktur wurde nach Amplifikation der 16S rRNA Gene durch RFLP- oder t-RFLP Analysen untersucht und die 16S rRNA Gen-Kopienzahl durch quantitative PCR bestimmt.

3.1.1 Erstellung von 16S rDNA Klonbibliotheken zur Identifikation weiterer t-RFLP Muster

Stamm DCMB5-haltige Mischkulturen, die 1,2,4-TrCDD zu 2-MCDD dechlorierten (Wagner, 2004), dienten als Inokulum für drei weitere Transfers auf 1,2,4-TrCDD (Spit 5, 6, 7) und zwei folgende Transfers mit 1,2,3-TrCB (Spit 8, 9; Tab. 4). Während der Zusatz von 1,2,4-TrCDD in Konzentrationen von 40 µM erfolgte, wurde 1,2,3-TrCB in einer nominalen Endkonzentration im Medium von 10 mM über ein Zweiflüssigphasensystem zugeführt. Die t-RFLP Analysen an DNA aus den entsprechenden Kulturen ergaben einige terminale Restriktionsfragmente (t-RFs), die keinem bekannten 16S rRNA Gen aus den vorhandenen Klonbibliotheken zugeordnet werden konnten. Deshalb wurden erneut RFLP-Analysen mit 16S rDNA-PCR-Produkten, die an DNA der Mischkulturen Spit 5 und Spit 9-4B (Tab. 4) amplifiziert und kloniert wurden, durchgeführt.

In beiden Kulturen wurden zusätzlich zu einigen der 30 bekannten RFLP-Muster (Wagner, 2004) insgesamt sieben neue Restriktionsmuster (Muster 33-39) identifiziert (Tab. 13, 14). Die Klonbibliotheken umfassten für Spit 5 46 Klone und für Spit 9-4B 28 Klone. Von allen Mustern wurde je ein Klon ausgewählt und das Insert der entsprechenden Plasmide mit den vektorspezifischen Primern PG1/PG2 (Tab. 8) ansequenziert.

In Gegenwart von 1,2,4-TrCDD wurde die Kultur Spit 5 von drei, überwiegend gärenden phylogenetischen Gruppen dominiert: grampositiven Bakterien (50 %), *Spirochaetes* (21,7 %) und Deltaproteobakterien (15,2 %, Tab. 13). Der Anteil von *Dehalococcoides* sp. lag hingegen unter der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu besaß *Dehalococcoides* sp. den höchsten Anteil in der Mischkultur Spit 9-4B (61 %), die mit 1,2,3-TrCB im Zweiflüssigphasensystem angezogen wurde (Tab. 14). Obwohl neben *Dehalococcoides* sp. auch *Clostridia* und eine *Desulfomicrobium* Spezies zu finden waren (Tab. 14), war diese Kultur ein geeigneter Kandidat für weitere Versuche zur Anreicherung von Bakterium DCMB5. Die in den Kulturen Spit 5 und Spit 9-4B identifizierte *Dehalococcoides* 16S rRNA Gensequenz wies eine 100 % Identität zu der des Stammes CBDB1 auf.

Um die neu identifizierten RFLP-Muster spezifischen t-RFs zuordnen zu können, wurden die vorliegenden Sequenzen durch theoretischen Verdau mit der Software „Clone“ unter Verwendung der Restriktionsenzyme MspI, RsaI, AluI und BsuRI analysiert (Tab. 13, 14).

Tab. 13. In der 16S rDNA Klonbibliothek der Kultur Spit 5 identifizierte RFLP-Muster, die Zuordnung der entsprechenden Bakterien zu den phylogenetisch nächst verwandten kultivierten Organismen und die ermittelten theoretischen t-RFs. Die Präparation der DNA erfolgte nach 49-tägiger Kultivierung mit 40 µM 1,2,4-TrCDD.

Muster (Klon)	Anteil in der Klonbibliothek	Höchste 16S rRNA Gen-Ähnlichkeit zu einem kultivierten Organismus	% Identität	Terminales Fragment [bp]			
				MspI	RsaI	AluI	BsuRI
34 (Spit 5-2/4)	2,2 %	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM2379 (X70954)	98	508	242	71	204
35 (Spit 5-2/11)	8,7 %	<i>Desulfovibrio</i> sp. clone B4 (AY133797)	99	162	487	214	201
37 (Spit 5-3/28)	15,2 %	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> (AF067964)	97	133	168	215	201
38 (Spit 5-3/47)	2,2 %	<i>Trichlorobacter thiogenes</i> (AF223382)	95	163	242	71	206
33 (Spit 5-9/4)	50,0 %	Bacterium DCE29 (AJ249260)	97	200	444	75	275
36 (Spit 5-2/30)	21,7 %	Bacterium DCE25 (AJ249227)	98	123	197	238	76

Tab. 14. Identifizierte 16S rRNA Gensequenzen in der Klonbibliothek der Kultur Spit 9-4B und die Zuordnung der entsprechenden Bakterien zu den phylogenetisch nächst verwandten kultivierten Organismen. Die Isolierung der DNA aus den mit 1,2,3-TrCB versetzten Zweiflüssigphasenkulturen (nominale TrCB-Konzentration in Medium: 10 mM) erfolgte nach 93 Tagen.

Muster (Klon)	Anteil in der Klonbibliothek	Höchste 16S rRNA Gen-Ähnlichkeit zu einem kultivierten Organismus	% Identität	Terminales Fragment [bp]			
				MspI	RsaI	AluI	BsuRI
21 (Spit 3-2/34)	25 %	<i>Clostridium akagii</i> (AJ237755)	93	520	451	237	257
39 (Spit 9-4B-13)	14,2 %	<i>Desulfomicrobium escambiense</i> (AJ277886)	93	162	58	155	76
5 (Spit 3-2/10)	60,8 %	<i>Dehalococcoides</i> sp. (AF230641)	99	509	443	131	168

3.1.2 Einfluss verschiedener Kombinationen an Elektronendonatoren auf die Dechlorierungsaktivität und die Populationsstruktur von 1,2,3-Trichlorbenzol-dechlorierenden Mischkulturen

Die Isolierung des Stammes DCMB5 wurde möglicherweise durch den Einsatz von Pyruvat, Fumarat, Formiat und Benzoat als Elektronendonatoren in vorangegangenen Arbeiten erschwert, da sie das Wachstum von gärenden Bakterien förderten, aber für *Dehalococcoides* bisher nicht als Elektronendonatoren für die reduktive Dechlorierung beschrieben wurden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert, ob die Verringerung der Zahl der Elektronendonatoren zu einer weiteren Anreicherung des Stammes DCMB5 führte. Die Wirkung von Benzoat wurde nicht mehr untersucht, da sich schon früher gezeigt hatte, dass es nach Zugabe von BES in den Stamm DCMB5 enthaltende Mischkulturen nicht umgesetzt wurde (Wagner, 2004). Folgende Kombinationen an Elektronendonatoren wurden näher betrachtet: I) Formiat, II) Formiat, Wasserstoff, III) Fumarat, IV) Pyruvat und V) Pyruvat, Fumarat. Als Vergleich diente eine Kulturreihe, die mit einem Gemisch aller drei organischen Säuren (Variante VI) versetzt wurde. Die Zweiflüssigphasenkulturen mit 1,2,3-TrCB wurden mit 2,5 mM Acetat, je 1,25 mM organischer Säure und 5 mM BES vervollständigt. Im Falle der zusätzlichen Wasserstoffzugabe wurde der Gasraum der Kulturen unter Erzeugung eines Überdrucks von 0,5 bar begast. Als Inokulum diente die Kultur Spit 9-4B (Tab. 4). Je Kulturvariante wurden zwei bis drei parallele Kulturen beimpft. Die Kontrollen ohne 1,2,3-TrCB waren Einzelansätze.

Die Dechlorierung startete je nach verwendeter Kombination der organischen Säuren zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Während die Chloridfreisetzung der Kulturvarianten III, IV, V und VI nach 28 Tagen begonnen hatte und über den Versuchsverlauf kontinuierlich zunahm, begann die Dechlorierung in Variante II erst nach 42 Tagen und in Variante I sogar erst gegen Ende des Versuches nach 84 Tagen (Abb. 7). Die Dechlorierung in den Varianten III, IV, V und VI zeigte insgesamt einen ähnlichen Verlauf. Nach 98 Tagen wurden im Durchschnitt 1,3 mM, 1,8 mM, 1,8 mM und 2,2 mM Chlorid detektiert. In den Kulturvarianten I und II kam es nur zur Bildung von 0,5 bzw. 0,8 mM Chlorid.

Die Dechlorierung von 1,2,3-TrCB zu 1,3-DCB, welches gaschromatographisch nachgewiesen wurde, war mit einer Zunahme der Kopienzahl von *Dehalococcoides* 16S rRNA Genen verbunden (Tab. 15). Die 16S rRNA Gen-Kopienzahl nahm in den verschiedenen Kulturvarianten um ein bis zwei Zehnerpotenzen zu und erreichte nach 98

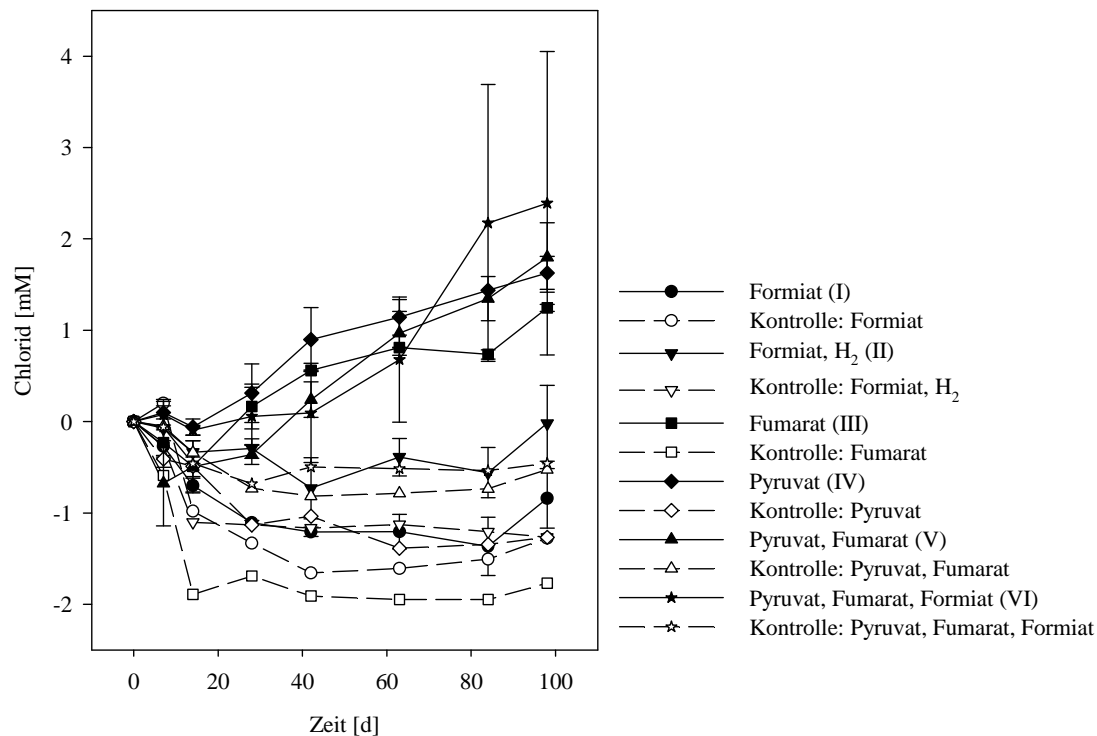


Abb. 7. Chloridfreisetzung während der reduktiven Dechlorierung von 1,2,3-TrCB in Zweiflüssigphasenkulturen mit BES, Acetat und verschiedenen Kombinationen der Elektronendonatoren (Pyruvat, Fumarat, Formiat, Wasserstoff). Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammten aus der Analyse von zwei bis drei parallelen Kulturen. Die Kontrollkulturen (ohne 1,2,3-TrCB) stellten Einzelansätze dar. Die Chloridwerte waren die Messwerte abzüglich des Nullwertes.

Tagen Werte zwischen 4×10^7 und $1,26 \times 10^8$ 16S rRNA Genkopien/ml (Tab. 15). Im Gegensatz zu dem Anstieg der 16S rRNA Gen-Kopienzahl in Kulturen mit 1,2,3-TrCB blieb diese weitgehend konstant (Variante I und II) oder sank (Variante III-VI) in den Kontrollkulturen ohne 1,2,3-TrCB (Tab. 15). Ausgehend von einer 16S rRNA Genkopie im Genom von *Dehalococcoides* sp. (Kube *et al.*, 2005) wurden die Erträge (Zellen/ μmol Chlorid) für Stamm DCMB5 nach Wachstum auf 1,2,3-TrCB berechnet. Die Zunahme der Zellzahl wurde dabei aus der Differenz der 16S rRNA Genkopienzahl nach 98-tägiger Kultivierung und zum Zeitpunkt 0 bestimmt. Die Menge an freigesetztem Chlorid stellte die Differenz der maximalen Chloridkonzentration abzüglich des geringsten Wertes dar. Die Werte lagen zwischen $3,6 \times 10^7$ und $1,3 \times 10^8$ Zellen pro μmol freigesetztem Chlorid (Tab. 15). Die Berechnung des Ertrages für die Varianten I und II gestaltete sich schwierig, da die Chloridfreisetzung unstetig verlief (Variante II) oder erst nach 84 Tagen begann (Variante I, Abb. 7).

Der Anteil von *Dehalococcoides* sp. an der gesamten Bakterienpopulation wurde mittels t-RFLP und qPCR bestimmt (Tab. 15). Die aus den t-RFLP Analysen ermittelte Peakfläche des *Dehalococcoides*-t-RF wurde ins Verhältnis zur Gesamtpeakfläche gesetzt. Für die

Tab. 15. 16S rRNA-Gen-Kopienzahl von *Dehalococcoides*/ml, Anteil von *Dehalococcoides* an der gesamten Bakterienpopulation und die *Dehalococcoides* spezifischen Wachstumserträge in Kulturen mit 1,2,3-TrCB sowie verschiedenen Kombinationen an Elektronendonatoren. Der Anteil wurde berechnet aus dem Verhältnis der Peakfläche des *Dehalococcoides* t-RF zu der Gesamtpeakfläche in t-RFLP Profilen (AluI-Verdau) bzw. aus dem Verhältnis der *Dehalococcoides* 16S rRNA-Gen-Kopienzahl zu der *Bacteria* 16S rRNA Gen-Kopienzahl (qPCR). Die Erträge wurden ermittelt aus dem Quotienten der Erträge der Kopienzahl des *Dehalococcoides* 16S rRNA Gens und der Chloridfreisetzung. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben für 2 oder 3 parallele Kulturen. Die Werte der Kontrollen (ohne 1,2,3-TrCB) und der t-RFLP Analyse nach 14 d basieren auf der Aufarbeitung einer Kultur.

Zeit [d]	0		14		98		Ertrag [16S rRNA Genkopien /μmol Chlorid]	
	16S rRNA Gen- kopienzahl/ml (10 ⁶ /ml)	16S rRNA Gen- kopienzahl/ml (10 ⁶ /ml)	Anteil Stamm DCMB5 [%]		16S rRNA Gen- kopienzahl/ml (10 ⁶ /ml)	Anteil Stamm DCMB5 [%]		
			qPCR	t-RFLP		qPCR		t-RFLP
Formiat (I)	2,51 [+/- 0,14]	2,12 [+/- 0,53]	1,3 [+/- 0,5]	3,1	43,2 [+/- 5,94]	17,2 [+/- 12]	11,5 [+/- 0,1]	7,73 x 10 ⁷
Kontrolle	0,31	0,28	0,6	2,6	0,35	6,5	1,5	
Formiat/H ₂ (II)	2,75 [+/- 0]	4,63 [+/- 0,65]	3,8 [+/- 1,5]	7,5	72,7 [+/- 1,69]	15,4 [+/- 0,6]	9,0 [+/- 2,5]	12,9 x 10 ⁷
Kontrolle	1,57	1,26	4,0	2,8	0,97	3,8	1,7	
Fumarat (III)	2,01 [+/- 1,90]	4,02 [+/- 0,62]	3,1 [+/- 0,9]	4,9	64,5 [+/- 1,45]	16,2 [+/- 3]	8,7 [+/- 1,4]	3,6 x 10 ⁷
Kontrolle	2,47	1,86	0,4	0,6	0,43	1,9	0,4	
Pyruvat (IV)	4,24 [+/- 0,3]	9,66 [+/- 0,85]	5,5 [+/- 4,4]	1,9	112 [+/- 39,4]	20,2 [+/- 4,5]	18,0 [+/- 2,7]	6,38 x 10 ⁷
Kontrolle	1,94	0,63	0,4	5,0	0,3	3,5	3,2	
Pyruvat/Fumarat (V)	2,30 [+/- 1,10]	8,08 [+/- 2,80]	3,2 [+/- 1,3]	3,2	126 [+/- 50,6]	14,8 [+/- 5,8]	10,9 [+/- 0,3]	4,99 x 10 ⁷
Kontrolle	2,22	4,29	0,3	1,6	0,34	1,5	0,3	
Pyruvat/Fumarat/ Formiat (VI)	2,20 [+/- 1,05]	6,80 [+/- 0,48]	7,0 [+/- 4]	5,1 [+/- 1]	64,9 [+/- 4,07]	35,8 [+/- 2]	28,2 [+/- 13]	3,60 x 10 ⁷
Kontrolle	6,56	1,39	2	2	1,50	1	2	

^aAlle Kulturen wurden mit 2,5 mM Acetat als putative Kohlenstoffquelle und 5 mM BES versetzt. H₂: Der Gasraum der Kultur wurde mit Wasserstoff begast, so dass ein Überdruck von 0,5 bar entstand.

Berechnung des Anteils durch qPCR Analysen wurde sowohl die Kopienzahl des 16S rRNA Gens von *Dehalococcoides* sp. mit den Primern DET-539f/DET-730r (Tab. 8) als auch die bakterielle 16S rRNA Genkopienzahl mit den Primern Eub241 f/Eub534 r (Tab. 8) bestimmt. Aus dem Verhältnis beider Werte wurde anschließend der prozentuale Anteil von *Dehalococcoides* sp. ermittelt. Nach qPCR und t-RFLP Analysen zeigte sich ein Anstieg des Anteils von *Dehalococcoides* sp. zwischen Beginn der Dechlorierung (14 d) und Ende des Versuchs (98 d) in den Kulturen mit 1,2,3-TrCB. Die erhaltenen Werte unterschieden sich jedoch leicht je nach verwendeter Methode (qPCR oder t-RFLP). Der Anteil von *Dehalococcoides*, der durch t-RFLP Analyse bestimmt wurde, war in der Regel niedriger als nach der Bestimmung mittels qPCR. Mit qPCR konnte nach 98 Tagen eine Anreicherung im Bereich von 15 % (Variante V) bis 36 % (Variante VI) verzeichnet werden, während sich mit t-RFLP Werte zwischen 9 % (Varianten II und III) und 28 % (Variante VI) ergaben (Tab. 15). In den Kontrollkulturen ohne 1,2,3-TrCB blieb der Anteil von *Dehalococcoides* sp. konstant niedrig und lag zwischen 1 und 6,5 %.

Zum Zeitpunkt 0 des Versuches wurde mit den beiden genutzten Methoden ein unrealistisch hoher Anteil von *Dehalococcoides* sp. (z.T. über 100 %; nicht gezeigt) ermittelt, was zum einen auf methodische Probleme beim Zellaufschluss oder der PCR-Amplifikation und zum anderen auf einen hohen Anreicherungsgrad in der Vorkultur hinwies.

Die Populationsstruktur, die mittels t-RFLP Analyse nach 98 tägiger Kultivierung untersucht wurde, unterschied sich in den sechs Kulturvarianten deutlich (Abb. 8). Die t-RFs wurden entsprechend dem RFLP-Muster der in den Tab. 11, 13 und 14 angegebenen Sequenzen bezeichnet. Muster 5, das den *Dehalococcoides* Stamm DCMB5 repräsentierte, war stets eines der dominanten Muster, wobei auch folgende Muster in den entsprechenden Varianten verstärkt auftraten (grau unterlegt: größte Häufigkeit): I) Muster 13, 35, 37; II) Muster 3, 13, 27, 29; III) Muster 12, 13, 18, 20, 21, 27, 29; IV) Muster 33; V) Muster 12, 18, 20, 21, 29. Die Zuordnung der Muster 12, 18, 20 und 21 zu den Peaks um 240 bp erfolgte durch die Analyse der t-RFLP Profile nach Verdau mit MspI, RsaI und BsuRI (Anhang 1). In der Kulturvariante VI wurden neben dem hier klar dominierenden Muster 5 zusätzlich die Muster 3, 12, 18, 20, 21, 27, 29, 33 und 39 identifiziert.

Auf der Basis der Klonbibliotheken von Bunge (2004), Wagner (2004) und dieser Arbeit (Tab. 11, 13, 14) wurden die neben *Dehalococcoides* sp. dominanten Phylotypen aller sechs Kulturvarianten *Clostridium hastiforme* (Muster 13), Bakterium ROME195Aa (Muster 27), Bakterium IIB-29 (Muster 29) und Bakterium DCE29 (Muster 33) zugeordnet.

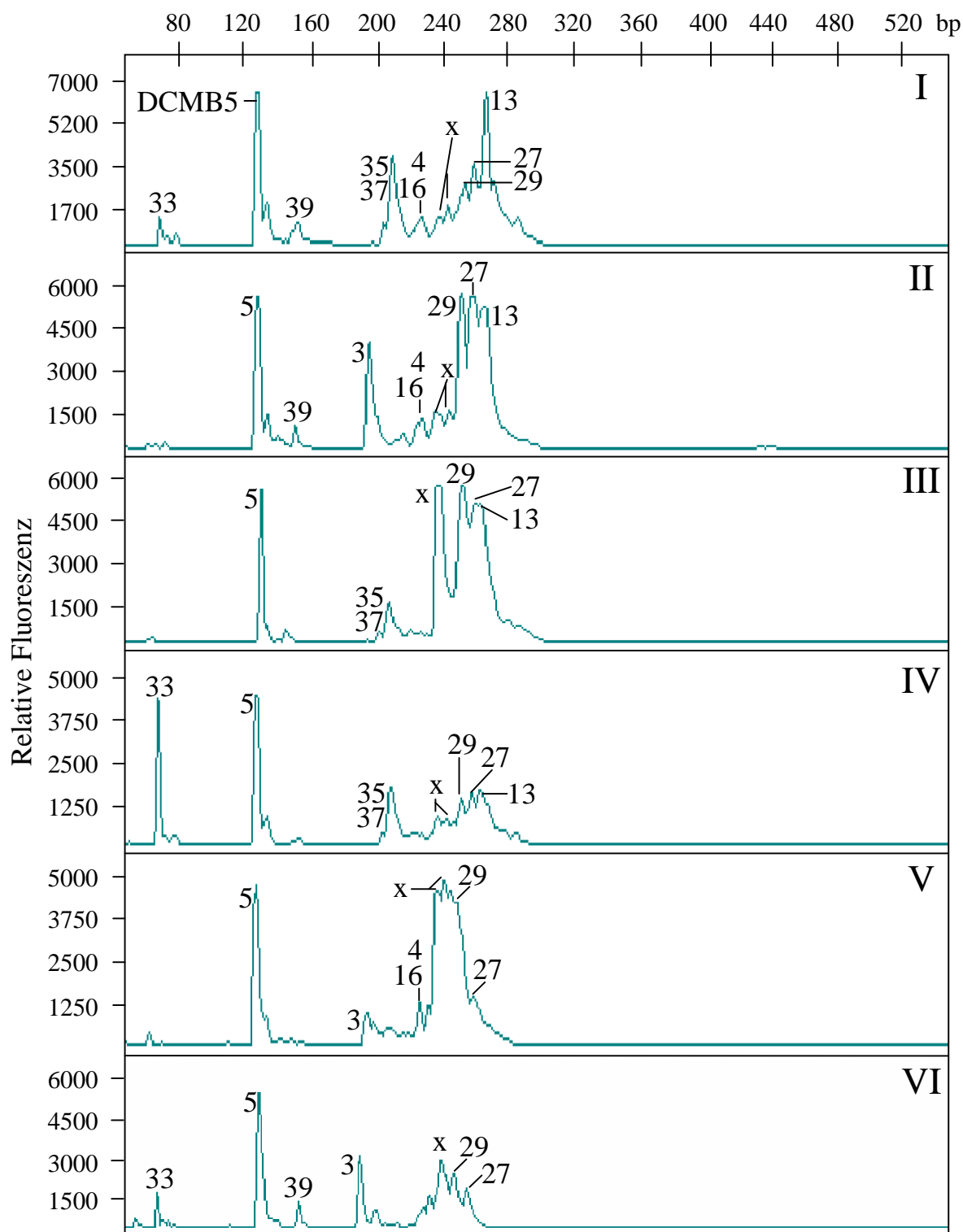


Abb. 8. T-RFLP Profile nach AluI-Verdau der amplifizierten 16S rRNA Gene aus Mischkulturen mit 1,2,3-TrCB, BES, Acetat und verschiedenen Elektronendonatoren. Die DNA wurde nach 98-tägiger Kultivierung isoliert. Die Zuordnung der t-RF's zu bestimmten Mustern erfolgte nach dem theoretischen Verdau der 16S rRNA-Gensequenzen (Tab. 11, 13, 14). Durch den Vergleich mit t-RFLP Profilen nach MspI, RsaI und BsuRI Verdau (Anhang 1), konnte der Peak um 240 bp (x) näher aufgelöst und den Mustern 12, 18, 20 und 21 zugeordnet werden. Elektronendonatoren: Formiat (I), Formiat, H₂ (II), Fumarat (III), Pyruvat (IV), Pyruvat, Fumarat (V), Pyruvat, Fumarat, Formiat (VI).

Die Populationstruktur in den Kontrollkulturen ohne 1,2,3-TrCB (Anhang 2) entsprach grundsätzlich den jeweiligen Kulturvarianten mit 1,2,3-TrCB, wobei das *Dehalococcoides*-spezifische t-RF einen wesentlich geringeren Anteil besaß und im Verlauf des Versuchs konstant blieb (Tab. 15).

Es zeigte sich, dass eine Verringerung der Zahl der verwendeten organischen Säuren nicht zur Anreicherung von Stamm DCMB5 führte. Der Anteil von Stamm DCMB5 war im Gegenteil um das zwei- bis dreifache geringer als in der Kulturvariante mit Pyruvat, Fumarat und Formiat. Zudem ergab die Verwendung von Formiat oder Formiat/Wasserstoff verringerte Dechlorierungsaktivitäten.

3.1.3 Einfluss von Wasserstoff und Inhibitoren auf die Dechlorierungsaktivität und die Populationsstruktur in 1,2,3-Trichlorbenzol-dechlorierenden Mischkulturen

Da die Verringerung der Zahl der Elektronendonatoren nicht zu einer Anreicherung des Stammes DCMB5 führte, wurde unter Nutzung der Elektronendonatoren Pyruvat, Fumarat, Formiat und Wasserstoff der Einfluss der Inhibitoren Vancomycin und Penicillin näher untersucht. Es wurden drei verschiedene Varianten angesetzt. In den ersten beiden Varianten dienten Pyruvat, Fumarat, Formiat und Wasserstoff als Elektronendonatoren. Variante A wurde zudem mit 5 mg/l Vancomycin und Variante B mit 5 mg/l Penicillin versetzt. Um *Dehalococcoides* sp. spezifisch zu selektieren, wurde in der Kulturvariante C Wasserstoff als Elektronendonator verwendet und Vancomycin als Inhibitor in einer Endkonzentration von 5 mg/l zugegeben. Die Zweiflüssigphasenkulturen mit 1,2,3-TrCB wurden mit 2,5 mM Acetat, je 1,25 mM organischer Säure und 5 mM BES vervollständigt. Bei Zugabe von Wasserstoff wurde der Gasraum unter Erzeugung eines Überdrucks von 0,5 bar begast. Als Inokulum diente die Kultur Spit 9-2B (Tab. 4). Je Kulturvariante wurden zwei parallele Kulturen beimpft. Die Kontrollen ohne 1,2,3-TrCB waren Einzelansätze.

In den drei Kulturvarianten begann die Dechlorierung von 1,2,3-TrCB innerhalb von 7 (Variante C) oder spätestens 28 Tagen (Variante A und B), wobei die Menge an freigesetztem Chlorid über die Zeit zunahm (Abb. 9). Die Bildung von Chlorid zeigte in allen drei Kulturvarianten einen ähnlichen Verlauf. Während der Kultivierungszeit (98 Tage) wurden ca. 2,4 mM Chlorid freigesetzt. In den Kontrollkulturen ohne 1,2,3-TrCB wurde keine Chloridbildung beobachtet (Abb. 9).

Die Konzentration an freigesetztem Chlorid korrelierte mit der Zunahme der *Dehalococcoides* spezifischen 16S rRNA Gen-Kopienzahl. Die Kopienzahl des 16S rRNA Gens von

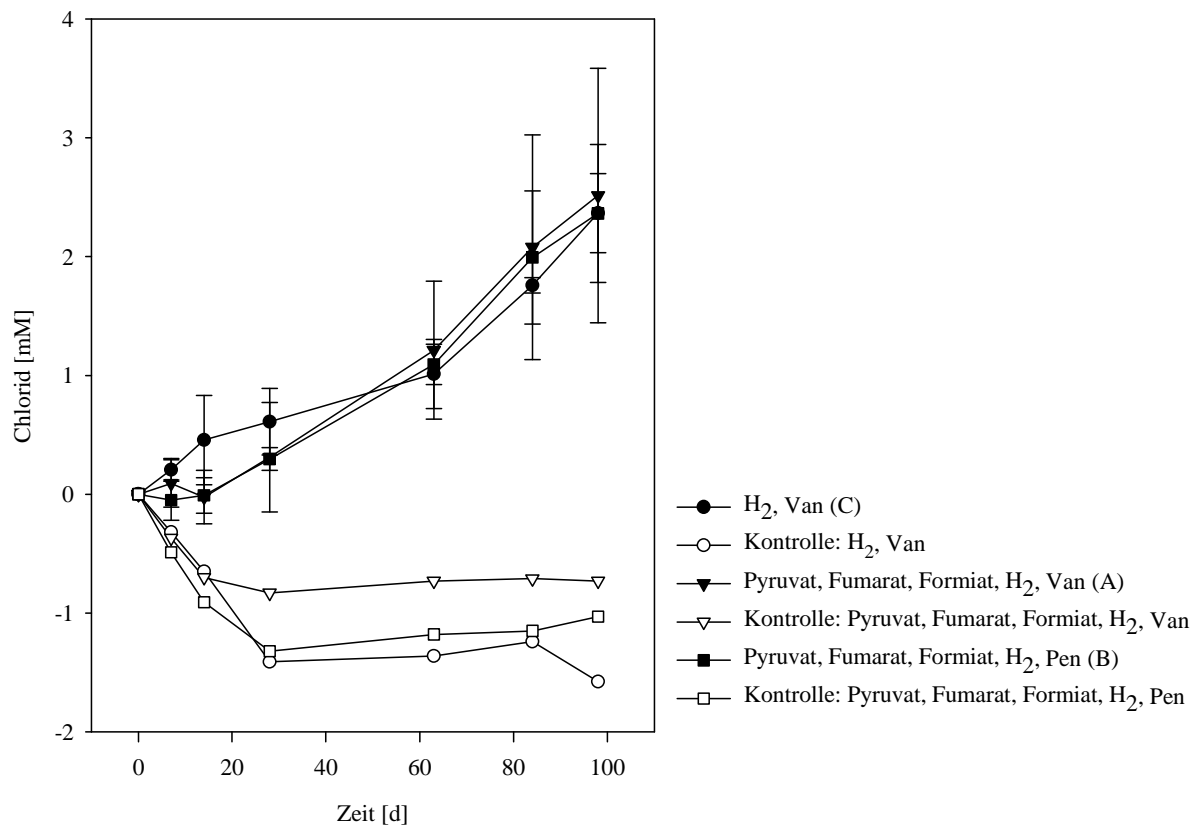


Abb. 9. Chloridfreisetzung während der reduktiven Dechlorierung von 1,2,3-TrCB in Zweiflüssigphasenkulturen mit BES, Acetat, verschiedenen Elektronendonatoren (Pyruvat, Fumarat, Formiat, Wasserstoff) und Inhibitoren (Vancomycin oder Penicillin). Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammten aus der Analyse paralleler Kulturen. Die Kontrollkulturen (ohne 1,2,3-TrCB) stellten Einzelansätze dar. Die Chloridwerte waren die Messwerte abzüglich des Nullwertes dar.

Dehalococcoides stieg dabei auf Werte von 9×10^7 , 4×10^7 und 3×10^7 in den Kulturvarianten A, B und C (Tab. 16). Das entspricht einer Zunahme der 16S rRNA Genkopienzahl um den Faktor 10 in Variante C und um den Faktor 40 in den Varianten A und B. In den Kontrollen ohne 1,2,3-TrCB sank die 16S rRNA Genkopienzahl im Laufe der Kultivierung hingegen um bis zu einer Zehnerpotenz ab (Tab. 16).

Aus der 16S rRNA Genkopienzahl und der Menge an freigesetztem Chlorid wurde außerdem der Wachstumsertrag mit 1,2,3-TrCB unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen bestimmt (Tab. 16). Die errechneten Werte lagen zwischen 2×10^7 (Variante B) und rund $3,5 \times 10^7$ (Varianten A und C) 16S rRNA Genkopien pro μmol freigesetztem Chlorid.

Der Anteil von *Dehalococcoides* in den Kulturvarianten wurde mittels t-RFLP und qPCR gemäß der in Kap. 3.1.2 beschriebenen Vorgehensweise bestimmt. Mit beiden Methoden wurde eine signifikante Anreicherung von *Dehalococcoides* verzeichnet. Die t-RFLP Analyse ergab nach 98-tägiger Kultivierung einen Anteil von *Dehalococcoides* von 37 %, 48 % und 28 % in den Kulturvarianten A, B und C. Dabei muss betont werden, dass die Kulturvariante mit

Tab. 16. 16S rRNA-Gen-Kopienzahl von *Dehalococcoides*/ml, Anteil von *Dehalococcoides* an der gesamten Bakterienpopulation und die *Dehalococcoides* spezifischen Wachstumserträge bei einer Kultivierung mit 1,2,3-TrCB. Die Kulturen wurden versetzt mit verschiedenen Elektronendonatoren und Inhibitoren. Der prozentuale Anteil wurde berechnet aus dem Verhältnis der Peakfläche des *Dehalococcoides* t-RF zu der Gesamtpeakfläche in t-RFLP Profilen (AluI-Verdau) oder aus dem Verhältnis der *Dehalococcoides* 16S rRNA-Gen-Kopienzahl zu der *Bacteria* 16S rRNA Gen-Kopienzahl (qPCR). Die Erträge wurden ermittelt aus dem Quotienten der Erträge der Kopienzahl des *Dehalococcoides* 16S rRNA Gens und der Chloridfreisetzung. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben für 2 oder 3 parallele Kulturen. Die Kontrollen (ohne TrCB) waren Einzelkulturen.

Zeit [d]		0	14			98			Ertrag (16S rRNA Genkopienzahl/ μmol Chlorid)
Elektronendonora (Kulturvariante)	Inhibitor	16S rRNA Genkopienzahl (10 ⁶)/ml	16S rRNA Gen- kopienzahl (10 ⁶)/ml	Anteil Stamm DCMB5 [%]		16S rRNA Gen- kopienzahl (10 ⁶)/ml	Anteil Stamm DCMB5 [%]		
				qPCR	t-RFLP		qPCR	t-RFLP	
H ₂ (C)	Van	2,30 [+/- 0,11]	9,16 [+/- 4,75]	22,0 [+/- 14,5]	11,0 [+/- 2,0]	31,6 [+/- 10,8]	25,0 [+/- 5,0]	28,5 [+/- 0,5]	3,50 x 10 ⁷
Kontrolle		4,11	1,24	1,9	4,0	0,43	3,0	7,0	
Pyruvat/Fumarat/ Formiat/H ₂ (A)	Van	2,03 [+/- 0,62]	2,16 [+/- 0,003]	2,1 [+/- 0,6]	3,5 [+/- 0,5]	86,2 [+/- 22,8]	40,0 [+/- 24,0]	37,0 [+/- 8,0]	3,60 x 10 ⁷
Kontrolle		2,94	0,91	1,0	0,4	0,93	1,0	6,0	
Pyruvat/Fumarat/ Formiat/H ₂ (B)	Pen	1,12 [+/- 0,46]	3,14 [+/- 0,28]	9,7 [+/- 5,4]	7,5 [+/- 2,5]	41,3 [+/- 23,1]	40,0 [+/- 7,0]	47,5 [+/- 2,5]	1,97 x 10 ⁷
Kontrolle		1,09	0,39	1,1	1,0	4,18	5,0	7,0	

^a Alle Kulturen wurden mit 2,5 mM Acetat als putative Kohlenstoffquelle und 5 mM BES versetzt. H₂: Der Gasraum der Kultur wurde mit Wasserstoff begast, so dass ein Überdruck von 0,5 bar entstand. Vancomycin und Penicillin wurden in Endkonzentrationen von 5 mg/l zugegeben.

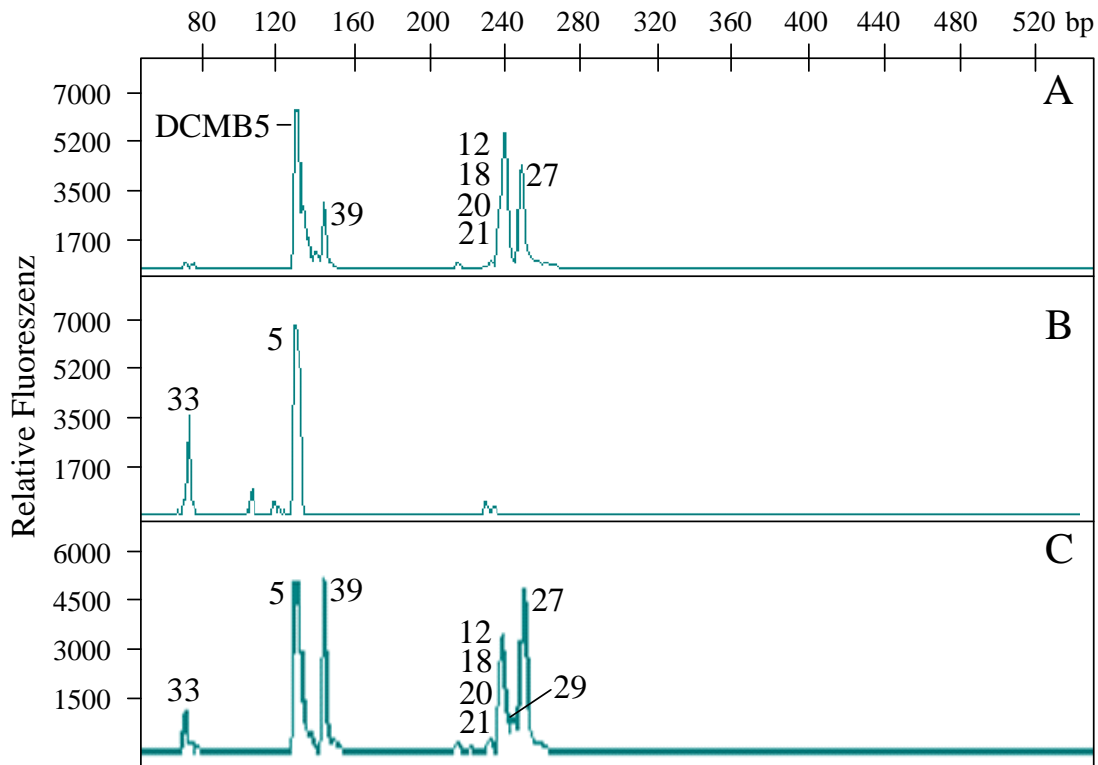


Abb. 10. T-RFLP Profile eines AluI-Verdau der amplifizierten 16S rRNA Gene aus Mischkulturen mit 1,2,3-TrCB, BES, Acetat, verschiedenen Elektronendonatoren und Inhibitoren. Die DNA wurde nach 98-tägiger Kultivierung isoliert. Die Zuordnung der t-RFs zu bestimmten Mustern erfolgte durch den Vergleich mit den theoretischen terminalen Fragmentlängen der klonierten 16S rRNA Gene (Tab. 11, 13, 14). Durch den Vergleich mit t-RFLP Profilen nach MspI, RsaI und BsuRI Verdau (Anhang 1), konnte der Peak um 240 bp näher aufgelöst und den angegebenen Mustern zugeordnet werden. A: Elektronendonatoren: Pyruvat, Fumarat, Formiat, H₂, Inhibitor: 5 mg/l Vancomycin; B: Elektronendonatoren: Pyruvat, Fumarat, Formiat, H₂, Inhibitor: 5 mg/l Penicillin; C: Elektronendonator: H₂, Inhibitor: 5 mg/l Vancomycin.

Wasserstoff und Vancomycin (Variante C) trotz der an die Lebensweise von *Dehalococcoides* angepassten Bedingungen zur geringsten Anreicherung geführt hat. In den Kontrollkulturen ohne 1,2,3-TrCB blieb der Anteil von *Dehalococcoides* in den Kulturen konstant niedrig und lag bei ca. 1 bis 7 % (Tab. 16).

Die Analyse der Populationsstruktur in den drei Kulturvarianten ergab eine starke Ähnlichkeit zwischen den Varianten A und C (Abb. 10 A, C; beide mit Vancomycin inkubiert). In beiden Ansätzen war das *Dehalococcoides* spezifische Fragment eines der dominanten. Zudem wurden die Muster 12, 18, 20, 21, 27 und 39 den entsprechenden t-RFs zugeordnet. Die t-RFLP Chromatogramme unterschieden sich nur durch das Auftreten der Muster 29 und 33 in Kulturvariante C. Die Auflösung des Peaks um 240 bp (Abb. 10 A, C) erfolgte durch Analyse der entsprechenden t-RFLP Profile nach MspI, RsaI und BsuRI Verdau (Anhang 1). Die Muster 12, 21 und 27 repräsentieren die 16S rRNA Gensequenzen grampositiver Bakterien (Tab. 11). Das Auftreten dieser Muster in den Varianten A und C war erstaunlich,

da Vancomycin, ein Inhibitor grampositiver Bakterien, dem Kulturmedium zugesetzt worden war. In der Kulturvariante B, in der Penicillin anstelle von Vancomycin verwendet wurde, war die Zahl der auftretenden t-RFs geringer als in den Varianten A und C (Abb. 10 B). Neben dem *Dehalococcoides* spezifischen t-RFs wurde nur ein weiteres dominantes t-RF detektiert, welches Muster 33 entsprach. Die entsprechende 16S rRNA Gensequenz zeigte größte Ähnlichkeit zu Sequenzen des Phylums *Deferribacteres* mit *Synergistes* sp. Durch Zugabe von Penicillin, das ebenfalls das Wachstum grampositiver Bakterien hemmt, konnte der Anteil der Grampositiven signifikant verringert werden.

In den Kontrollkulturen ohne 1,2,3-TrCB ähnelte die Populationsstruktur der Zusammensetzung der vergleichbaren Kulturen mit 1,2,3-TrCB, der Anteil des *Dehalococcoides* spezifischen t-RF war jedoch bei gleichzeitiger Zunahme des Anteils anderer Muster geringer (Anhang 3).

Die Kultivierung der Mischkulturen im Zweiflüssigphasensystem mit 1,2,3-TrCB und der Einsatz von Vancomycin oder Penicillin bei gleichzeitiger Nutzung eines Gemisches organischer Säuren in Kombination mit Wasserstoff als Elektronendonatoren bildeten die Grundlage für die Isolierung des Stammes DCMB5 (Bunge *et al.*, 2008).

3.2 Abgrenzung des *Dehalococcoides* sp. Stammes DCMB5 von Stamm CBDB1

Die Stämme DCMB5 und CBDB1 sind auf 16S rDNA Ebene identisch (Bunge, 2004). Um eventuelle genetische Unterschiede zwischen beiden Stämmen herauszufinden, wurden zum einen die 16S rDNA flankierenden Bereiche im Genom von Stamm DCMB5 mittels Vektorette-PCR näher charakterisiert. Zum anderen wurden putative Gene für reduktive Dehalogenasen des Stammes DCMB5 unter Nutzung von RFLP, t-RFLP und Sequenzanalysen identifiziert und mit denen anderer *Dehalococcoides* Stämme verglichen.

3.2.1 Charakterisierung der DNA-Bereiche, die das 16S rRNA Gen des Stammes DCMB5 *up-* und *downstream* flankieren

In der vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzen *upstream* (5'-Bereich) und *downstream* (3'-Bereich) des 16S rRNA Gens mit Hilfe der Vektorette-PCR untersucht. Die Methode schien geeignet, da sich nach Analyse der Genomsequenzen der Stämme CBDB1 (Kube *et al.*, 2005) und BAV1 zeigte, dass es bei 100 % identischen 16S rRNA Gensequenzen geringe Unterschiede in den flankierenden Sequenzbereichen gab.

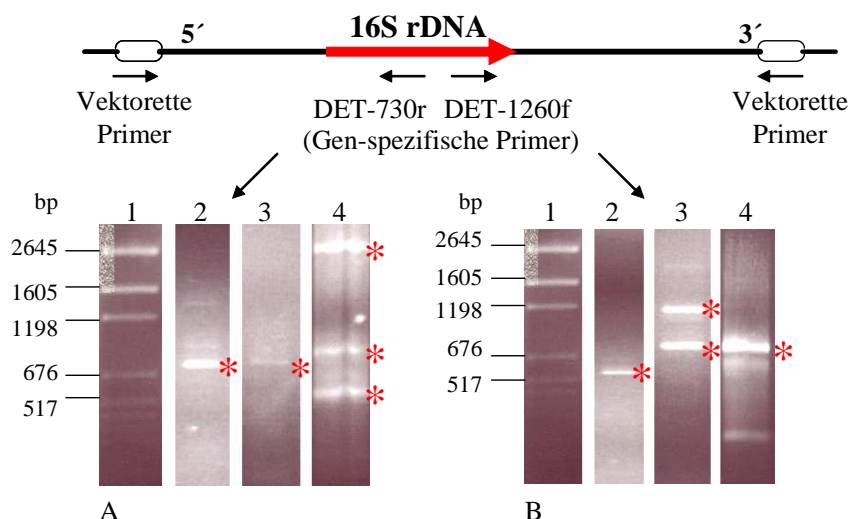


Abb. 11. PCR-Produkte nach Amplifikation mit den Primerpaaren DET-730r/UV-verkürzt (A) bzw. DET-1260f/UV-verkürzt (B) und SspI- (Spur 2), DraI- (Spur 3) bzw. NaeI-Verdau (Spur 4). Zur Größenbestimmung der Amplifikate wurde der p-GEM DNA Marker verwendet (Spur 1). Die mit Sternchen versehenen PCR-Produkte wurden nach Klonierung in *E. coli* XL1-Blue MRF^c durch Sequenzanalysen näher analysiert.

Voraussetzung für die Anwendung der Methode war die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme zum Verdau der genomischen DNA des Stammes DCMB5. Es handelte sich dabei um Enzyme mit einer 6 bp langen Erkennungssequenz, die glatte Enden erzeugten und die keine Schnittstelle im 16S rRNA Gen selbst besaßen. Optimalerweise lag die Schnittstelle 500 bis 2000 bp außerhalb des 16S rRNA Gens. Die Schnittstellenanalyse erfolgte durch theoretischen Verdau der Genomsequenz des Stammes CBDB1. Restriktionsenzyme, die alle Anforderungen erfüllten, waren SspI, DraI, NaeI, NruI und SmaI. Für die Untersuchung der Bereiche, die das 16S rRNA Gen des Stammes DCMB5 flankierten, wurden von diesen fünf Enzymen SspI, DraI und NaeI ausgewählt. Für die Charakterisierung des 5'-gelegenen Bereiches wurden anschließend die 16S rDNA-spezifischen Primer DET-730 (SspI, DraI) und DET-249r (NaeI) genutzt und für die Amplifikation des 3'-flankierenden Bereiches wurde der Primer DET-1260f (Tab. 8) verwendet. Der Primer UV-verkürzt, der in der Vektorette bindet, wurde jeweils als zweiter Primer im PCR-Ansatz verwendet.

Das Ergebnis der jeweiligen PCR-Reaktionen ist in Abb. 11 dargestellt. Es zeigte sich, dass in jedem Fall eine Vielzahl von unspezifischen PCR-Produkten amplifiziert wurde (Schmier im Hintergrund), es aber auch eine Zahl von Amplifikaten gab, die distinkte Banden im Agarose-Gel aufwiesen. Bei der Untersuchung des *upstream* Bereiches wurde nach SspI- bzw. DraI-Verdau jeweils ein spezifisches PCR-Produkt mit dem Primerpaar DET-730r/UV-verkürzt amplifiziert. Die Größe des PCR-Produkts lag dabei in beiden Fällen zwischen 750 und 800 bp.

Nach NaeI-Verdau wurden in der PCR mit den Primern DET249r und UV-verkürzt drei Amplifikate erhalten, die näher untersucht wurden und die Größen von ca. 520, 800 und 2600 bp besaßen. Im Fall des analysierten *downstream* Bereiches wurde nach SspI-Verdau ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert, das eine Größe von ca. 600 bp aufwies. Nach NaeI- bzw. DraI-Verdau wurden im Agarosegel zwei distinkte Banden erhalten. Die PCR-Produkte hatten im Fall des NaeI-Verdau Größen von ca. 300 und 800 bp bzw. 700 und 1100 bp nach Verdau mit DraI.

Die PCR-Produkte wurden nach Reinigung und Ligation in den Vektor pGEM®T-Easy in *Escherichia coli* XL1-Blue MRF⁺ transformiert. Nach Präparation der Plasmide wurden die Inserts mit den Primern DET-730r, DET-249r, DET-1260f und UV-verkürzt (Tab. 8) sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass nahezu alle Inserts Amplifikate des 16S rRNA Gens und der entsprechenden flankierenden Bereiche von *Dehalococcoides* sp. repräsentierten. Eine Ausnahme stellten die PCR-Produkte dar, die nach NaeI-Verdau mit dem Primerpaar DET249r/UV-verkürzt amplifiziert wurden. Hier wurde das 16S rRNA Gen nebst dem flankierenden Bereich von *Desulfovibrio* sp. amplifiziert, was vermutlich auf eine unzureichende Spezifität des Primers DET249r zurückzuführen war.

Alle Sequenzen, die den 5´ bzw. 3´-Bereiche des 16S rRNA Gens von *Dehalococcoides* sp. repräsentierten, wurden anschließend mit Hilfe des Programms „DNASIS“ miteinander verknüpft und folgend mittels „CLUSTAL W“ mit den 16S rRNA Gen-flankierenden Bereichen der *Dehalococcoides* sp. Stämme CBDB1, BAV1 und 195 verglichen (Abb. 12). Im 5´-Bereich wurden mit Hilfe der Vektorette-PCR 33 bp *upstream* des 16S rRNA Gens von Stamm DCMB5 identifiziert, während es im 3´-Bereich 443 bp *downstream* des 16S rRNA Gens waren. Die Sequenzen *up-* und *downstream* des 16S rRNA Gens des Stammes DCMB5 waren dabei identisch mit den entsprechenden Bereichen von Stamm CBDB1. In der *upstream* Region bestanden 100 % und 96 % Sequenzidentität zu den Stämmen BAV1 und 195, während der Bereich *downstream* des 16S rRNA Gens zu 99 % und 83 % identisch zu den Sequenzen der Stämme BAV1 und 195 war.

3.2.2 Identifikation von *rdhA* Genen im Genom von Stamm DCMB5

Eine Differenzierung der Stämme CBDB1 und DCMB5 war mit Hilfe der Vektorette-PCR und der Analyse der 16S rDNA-flankierenden Bereiche nicht möglich. Da physiologische Unterschiede zwischen Stamm CBDB1 und der Stamm DCMB5-haltigen Mischkultur bestanden, sollten die *rdhA* Gene im Genom des Stammes DCMB5 identifiziert werden. Dazu

wurden basierend auf bekannten *rdhA* Gensequenzen des Stammes CBDB1 Primer abgeleitet.

A

```
CBDB1    AAACAATACACTAGTAATTAATATTGAGCTTGG 33
BAV1     AAACAATACACTAGTAATTAATATTGAGCTTGG 33
DCMB5    AAACAATACACTAGTAATTAATATTGAGCTTGG 33
195      AAACAATACACTAGTAATTAATATTGAGCTTGG 33
          *****
```

B

```
CBDB1    AAAGAGTTTTACCTTTTGTACAACATGGTGGGCCATCTTGGTCTCGAACCAAGGACCTCA 60
DCMB5    AAAGAGTTTTACCTTTTGTACAACATGGTGGGCCATCTTGGTCTCGAACCAAGGACCTCA 60
BAV1     AAAGAGTTTTACCTTTTGTACAACATGGTGGGCCATCTTGGTCTCGAACCAAGGACCTCA 60
195      -----ATGGTGGGCCATCTTGGTCTCGAACCAAGGACCTCA 36
          *****
```

```
CBDB1    GTCTTATCAGGACTGCGCTCTAACCAACTGAGCTAATGGCCCATTTGATAACAATATAAAA 120
DCMB5    GTCTTATCAGGACTGCGCTCTAACCAACTGAGCTAATGGCCCATTTGATAACAATATAAAA 120
BAV1     GTCTTATCAGGACTGCGCTCTAACCAGCTGAGCTAATGGCCCATTTGATAACAATATAAAA 120
195      GTCTTATCAGGACTGCGCTCTAACCAGCTGAGCTAATGGCCCGATTGATAACAACA--GA 94
          *****
```

```
CBDB1    CAAACTCAATCTTGAGCTGTGCAATGCATTAGCAAGTGAATTACTATTTGAAAAACGTCA 180
DCMB5    CAAACTCAATCTTGAGCTGTGCAATGCATTAGCAAGTGAATTACTATTTGAAAAACGTCA 180
BAV1     CAAACTCAATCTTGAGCTGTGCAATGCATTAGCAAGCGAATTACTATTTGAAAAACGTCA 180
195      CAGATT-----GGGTATCTT-----CGAAATACTACCCGAAAAACGTCA 133
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

```
CBDB1    TTATAATATAGCAAACAGGATGCCTAGCGCAAGTCCCTTATCACCATGAACACTGATAAAA 240
DCMB5    TTATAATATAGCAAACAGGATGCCTAGCGCAAGTCCCTTATCACCATGAACACTGATAAAA 240
BAV1     TTATAATATAGCAAACAGGATGCCTAGCGCAAGTCCCTTATCACCATGAACACTGATAAAA 240
195      ATATAATATAGCAAACAGGACGCTTAGCGCAAGTCCCTTCAGC--CCAAATGCCTAACAAA 192
          *****
```

```
CBDB1    ACAGGGATAAGTTAAGCAGATGTGAGAGTTCAGGTTATCAGCTTTCAGGGAAACTAATTT 300
DCMB5    ACAGGGATAAGTTAAGCAGATGTGAGAGTTCAGGTTATCAGCTTTCAGGGAAACTAATTT 300
BAV1     ACAGGGATAAGTTAAGCAGATGTGAGAGTTCAGGTTATCAGCTTTCAGGGAAACTAATTT 300
195      ACCTACATGAGTTTCAAAGCGGGATAGATACAGGTTAGCAA--TCAGGAGAAAGTAATTT 250
          ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

```
CBDB1    --ATCCCCTTATAACACTAACACCTTAACCTCTGGATAGCGGAAAAGAAAAGCGAAGTATC 358
DCMB5    --ATCCCCTTATAACACTAACACCTTAACCTCTGGATAGCGGAAAAGAAAAGCGAAGTATC 358
BAV1     --ATCCCCTTATAACACTAACACCTTAACACTGGATAGCGGAAAAGAAAAGCGAAGTATC 358
195      TTATCCCCTTATAACACTAACACCTTAACCCCTGGATAGCGGAAAAGAAAAGAGAAGTATC 310
          *****
```

```
CBDB1    CGTTTAAAGTCGGATATCGACCTAGGTTAATAGGCACGAGGCCAATTATCCTTAGAAAGG 418
DCMB5    CGTTTAAAGTCGGATATCGACCTAGGTTAATAGGCACGAGGCCAATTATCCTTAGAAAGG 418
BAV1     CGTTTAAAGTCGGATATCGACCTAGGTTAATAGGCACGAGGCCAATTATCCTTAGAAAGG 418
195      CGTTTAAAGTCGGATATCGACCTAGGTTAATAGGCACGAGGCCAATTATCCTTAGAAAGG 370
          *****
```

```
CBDB1    AGGTGATCCAGCCGACGCTTCCGCT 443
DCMB5    AGGTGATCCAGCCGACGCTTCCGCT 443
BAV1     AGGTGATCCAGCCGACGCTTCCGCT 443
195      AGGTGATCCAGCCGACGCTTCCGCT 395
          *****
```

Abb. 12. Alignment der Bereiche *upstream* (A) und *downstream* (B) des 16S rRNA Gens der *Dehalococcoides* sp. Stämme DCMB5, CBDB1, BAV1 und 195. Sternchen geben Übereinstimmungen in den DNA-Sequenzen wieder.

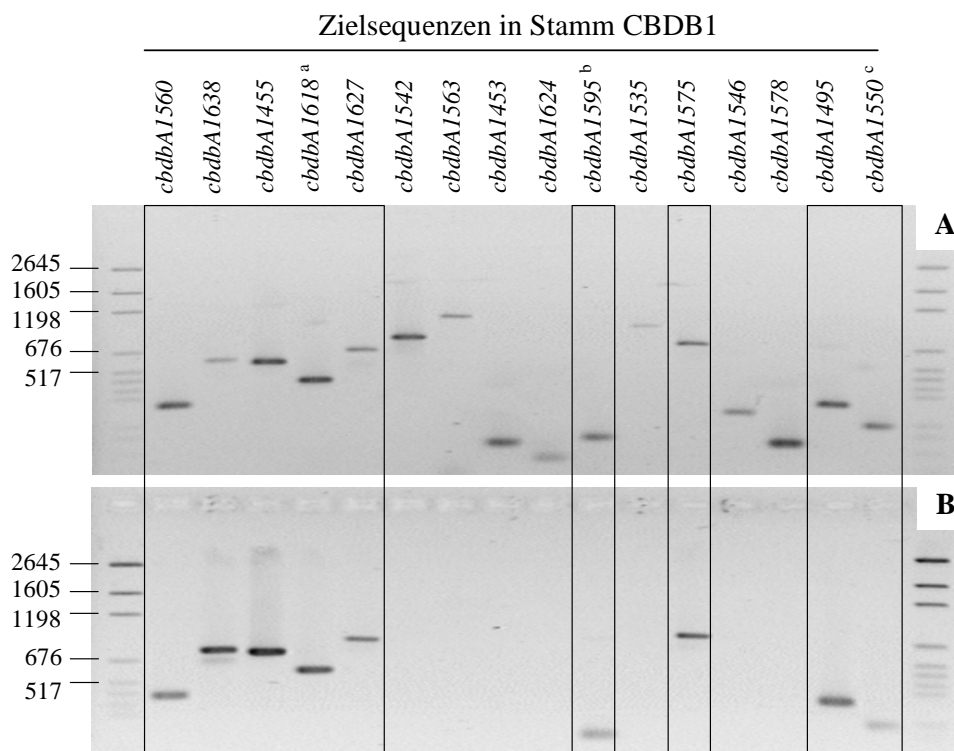


Abb. 13. PCR-Amplifikation der von Hölscher *et al.* (2004) identifizierten *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 an DNA der *Dehalococcoides* sp. Stämme CBDB1 (A) und DCMB5 (B) unter Verwendung Dehalogenase-spezifischer Primer. Neun der untersuchten Gene waren in beiden Stämmen nachweisbar (gerahmte Spuren). Zur Kontrolle wurden alle PCR-Produkte des Stammes DCMB5 sequenziert. Es wurde der p-GEM[®] DNA Marker verwendet (Spuren 1 und 18). ^aAmplifiziertes *rdhA* Gen des Stammes DCMB5 zeigte höchste Sequenzidentität zu BAV1 *rdhA1*, ^bAmplifiziertes *rdhA* Gen des Stammes DCMB5 zeigte höchste Sequenzidentität zu BAV1 *rdhA5*, ^cAmplifiziertes *rdhA* Gen des Stammes DCMB5 zeigte höhere Sequenzidentität zu *cbdbA1570* als zu *cbdbA1550*

3.2.2.1 Nachweis von *rdhA* Genen im Stamm DCMB5 über *rdhA*-Gen-spezifische Primer

Zu Beginn der Arbeiten waren 16 *rdhA* Gensequenzen des Stammes CBDB1 bekannt (Hölscher *et al.*, 2004). Diese Sequenzen waren die Grundlage für das Design von 16 spezifischen Primerpaaren (*rdhA1-16 f/r*; Tab. 8) zur Amplifikation dieser Gene an DNA, die aus Zellen anaerober Mischkulturen isoliert wurde, die Stamm DCMB5 enthielten. Als Positivkontrolle diente stets aus Stamm CBDB1 isolierte DNA. Mit neun Primerpaaren wurden PCR-Produkte an DNA aus der Mischkultur erhalten (Abb. 13). Nach Sequenzierung dieser PCR-Produkte zeigte sich, dass sieben *rdhA* Gene amplifiziert wurden, die höchste Sequenzidentitäten zu *rdhA* Genen des Stammes CBDB1 aufwiesen (Tab. 17), wobei mit dem Primerpaar *rdhA16f/r* nicht wie erwartet *cbdbA1550*, sondern *cbdbA1570* amplifiziert wurde. Die Sequenz des Gens *cbdbA1570* stand zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht zur Verfügung, wodurch die Spezifität des Primerpaars im Vorfeld nicht ausreichend

Tab. 17. Identifizierung von *rdhA* Genen in einer dioxindechlorierenden Mischkultur mittels verschiedener Primerpaare und Analysemethoden

Primer Target		<i>rdhA</i> spezifische Primer		Primerpaar RRF2/B1R ^a	degenerierte Primer, Produkte bis 1650 bp		degenerierte Primer, FAM-markierter <i>forward</i> -Primer, Produkte bis 1650 bp		degenerierte Primer, FAM-markierter <i>forward</i> -Primer, Produkte bis 650 bp	
Analysentechnik		Sequenzierung der PCR- Produkte		RFLP und Sequenzierung	RFLP und Sequenzierung		t-RFLP		t-RFLP	
<i>rdhA</i> Gene der Stämme 195/ CBDB1/BAV1	<i>rdhA</i> Gene des Stammes DCMB5	identifizierte DCMB5- <i>rdhA</i> Gene (b)	Primerpaar	Identifizierte DCMB5- <i>rdhA</i> Gene (b)	identifizierte DCMB5- <i>rdhA</i> Gene (b)	Primerpaar	identifizierte DCMB5- <i>rdhA</i> Gene	Primerpaar	identifizierte DCMB5- <i>rdhA</i> Gene	Primerpaar
<i>cbdbA1453</i> <i>cbdbA1624</i> <i>cbdbA1550</i>	DCMB <i>rdhA1</i>				x (94 %)	cl-1a-f/-r	x	FAM-cl-1a-f/-r	x	cluster 1a_f/1a_r
<i>cbdbA1570</i> BAV1 <i>rdhA5</i> ^d	DCMB <i>rdhA3</i>	x (95 %)	rdhA16f/r		x (99 %)	cl-1c-f/-r	x	FAM-cl-1c-f/-r	x	cluster 1a_f/1a_r
<i>cbdbA1495</i>	DCMB <i>rdhA4</i>	x (94 %)	rdhA10f/r		x (99 %)	cl-1a-f/-r	x	FAM-cl-1a-f/-r	x	cluster 1a_f/1a_r
<i>cbdbA1588</i>	DCMB <i>rdhA5</i>	x (98 %)	rdhA15f/r		x (97 %)	cluster 1b_f ^e /cl-1b-r	x	cluster 1b_f/cl-1b-r	x	cluster 1b_f/1b_r
<i>cbdbA96</i> <i>cbdbA1535</i>	DCMB <i>rdhA20</i>								x	cluster 1c_f/1c_r
<i>cbdbA1582</i> <i>cbdbA1508</i> <i>cbdbA1578</i>	DCMB <i>rdhA19</i>						x	FAM-cl-1c-f/-r	x	cluster 1c_f/1c_r
<i>cbdbA1546</i> <i>cbdbA1575</i>	DCMB <i>rdhA6</i>	x (97 %)	rdhA12f/r	x (98 %)	x (100 %)	cl-1c-f/-r	x	FAM-cl-1c-f/-r	x	cluster 1d_f/1d_r
<i>cbdbA88</i> <i>cbdbA80</i>	DCMB <i>rdhA16</i>				x (99 %)	cluster 3_f ^e /cl-3-r	x	cluster 3_f/cl-3-r	x	cluster 3_f/3_r
<i>cbdbA243</i>	DCMB <i>rdhA17</i>				x (97 %)	cluster 3_f ^e /cl-3-r	x	cluster 3_f/cl-3-r	x	cluster 3_f/3_r
<i>cbdbA1563</i>	DCMB <i>rdhA21</i>						x	cluster 3_f/cbdbA243-r		
<i>cbdbA1560</i>	DCMB <i>rdhA7</i>			x (96 %)	x (98 %)	cluster 2a_f ^e /cl-2a-r	x	cluster 2a_f/cl-2a-r	x	cluster 2a_f/2a-1_r
<i>cbdbA1627</i>	DCMB <i>rdhA8</i>			x (99 %)						
<i>cbdbA1638</i>	DCMB <i>rdhA10</i>	x (100 %)	rdhA1f/r	x (98 %)						
<i>cbdbA1542</i> <i>cbdbA1491</i>	DCMB <i>rdhA11</i>	x (88 %)	rdhA5f/r		x (99 %)	cluster 2a_f ^e /cl-2a-r	x	cluster 2a_f/cl-2a-r	x	cluster 2a_f/2a-3_r
<i>cbdbA238</i> <i>cbdbA1455</i>	DCMB <i>rdhA9</i>	x (97 %)	rdhA2f/r	x (99 %)	x (98 %)	cluster 2a_f ^e /cl-2a-r	x	cluster 2a_f/cl-2a-r	x	cluster 2a_f/2a-2_r
<i>cbdbA1598</i>	DCMB <i>rdhA22</i>						x	cluster 2b_f/cl-2b-r	x	cluster 2b_f/2b-2_r
BAV1 <i>rdhA1</i> ^e	DCMB <i>rdhA13</i>	x (99 %)	rdhA3f/r	x (97 %)	x (99 %)	cl-2b-f/cl-2b-r	x	cluster 2b_f/cl-2b-r	x	cluster 2b_f/2b-2_r
<i>cbdbA187</i> <i>cbdbA1539</i>	DCMB <i>rdhA15</i>				x (99 %)	cl-2b-f/cl-2b-r	x	cluster 2b_f/cl-2b-r	x	cluster 2b_f/2b-3_r
<i>cbdbA1503</i> <i>cbdbA1092</i>	DCMB <i>rdhA14</i>	x (91 %)	rdhA4f/r		x (99 %)	cluster 3_f ^e /cl-3-r	x	cluster 3_f/cl-3-r		
<i>DET0173</i> ^f	DCMB <i>rdhA18</i>				x (100 %)	cluster 4_f ^e /4b-r	x	cluster 4_f/4b-r	x	cluster 4_f/4b-r
	DCMB <i>rdhA2</i>						x	cluster 4_f/4a-r	x	cluster 4_f/4a-r
	DCMB <i>rdhA12</i>			x (85 %)						

^aKrajmalnik-Brown *et al.*, 2004, ^bHöchste Identität auf DNA-Ebene zu *rdhA* Genen anderer *Dehalococcoides* Stämme, ^cPrimer wurden ohne FAM-Markierung verwendet (Tab. 8), ^dorthologes Gen zu *cbdbA1595*, ^eorthologes Gen zu *cbdbA1618*, ^fkein orthologes Gen im Stamm CBDB1

sichergestellt werden konnte. Beide Gene besitzen eine Sequenzidentität von 81 % auf DNA-Ebene. Mit den spezifischen Primern wurden außerdem zwei *rdhA* Gene amplifiziert, die höchste Sequenzidentitäten zu *rdhA* Genen des Stammes BAV1 aufwiesen (Abb. 13, Tab. 17).

3.2.2.2 Nachweis von *rdhA* Genen des Stammes DCMB5 durch Einsatz von gruppenspezifischen Primern

Nach der Veröffentlichung der Genomsequenz des Stammes CBDB1 (Kube *et al.*, 2005), die zeigte, dass dieser Stamm 32 *rdhA* Gene besitzt, sollte versucht werden, auf Basis dieser Erkenntnisse, geeignete Primer zu finden, um weitere *rdhA* Gene im Genom des Stammes DCMB5 zu identifizieren. In vorangegangenen Untersuchungen wurde zur Identifikation von *rdhA* Genen ein Paar degenerierter Primer genutzt (Hölscher *et al.*, 2004; Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004). Der *forward* Primer wurde dabei in der Tat-Signalsequenz (RRF2) abgeleitet und der *reverse* Primer in einer konservierten Region des B-Proteins (B1R). Obwohl die Analyse aller 32 *rdhA* Sequenzen des Stammes CBDB1 ergab, dass nur ein Teil der Sequenzen von dem Primerpaar RRF2/B1R erkannt wurde, wurde dieses Primerpaar genutzt, um *rdhA* Gene an DNA der dioxindechlorierenden Mischkulturen zu amplifizieren. Die Charakterisierung der PCR-Produkte erfolgte dabei nach Klonierung in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ durch RFLP-Analysen und Sequenzierung. Nach der Untersuchung von 114 Klonen zeigte sich, dass sieben Restriktionsmuster *rdhA* Gensequenzen repräsentierten. Sechs der Sequenzen zeigten hohe Identitäten zu *rdhA* Genen des Stammes CBDB1, während eine Sequenz eine 85%ige Identität zum Gen *DET0173* aus *Dehalococcoides ethenogenes* aufwies (Tab. 17). Nur rund 40 % der untersuchten Klone repräsentierten *rdhA* Gensequenzen, fünf der Muster besaßen einen Anteil an der Klonbibliothek von unter 5 %. Das mit dem Primerpaar RRF2/B1R detektierte Gen *cbdbA1563* war mit den spezifischen Primern *rdhA7f/r* nicht nachweisbar (Abb. 13). Auch in folgenden RFLP und t-RFLP wurde dieses Gen nicht amplifiziert (Tab. 17). Um die mit dem Primerpaar RRF2/B1R erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde ein neues, spezifisches Primerpaar (*cbdbA1563_f/r*; Tab. 8) für das Gen *cbdbA1563* abgeleitet. Mit diesem war ein Amplifikat der gewünschten Größe an Gesamt-DNA des Stammes DCMB5 nachweisbar.

Da die Sensitivität des Primerpaars RRF2/B1R nicht ausreichte, um alle *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 zu detektieren, wurde ein eigener Satz aus degenerierten und spezifischen Primern abgeleitet. Dazu wurden die 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 basierend auf

hohen Sequenzidentitäten in 4 Gruppen (Cluster 1, 2, 3 und 4) unterteilt. Da es nicht möglich war, innerhalb dieser Gruppen ausreichend konservierte Sequenzbereiche zu identifizieren, um Primer abzuleiten, wurden diese Hauptgruppen in insgesamt 13 Untergruppen untergliedert. Nach dem Alignment der Sequenzen innerhalb dieser Sub-Cluster wurden in konservierten Regionen Primerpaare abgeleitet, die PCR-Produkte bis zu einer Länge von 1650 bp aufwiesen (Tab. 8). Zudem wurde ein weiteres Primerpaar abgeleitet (cl-5-f/r, Tab. 8), dessen Zielsequenzen Trichlorethen- (TCE) und Vinylchlorid (VC)-*rdhA*-Gene anderer *Dehalococcoides* Stämme (195, BAV1, VS) waren, da diese im Genom des Stammes CBDB1 nicht vorhanden waren. Die mit diesen Primern an DNA der dioxindechlorierenden Mischkulturen amplifizierten PCR-Produkte wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ kloniert und nachfolgend durch RFLP und Sequenzierung näher charakterisiert. Es wurden mit sieben Primerpaaren PCR-Produkte amplifiziert, die insgesamt 14 *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 repräsentierten (Tab. 17). Die analysierten Klonbibliotheken umfassten jeweils zwischen 18 und 46 Klone. Die überwiegende Zahl der *rdhA* Genfragmente zeigte höchste Sequenzidentitäten zu *rdhA* Genen des Stammes CBDB1. Allerdings gab es auch zwei *rdhA* Gene, die eine höhere Ähnlichkeit zu *rdhA* Genen des Stammes BAV1 (BAV1 *rdhA1* und BAV1 *rdhA5*) aufwiesen. Beide Gene wurden bereits mit den spezifischen Primerpaaren *rdhA4f/r* und *rdhA10f/r* identifiziert. Putative TCE oder VC *rdhA* Gensequenzen wurden in den Mischkulturen nicht detektiert.

3.2.2.3 Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus zur schnellen Detektion von *rdhA* Genen

Um das mikrobielle Dechlorierungspotential an kontaminierten Standorten abschätzen zu können, wäre es hilfreich, eine Methode zu entwickeln, um *rdhA* Gene von *Dehalococcoides* sp. schnell und effizient detektieren und differenzieren zu können. Da t-RFLP Analysen den RFLP Untersuchungen methodisch ähneln, aber durch Wegfall des Klonierungsschrittes einen höheren Durchsatz an Proben erlauben, wurde ein PCR- und t-RFLP-basierter Ansatz eingeführt, um *rdhA* Gene von *Dehalococcoides* sp. zu identifizieren. Da aus den RFLP Analysen bereits ein Satz degenerierter Primer vorhanden war, wurde zuerst dessen Anwendbarkeit an DNA des Stammes CBDB1 bzw. der dioxindechlorierenden Mischkultur getestet.

Die Zuordnung terminaler Fragmente zu bestimmten *rdhA* Genen erfolgte über die Fragmentlänge, die mit Hilfe eines theoretischen Verdaus der 32 *rdhA* Gensequenzen des

Stammes CBDB1 und der Sequenzen der Gene BAV1 *rdhA1*, BAV1 *rdhA5* und *DET0173* bestimmt wurde (Tab. 12). Um die einzelnen *rdhA* Gene differenzieren zu können, wurde jedes 6-FAM-markierte PCR-Produkt einzeln mit einem bis vier Restriktionsenzymen verdaut. Außerdem sollte untersucht werden, ob sich das Primerpaar RRF2/B1R für t-RFLP Analysen eignet, da auch mit diesem Primerpaar im Stamm DCMB5 *rdhA* Gene detektiert wurden.

Bei der Amplifikation von PCR-Produkten mit dem Primerpaar FAM-RRF2/B1R an DNA des Stammes CBDB1 und anschließender t-RFLP Analyse zeigte sich eine Vielzahl terminaler Fragmente, die oftmals keinem *rdhA* Gen zugeordnet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Dieses Problem ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass, wie bereits erwähnt, nur vier der *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 eine perfekte Zielsequenz für den Primer RRF2 besitzen. Hinzu kommt, dass der *forward* Primer in der Tat-Signalsequenz abgeleitet wurde und somit auch an die Signalsequenz von Genen anderer Tat-Substrate binden kann (Berks *et al.*, 2000). Diese mangelnde Spezifität zeigte sich bereits bei den RFLP Analysen mit diesem Primerpaar, wo von 27 identifizierten Restriktionsmustern nur 14 *rdhA* Gene repräsentierten, die zudem oft nur einen Anteil an der Klonbibliothek von unter 5 % besaßen. Da mittels t-RFLP nur dominante Vertreter einer Population detektiert werden können (Kirk *et al.*, 2004), ist dieses Primerpaar für t-RFLP Analysen ungeeignet.

Mit den 13 in dieser Arbeit abgeleiteten Primerpaaren war es möglich, alle 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 zu amplifizieren und anschließend in t-RFLP Analysen zu differenzieren. An DNA der dioxin-dechlorierenden Mischkultur wurden mit neun dieser Primerpaare Amplifikate erhalten, denen nach t-RFLP Analyse 18 verschiedene *rdhA* Gene zugeordnet wurden (Abb. 14, Anhang 4). Sechzehn der identifizierten t-RFs repräsentierten *rdhA* Gene des Stammes CBDB1, 16 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 waren hingegen in Stamm DCMB5 nicht nachweisbar und zwei t-RFs wurden *rdhA* Genen des Stammes BAV1 zugewiesen (Abb. 14, Tab. 17). Mit dem Primerpaar FAM-cl1a-f/cl-1a-r wurde ein *rdhA* Gen amplifiziert, das nach t-RFLP Analyse zunächst dem Gen *cbdbA1595* zugeordnet wurde. In vorangegangenen RFLP und Sequenzanalysen mit dem entsprechenden Primerpaar wurde dieses Gen allerdings nicht detektiert. Es wurde jedoch das Gen BAV1 *rdhA5* identifiziert, das eine hohe Ähnlichkeit zu dem Gen *cbdbA1595* besitzt (93 % auf DNA Ebene). Obwohl beide Gene sich mit den verwendeten Restriktionsenzymen in der t-RFLP Analyse nicht unterscheiden lassen, wurde das fragliche *rdhA* Gen des Stammes DCMB5 dem Gen BAV1 *rdhA5* zugeordnet. Mit dem Primärpaar cluster 3_f/cl-3-r wurde ein *rdh* Gen identifiziert, das aufgrund der Länge des t-RF dem Gen BAV1 *rdhA1* des Stammes BAV1 zugewiesen wurde.

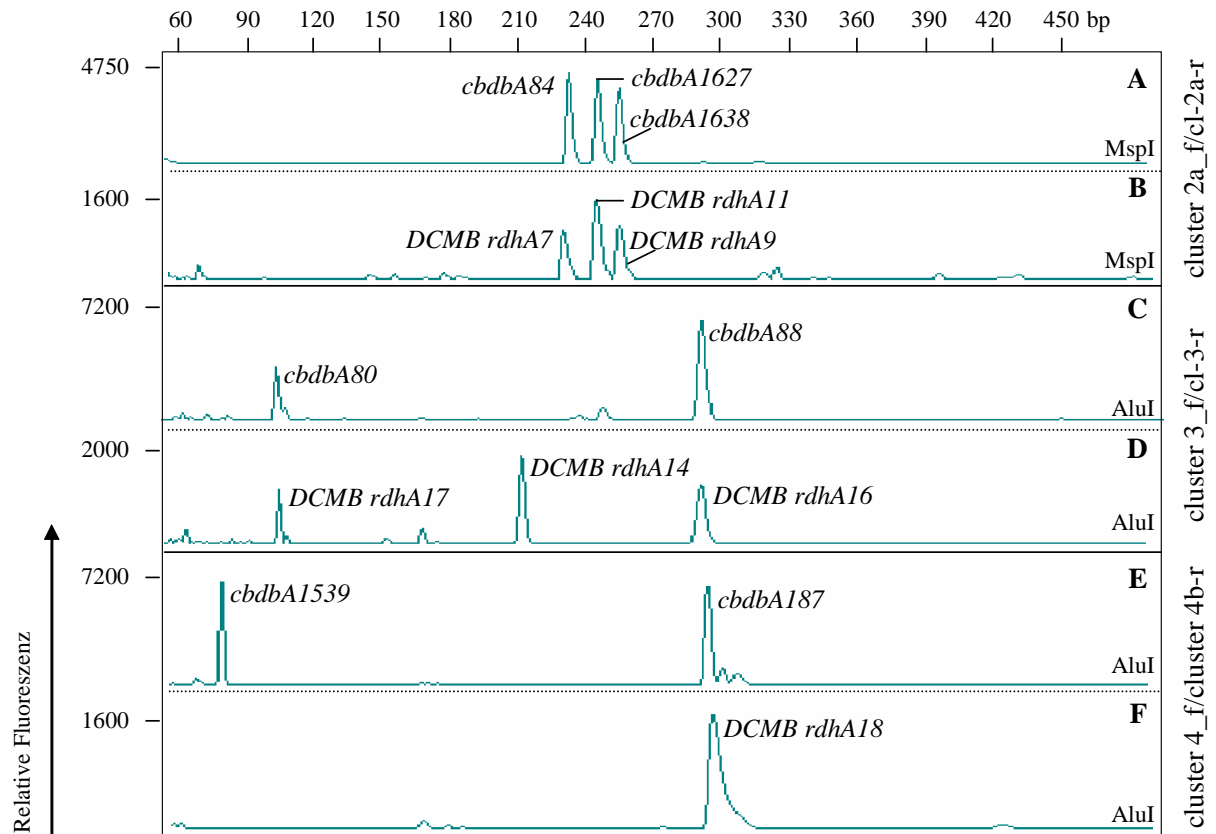


Abb. 14. T-RFLP Profile einer Auswahl von *rdhA* Genen, die an DNA der Stämme CBDB1 (A, C, E) und DCMB5 (B, D, F) amplifiziert worden sind. Die zugeordneten *rdhA* Gene beider Stämme sind neben den terminalen Fragmenten angegeben, die verwendeten Primerpaare rechts neben den t-RFLP Profilen.

Für Transkriptionsanalysen des Stammes CBDB1 wurden weitere Primerpaare abgeleitet (siehe Kap. 2.5.7.2), die PCR-Produkte mit einer Länge von maximal 650 bp ergaben (Tab. 8). Für die Amplifikation der Cluster 4-*rdhA* Gene wurden die Primerpaare cluster 4_f/cluster 4a_r und cluster 4_f/cluster 4b_r unverändert angewendet. Nach Überprüfung der neu abgeleiteten Primerpaare an DNA des Stammes CBDB1 und Identifikation und Differenzierung aller 32 *rdhA* Gene in den t-RFLP Analysen wurden an DNA der DCMB5-haltigen Mischkulturen mit 12 der 13 Primerpaare Amplifikate erhalten. Nach t-RFLP Analyse wurden diesen 12 Primerpaaren anhand der Länge der terminalen Fragmente 17 *rdhA* Gene zugeordnet (Tab. 17, Anhang 5). Fünfzehn *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 zeigten terminale Fragmente, die *rdhA* Genen des Stammes CBDB1 entsprachen und zwei *rdhA* Gene besaßen terminale Fragmente, die *rdhA* Gene des Stammes BAV1 repräsentierten (BAV1 *rdhA1*, BAV1 *rdhA5*, Tab. 17). Die Zuordnung zum Gen BAV1 *rdhA5* erfolgte erneut über Sequenzergebnisse vorangegangener Analysen, da auch mit den neuen Primerpaaren die Gene *cbdbA1595* und BAV1 *rdhA5* nicht anhand der entstandenen terminalen Fragmente unterschieden werden konnten.

Mit Hilfe dreier methodischer Ansätze wurden im Stamm DCMB5 22 *rdhA* Gene identifiziert, die mit DCMB *rdhA1-22* bezeichnet wurden (Tab. 17). Es zeigten sich erneut große Ähnlichkeiten zwischen den Stämmen DCMB5 und CBDB1 (19 ähnliche *rdhA* Gene). Dreizehn *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 waren allerdings im Genom des Stammes DCMB5 nicht nachweisbar. Drei *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 wiesen höhere Sequenzidentitäten zu Genen anderer *Dehalococcoides* Stämme auf (Tab. 17). Aufgrund der nur 85%igen Identität des Gens DCMB *rdhA12* zum Gen *DET0173* von *Dehalococcoides ethenogenes* handelt es sich hier wahrscheinlich um ein bislang unbekanntes *rdhA* Gen. Die Anwesenheit der *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 wurde meist über mindestens zwei methodische Ansätze bestätigt. Es gab allerdings auch *rdhA* Gene, deren Existenz nur in einem Versuchsansatz nachgewiesen werden konnte (DCMB *rdhA12*, 20 und 21, Tab. 17).

3.3 Analyse der Transkription der 32 *rdhA* Gene von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 in Gegenwart verschiedener chlorierter Elektronendonatoren

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Vorgänge auf Transkriptebene im Verlauf der Dechlorierung chlorierter aromatischer Verbindungen nichts bekannt. Um einen Einblick in die Regulationsmechanismen während der Dechlorierung von Chloraromaten zu erhalten, wurde die Transkription der 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 in Gegenwart von 1,2,3-TrCB, 1,2,4-TrCB, 2,3-DCDD und 1,3-DCDD näher untersucht. Diese Substrate bieten den Vorteil, dass sie in nur einem Dechlorierungsschritt zu dem entsprechenden Endprodukt umgesetzt werden. Die Transkription wurde mit Hilfe eines RT-PCR- und t-RFLP-basierten Ansatzes (Kap. 2.5.7.2, 2.5.14) verfolgt. Die Differenzierung der *rdhA* Gene erfolgte nach Amplifikation der 6-FAM-markierten PCR-Produkte mittels t-RFLP. Die Zuordnung der erhaltenen terminalen Fragmente zu *rdhA* Genen erfolgte nach einem theoretischen Verdau der 32 *rdhA* Gensequenzen (Tab. 12). Das Transkriptionsniveau ausgewählter *rdhA* Gene wurde zusätzlich mittels qPCR bestimmt (Kap. 2.5.15).

3.3.1 Optimierung des Versuchsansatzes

Die Optimierung des Versuchsablaufes war die Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse während der Transkriptionsuntersuchungen mit dem Stamm CBDB1. Als besonders kritisch stellten sich dabei zwei Punkte heraus. Zum einen waren möglichst hohe Zellzahlen die grundlegende Voraussetzung für die Präparation von ausreichend RNA und zum anderen war

Tab. 18. Versuchsansätze, die zur Zellanzucht von Stamm CBDB1 für die Transkriptionsanalysen mit Trichlorbenzolen getestet wurden.

		Variante I	Variante II	Variante III
TrCB-Konzentration	VK	Je Fütterung 40 μ M	Je Fütterung 40 μ M	10 mM (Zweiflüssigphasensystem)
	HK	40 μ M	10 mM 1,2,3-TrCB (Zweiflüssigphasensystem)	40 - 60 μ M
Hungerphase		- ohne TrCB - 3 Tage bis 1 Woche	- ohne H ₂ - 3 Tage	- ohne TrCB - 2 Tage
Start des Versuchs		- Zugabe des TrCB	- Begasung mit H ₂	- Zugabe von TrCB
Beprobung (Probenvolumen)		- mehrfache Beprobung einer Kultur (je 50 ml)	- Aufarbeitung einer Kultur (50 ml)	- Aufarbeitung von Einzelkulturen über die Zeit (je 45 ml)

VK-Vorkultur, HK-Hauptkultur

die Auswahl der Primer entscheidend für eine erfolgreiche Amplifikation der *rdhA* Gene an cDNA des Stammes CBDB1. Es wurden drei Varianten zur Anzucht von Stamm CBDB1 in den Transkriptionsanalysen getestet (Tab. 18).

In Variante I (Tab. 18) wurden die Zellen in Vorkulturen durch wiederholte Zugabe von geringen Mengen an TrCB (40 μ M) angezogen. Zu Beginn der Transkriptionsexperimente wurden 200 ml-Hauptkulturen 10%ig aus den Vorkulturen beimpft und mehrere Tage ohne chlorierte Verbindung inkubiert. Anschließend wurde der Versuch durch Zugabe von 40 μ M TrCB gestartet und eine Kultur wurde über die Zeit mehrfach zur RNA- (je 50 ml) und DNA (je 1 ml)-Präparation beprobt. Diese Variante stellte sich als ungeeignet heraus, da wahrscheinlich aufgrund zu geringer Ausgangszellzahlen nur sehr wenig oder keine RNA isoliert werden konnte. Das hatte zur Folge, dass einzelne Transkripte nicht reproduzierbar einem bestimmten Substrat zugeordnet werden konnten. Zudem war nach der ersten Probenahme keine Dechlorierungsaktivität mehr nachzuweisen. Diese wurde aber als Basis für die Transkriptionsexperimente betrachtet.

Aufgrund dieser Erfahrungen wurde eine zweite Variante (Tab. 18) getestet. Hier wurden die Vorkulturen genau wie in Variante I bei wiederholter Zugabe von 40 μ M TrCB inkubiert. Diese dienten als Inoculum (10 %) für die Hauptkulturen, die mit 10 mM 1,2,3-TrCB (Zweiflüssigphasensystem) versetzt wurden. Aus technischen Gründen musste die Zugabe des Trichlorbenzols, welches in Hexadecan gelöst war, vor dem Beimpfen erfolgen. Deshalb konnten die Zellen des Stammes CBDB1 nach der Inokulation nicht mehr ohne chloriertes Substrat inkubiert werden. Da Wasserstoff essentiell ist für den Dechlorierungsprozess, wurden die Zellen stattdessen ohne Wasserstoff kultiviert. Der Versuch wurde anschließend durch Begasung mit Wasserstoff gestartet. Die Aufarbeitung der gesamten Kultur (50 ml)

erfolgte nach beginnendem Umsatz von 1,2,3-TrCB zu 1,3-DCB. Mit dieser Methode war es möglich, ausreichend RNA zu isolieren und *rdhA* Transkripte an cDNA zu amplifizieren und mittels t-RFLP zu differenzieren (*cbdbA1503*, *1539*, *1618*, *1535*, *1575*, *1092*, *187*). Der große Nachteil war allerdings, dass durch die relativ konstante wässrige TrCB-Konzentration im Zweiflüssigphasensystem die Transkription nicht in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (in diesem Fall 1,2,3-TrCB) verfolgt werden konnte.

Deshalb wurde eine dritte Variante (Tab. 18) untersucht. Die Vorkultivierung erfolgte dabei mit 1,2,3- oder 1,2,4-TrCB in Zweiflüssigphasensystemen, um maximale Zellzahlen des Stammes CBDB1 zu erhalten (5×10^8 bis 1×10^9 Zellen/ml). Nach Überführung von 10 % der Vorkulturen in mehrere parallele Hauptkulturen wurden die Kulturen 3 Tage (Hungerphase) ohne chlorierte Verbindung inkubiert. Der Transkriptionsversuch wurde durch Zugabe von 40 bis 60 μM der in Aceton gelösten Chloraromaten gestartet. Darauf folgend wurde zu jedem Probenahmezeitpunkt eine komplette Kultur für die Isolierung von RNA (45 ml) und DNA (1 ml) aufgearbeitet. Mit dieser Variante gelang es, ausreichende Mengen an RNA zu präparieren und reproduzierbare Ergebnisse nach RT, PCR-Amplifikation der *rdhA* Gene und deren Differenzierung mittels t-RFLP zu erzielen. Dieser Ansatz wurde deshalb in allen weiteren Transkriptionsexperimenten mit Chlorbenzolen verwendet und für die Arbeit mit den chlorierten Dioxinen leicht modifiziert (Kap. 2.5.1).

Um alle 32 *rdhA* Gene bzw. Transkripte des Stammes CBDB1 zu amplifizieren und zu unterscheiden, wurde ein PCR- und t-RFLP-basierter Ansatz gewählt. Zur Auswahl geeigneter Primer für die Amplifikation der *rdhA* Gene war es nötig, die *rdhA* Gene basierend auf Sequenzähnlichkeiten in 13 Sub-Cluster zu unterteilen. Für jede Gruppe wurde ein spezifisches oder degeneriertes Primerpaar abgeleitet. Zu Beginn der Versuche wurden Primerpaare verwendet, die PCR-Produkte bis zu einer Länge von 1650 bp ergaben (Tab. 8). Bei der Amplifikation der *rdhA* Sequenzen an cDNA des Stammes CBDB1 nahm die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse allerdings mit zunehmender Länge der PCR-Produkte ab. Um diesem Phänomen entgegen zu wirken, wurden einige *rdhA* Gensequenzen in neuen Sub-Clustern organisiert und es wurden neue (in der Regel) *reverse* Primer abgeleitet, die PCR-Produkte bis zu einer Größe von 650 bp ergaben (Tab. 8). Mit diesen Primern war es möglich, reproduzierbar *rdhA* Sequenzen an cDNA des Stammes CBDB1 zu amplifizieren.

3.3.2 Transkriptionsanalysen des Stammes CBDB1 mit 1,2,3- und 1,2,4-Trichlorbenzol

Während der Transkriptionsversuche mit 1,2,3- bzw. 1,2,4-TrCB wurde zu jedem Probenahmezeitpunkt eine Einzelkultur aufgearbeitet. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde jeder Versuchsansatz unter gleichen Bedingungen wiederholt. Nach dem Inokulieren wurden die Kulturen 72 h ohne TrCB inkubiert, um einen Einfluss der in den Vorkulturen enthaltenen Chlorbenzole auf die Transkription auszuschließen. Die Vorkultivierung für die Transkriptionsanalysen erfolgte mit 1,2,3-TrCB oder 1,2,4-TrCB im Zweiflüssigphasensystem. Die Trichlorbenzole wurden aus einer Acetonlösung in die Hauptkulturen gegeben. Um einen Einfluss des Lösungsmittels Aceton auf die Transkription der *rdhA* Gene auszuschließen, wurden Kontrollkulturen ohne TrCB, aber mit entsprechenden Mengen an Aceton, untersucht.

3.3.2.1 Amplifikation der *rdhA* Transkripte mit den Primerpaaren, die PCR-Produkte bis zu einer Länge von 1650 bp ergaben

Nach einer 72 stündigen Hungerphase wurde die Expression der *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 durch Zugabe von 1,2,3- oder 1,2,4-TrCB induziert. Die Vorkulturen wurden mit 1,2,3-TrCB im Zweiflüssigphasensystem kultiviert. Eine gaschromatographische Analyse der Dechlorierungsprodukte zeigte, dass 85 μM 1,3-Dichlorbenzol (DCB) aus 1,2,3-TrCB entstanden waren (Anhang 6-A). Nach 7-tägiger Kultivierung mit 1,2,4-TrCB wurden hingegen 18 μM 1,3-DCB und 36 μM 1,4-DCB detektiert (Anhang 6-B). Die Dechlorierungsaktivität wurde dabei aufgrund der unzureichenden gaschromatographischen Detektierbarkeit der Trichlorbenzole über die Produktbildung verfolgt.

Nach Umschreiben der RNA in cDNA wurden die gebildeten *rdhA* Transkripte mit Hilfe der Primerpaare, die Produkte bis zu einer Länge von 1650 bp ergaben (Tab. 8), amplifiziert und mittels t-RFLP differenziert. Es konnten mit folgenden Primerpaaren Amplifikate erhalten werden: FAM-cl-1a-f/r, *cbdbA1535*-f/r, *cbdbA1575*-f/r, FAM-cl-1c-f/r, cluster 2a_f/cl-2a-r, cluster 2b_f/cl-2b-r (nur nach Kultivierung mit 1,2,3-TrCB), cluster 4_f/a_r und cluster 4_f/b_r (Anhang 7). T-RFLP Analysen der PCR-Produkte, die an cDNA der 48 h Probe amplifiziert wurden, zeigten, dass in Gegenwart von 1,2,3-TrCB die Expression von 12 und in Gegenwart von 1,2,4-TrCB die Expression von 13 *rdhA* Genen induziert wurde. Zehn der *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 wurden in Gegenwart beider Substrate transkribiert. Transkripte der Gene *cbdbA1560* und *cbdbA1618* wurden nur nach Zugabe von 1,2,3-TrCB nachgewiesen (Anhang 7). Das Gen *cbdbA1624* wurde spezifisch durch 1,2,4-TrCB induziert

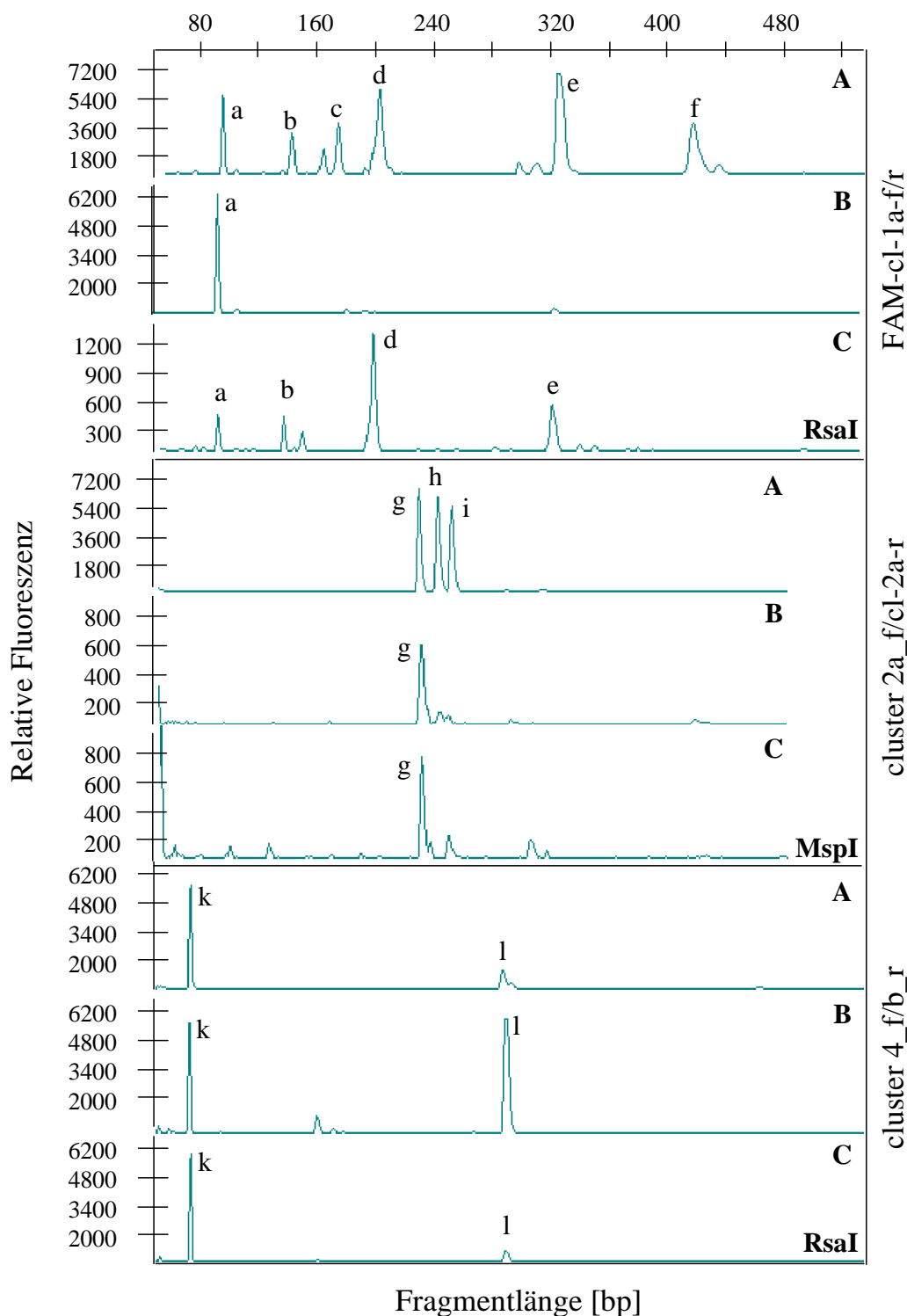


Abb. 15. T-RFLP Profile von genomischer DNA des Stammes CBDB1 (A) und cDNA aus mit 1,2,3-TrCB (B) bzw. 1,2,4-TrCB (C) induzierten Kulturen. Die analysierten (RT-)PCR-Produkte (Länge bis zu 1650 bp) wurden mit den angegebenen Primerpaaren amplifiziert und den dargestellten Restriktionsenzymen verdaut. Die Vorkulturen wurden mit 1,2,3-TrCB im Zweiflüssigphasensystem angezogen. a-*cbdbA1453*, b-*cbdbA1564*, c-*cbdbA1582*, d-*cbdbA1624*, e-*cbdbA1578*, f-*cbdbA1570*, g-*cbrA*, h-*cbdbA1627*, i-*cbdbA1638*, k-*cbdbA1539*, l-*cbdbA187*

(Anhang 7, Abb. 15). Eine genauere Analyse der t-RFLP Profile zeigte zudem, dass das Transkript *cbdbA1453* das dominante t-RF nach Amplifikation mit dem Primerpaar FAM-cl-1a-f/r und RsaI-Verdau darstellte (Abb. 15). Ein weiterer Substrat-abhängiger Unterschied in der Transkription der *rdhA* Gene wurde im t-RFLP Profil des Clusters 4a sichtbar. In Gegenwart von 1,2,3-TrCB wiesen die t-RFs der Gene *cbdbA187* und *cbdbA1539* im cDNA Profil ähnliche absolute Peakflächen auf. In dem cDNA Profil in Gegenwart von 1,2,4-TrCB und im t-RFLP Profil genomischer DNA lag der Anteil von *cbdbA187* an der Gesamtpeakfläche (Summe der Peakflächen aller detektierten t-RFs von *rdhA* Genen oder Transkripten) nur bei durchschnittlich 12 % (Abb. 15). Das deutet darauf hin, dass die Transkription von *cbdbA187* in Gegenwart von 1,2,3-TrCB induziert wurde. In den t-RFLP Profilen des Clusters 2a besaß *cbrA* sowohl in Kulturen mit 1,2,3- als auch mit 1,2,4-TrCB den mit Abstand höchsten Anteil aller detektierten t-RFs (Abb. 15).

Basierend auf den Ergebnissen dieses Versuchs wurden erste *rdhA* Gene für quantitative Analysen durch RT-qPCR ausgewählt. Dazu gehörten die Gene *cbdbA1453*, *cbdbA1624*, *cbrA*, *cbdbA1618* und *cbdbA187*.

3.3.2.2 Amplifikation der *rdhA* Transkripte mit den Primerpaaren, die PCR-Produkte bis zu einer Länge von 650 bp ergaben

Exemplarisch werden im Folgenden die Ergebnisse eines Versuches gezeigt, in dem Stamm CBDB1 auf 1,2,4-TrCB vorkultiviert wurde. In Anhang 8 und 9 sind die entsprechenden Daten nach Vorkultivierung auf 1,2,3-TrCB gezeigt. Die Peakflächen aller analysierten t-RFs beider Versuche sind in den Anhängen 10 und 11 dargestellt.

3.3.2.2.1 Dechlorierung von 1,2,3- und 1,2,4-Trichlorbenzol

1,2,3-TrCB wurde ausschließlich zu 1,3-Dichlorbenzol (54 μM) umgesetzt, während 1,2,4-TrCB zu einer Mischung aus 33 % 1,3-DCB (11 μM) und 67 % 1,4-DCB (22 μM) dechloriert wurde (Abb. 16). Parallel zum Dechlorierungsprozess wurde der Verlauf der 16S rRNA Genkopienzahl durch quantitative PCR verfolgt (Abb. 16). Im Laufe der ersten 72 Stunden aktiver Dechlorierung war sie in Gegenwart beider Elektronenakzeptoren konstant. Mit 1,2,3-TrCB blieb die 16S rRNA Genkopienzahl auch darüber hinaus konstant, in Gegenwart von 1,2,4-TrCB fiel sie jedoch leicht ab.

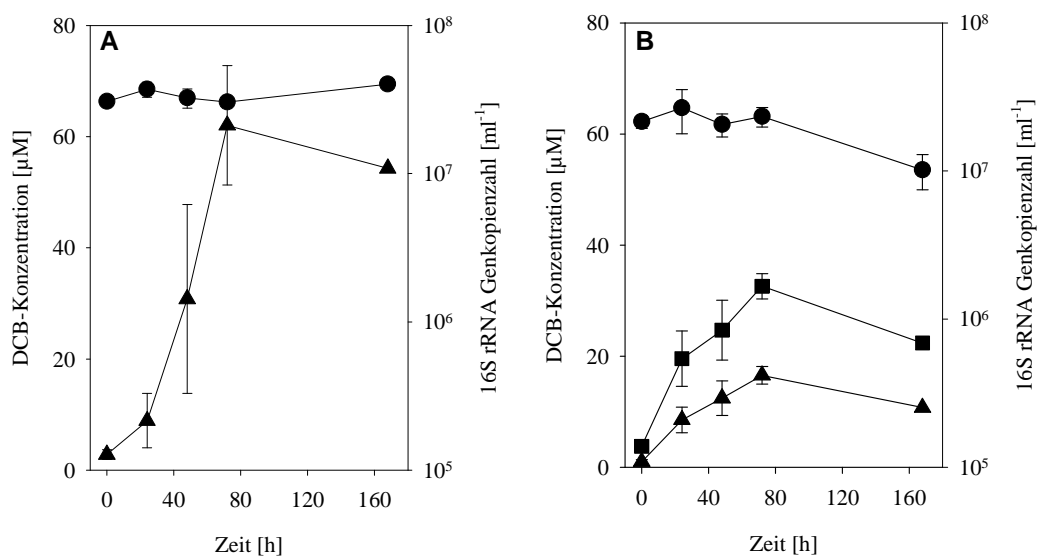


Abb. 16. Reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TrCB (A) und 1,2,4-TrCB (B) und der Verlauf der 16S rRNA Genkopienzahl (●). Die Dechlorierungsaktivität ist anhand der Bildung der Dechlorierungsprodukte 1,3-DCB (▲) und 1,4-DCB (■) dargestellt.

3.3.2.2.2 Transkription der *rdhA* Gene im Verlauf der Dechlorierung von 1,2,3- und 1,2,4-TrCB

Nach einer 72 stündigen Phase ohne TrCB wurden je fünf parallele Kulturen entweder mit 1,2,3- oder 1,2,4-TrCB versetzt. Direkt nach Zugabe der TrCBs bzw. nach 24, 48, 72 und 168 h wurden Einzelkulturen zufällig ausgewählt und zur Nukleinsäureextraktion (RNA, DNA) komplett aufgearbeitet. Nach RNA-Präparation, DNaseI-Behandlung und reverser Transkription wurden die *rdhA* Transkripte des Stammes CBDB1 mit den 13 degenerierten und spezifischen Primerpaaren nachgewiesen, die PCR-Produkte bis zu einer Länge von 650 bp ergaben (Tab. 8). Zum Zeitpunkt 0 waren keine oder nur geringe Mengen an RT-PCR-Produkten in 1%igen Agarosegelen nachweisbar (Abb. 17 A, B). Nach 24 h oder spätestens 48 h wurden RT-PCR-Produkte mit allen Primerpaaren, mit Ausnahme des Primerpaars cluster 3_f/r, erhalten. Die Intensität der Banden, die die einzelnen *rdhA* Transkripte repräsentierten, war nahezu konstant im Zeitraum zwischen 24 und 72 h, nahm aber 168 h nach der Induktion stark ab. Diese Verringerung der *rdhA* Transkriptmenge korrelierte mit der Tatsache, dass nach 72 h keine Dechlorierungsaktivität mehr in den Kulturen nachweisbar war (Abb. 16).

Mit dem Primerpaar cluster 3_f/r wurden in keinem der Experimente PCR-Produkte an cDNA amplifiziert, während es an Gesamt-DNA des Stammes CBDB1 stets gelang, ein Amplifikat zu erhalten. Um abzuschätzen, ob dieses Ergebnis durch eine sehr hohe Nachweisgrenze

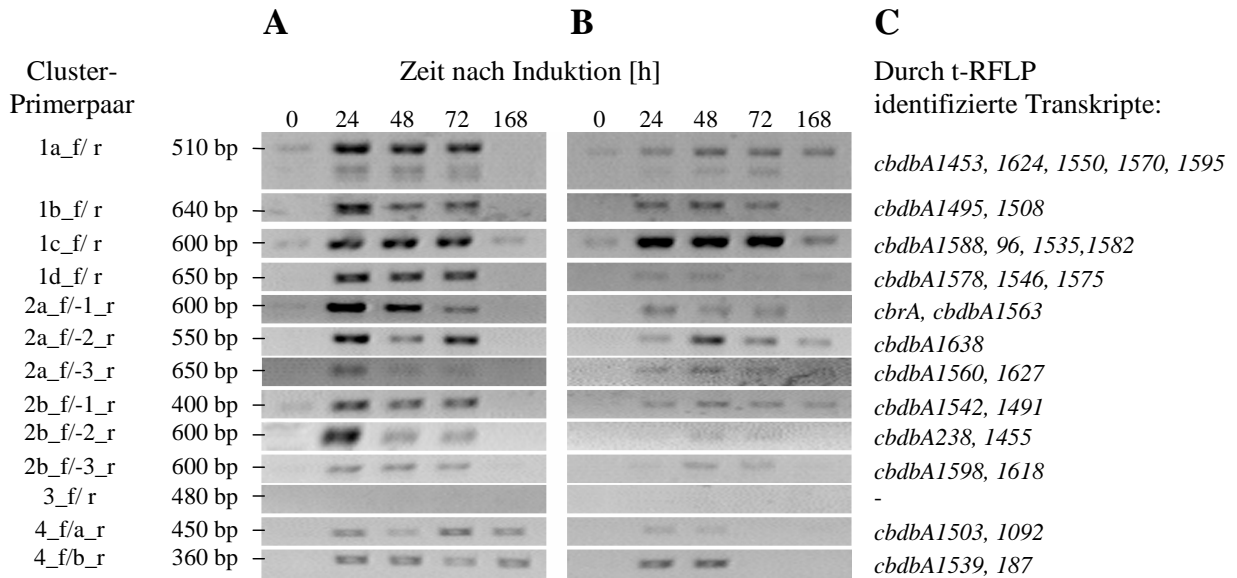


Abb. 17. Die zusammengefügte Abbildung zeigt Teile von 1%igen Agarose-Gelen beladen mit RT-PCR-Produkten, die mit 13 degenerierten und spezifischen Primerpaaren amplifiziert wurden. Als *template* für die PCR dienten cDNAs aus Kulturen, die zum Zeitpunkt 0 mit 1,2,3-TrCB (A) oder 1,2,4-TrCB (B) versetzt wurden. Die Größe der PCR-Produkte wurde anhand eines DNA-Markers bestimmt und ist links neben den Gelausschnitten dargestellt. T-RFLP Analysen von PCR-Produkten, die zum Zeitpunkt 48 h nach Induktion amplifiziert wurden, ergaben die Transkription von 29 der 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 in beiden Kulturvarianten (C).

dieses Primerpaars bedingt war, wurde diese an genomischer DNA des Stammes CBDB1 bestimmt und mit der des cluster 4_f/b_r Primerpaars verglichen, das in allen Versuchen zur Amplifikation von *rdhA* Genen an cDNA geführt hatte. Dazu wurde zunächst die Kopienzahl des Genoms in isolierter Gesamt-DNA (3×10^8 Kopien/ml) mittels quantitativer PCR mit den 16S rDNA-gerichteten Primern DET-539f/DET-731r bestimmt. Darauf folgend wurde die Gesamt-DNA in 10er Schritten bis zu 3×10^0 Genomkopien/ μ l verdünnt. Ein Mikroliter jeder Verdünnung diente als *template* für die PCR mit den Primerpaaren cluster 3_f/r und cluster 4_f/b_r. Im Vergleich zum Primerpaar cluster 4_f/b_r führte das Primerpaar cluster 3_f/r noch mit 10-fach niedrigeren DNA Konzentrationen (3×10^4 Kopien/ml) zur Bildung von Amplifikaten. Das lässt vermuten, dass die im cluster 3 zusammengefassten *rdhA* Gene tatsächlich nicht oder nur auf niedrigem Niveau transkribiert wurden. Letzteres wurde später in quantitativen RT-PCR Analysen mit spezifischen Primern gezeigt (Kap. 3.3.2.2.3; Anhang 12).

T-RFLP Analysen der 6-FAM-markierten RT-PCR-Produkte aus beiden Kulturvarianten (48 h nach Induktion) zeigten, dass 29 der 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 transkribiert wurden (Abb. 17 C). Obwohl im Vergleich beider Versuchsvarianten (1,2,3-TrCB oder 1,2,4-TrCB als Induktor) keine Unterschiede in der Zahl der induzierten *rdhA* Gene festgestellt wurden, variierte die relative Häufigkeit dreier *rdhA* Transkripte in Abhängigkeit

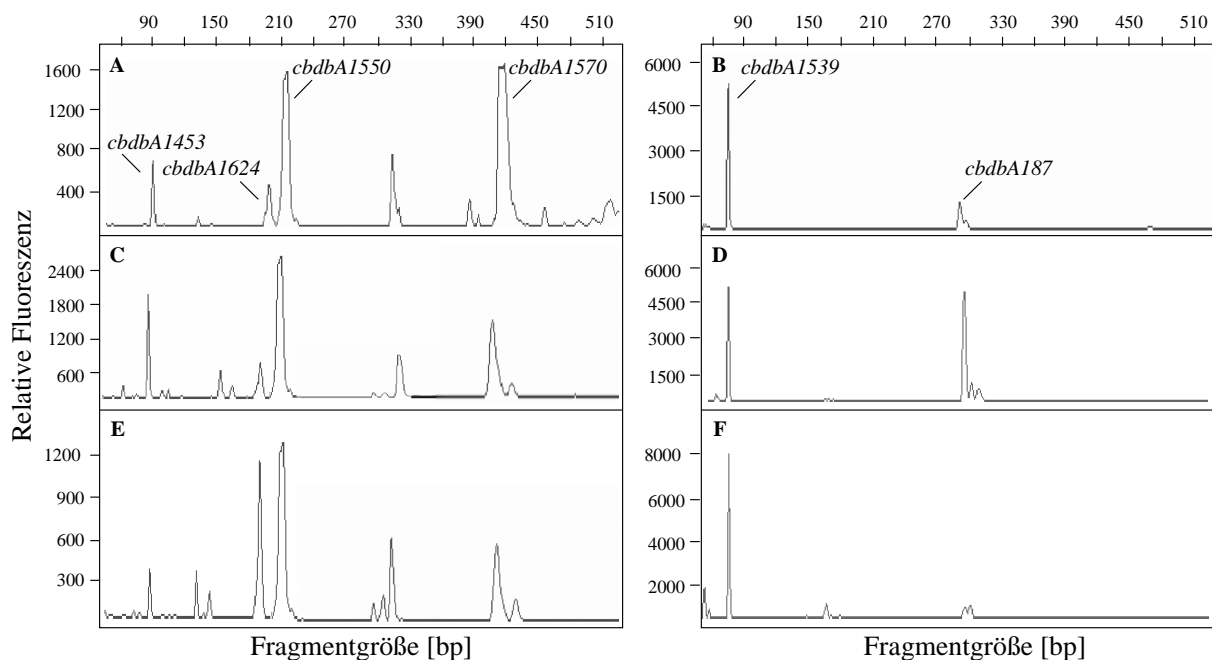


Abb. 18. T-RFLP Profile von genomischer DNA des Stammes CBDB1 (A, B) oder cDNA, die aus Kulturen stammt, die mit 1,2,3-TrCB (C, D) oder 1,2,4-TrCB inkubiert wurden (E, F). Die analysierten PCR-Produkte wurden mit den Primerpaaren cluster 1a_f/r (linke Reihe) und cluster 4_f/b_r (rechte Reihe) amplifiziert und folgend mit den Enzymen RsaI (linke Reihe) oder AluI (rechte Reihe) verdaut.

vom zugegebenen Trichlorbenzol (Abb. 18). Als relative Häufigkeit wurde der Anteil der Peakfläche des spezifischen t-RFs eines *rdhA* Transkripts an der Gesamtpeakfläche aller identifizierten t-RFs von *rdhA* Genen in einem t-RFLP Profil bezeichnet. Die relativen Peakflächen der t-RFs der *rdhA* Transkripte wurden mit t-RFLP Profilen genomischer DNA verglichen (Anhang 13), da hier die relativen PCR-Effizienzen des entsprechenden Primerpaars für die einzelnen Ziel-*rdhA* Gene wiedergeben werden. Die Gene *cbdbA1453* und *cbdbA187* wurden stärker transkribiert in Gegenwart von 1,2,3-TrCB, während *cbdbA1624* verstärkt in der Anwesenheit von 1,2,4-TrCB exprimiert wurde (Abb. 18). Das *rdhA* Gen *cbrA* zeigte nach Amplifikation mit dem Primerpaar cluster 2a_f/-1_r und AluI-Verdau in cDNA t-RFLP Profilen nach Induktion mit 1,2,3- oder 1,2,4-TrCB einen höheren relativen Anteil gegenüber *cbdbA1563* als in den t-RFLP Profilen von Gesamt-DNA (Anhang 14). Während die relative Peakfläche von *cbrA* in Profilen genomischer DNA bei durchschnittlich 42 % lag, hatte es in cDNA Profilen durchschnittlich einen Anteil von über 70 %.

Um den Einfluss des Lösungsmittels Aceton auf die *rdhA* Expression zu untersuchen, wurden parallel Kontrollen angesetzt, die mit entsprechenden Mengen an Aceton versetzt wurden. Die Transkription der *rdhA* Gene wurde mittels RT-PCR und t-RFLP analysiert. Mit zwei Primerpaaren (cluster 1a, 1c) wurden RT-PCR-Produkte bereits zu Beginn des Versuches amplifi-

ziert. Eine Induktion der Transkription wurde allerdings über den gesamten Versuchsablauf nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

3.3.2.2.3 Transkriptionsniveau der *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 in Gegenwart von 1,2,3- und 1,2,4-TrCB

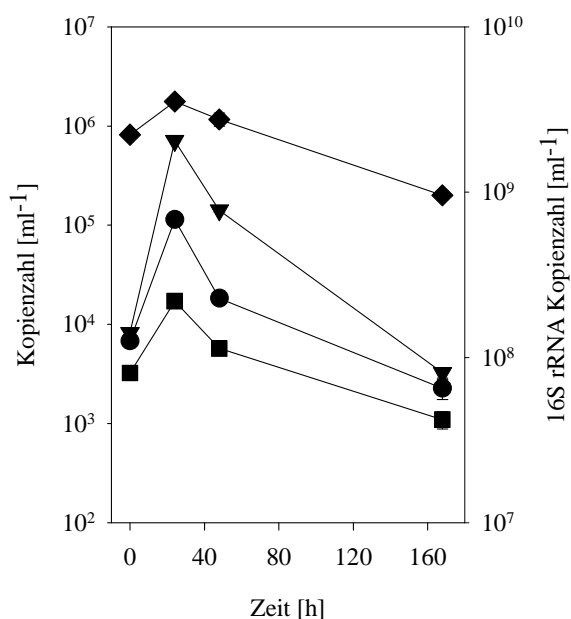


Abb. 19. Transkriptionsprofile der *housekeeping* Gene *tuf* (▼), *rpoA* (●) und *rpoB* (■) (linke Achse) und des 16S rRNA Gens (◆, rechte Achse) im Verlauf des Wachstum mit 1,2,3-TrCB. Mittelwerte und Standardabweichungen (oft kleiner als die Symbole) sind für 2 parallele PCR-Reaktionen gezeigt.

In vorangegangenen Transkriptionsanalysen von *rdhA* Genen in *Dehalococcoides* sp. wurden bislang zwei verschiedene Standards verwendet, um die Transkriptionsniveaus der *rdhA* Gene zu normalisieren. Die Kopienzahl der *rdhA* Transkripte wurde entweder bezogen auf das Transkriptionsniveau des *rpoB* Gens (Morris *et al.*, 2006; Rahm *et al.*, 2006 b; Fung *et al.*, 2007) oder auf die Kopienzahl des entsprechenden *rdhA* Gens (Johnson *et al.*, 2005 a; Johnson *et al.*, 2005 b; Lee *et al.*, 2006). Um einen geeigneten Standard für die Quantifizierung der *rdhA* Transkriptmengen von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 zu finden, wurde die Transkription dreier *housekeeping* Gene (*tuf*, *rpoA*, *rpoB*, kodieren den Translationselongationsfaktor

TU und die beiden Untereinheiten der RNA-Polymerase) und des 16S rRNA Gens mittels RT-qPCR in mit 1,2,3-TrCB versetzten Kulturen analysiert. Es zeigte sich, dass die Kopienzahl der *rpoB*, *rpoA* und *tuf* Transkripte innerhalb von 24 h nach Zugabe von 1,2,3-TrCB um das 10 bis 100 fache anstieg (Abb. 19). Ausgehend von einer mehrere Größenordnungen höheren Ausgangs-Transkriptmenge nahm die 16S rRNA Kopienzahl ebenfalls zu, allerdings nur um einen Faktor von 1,6. Die relativ konstante Kopienzahl des 16S rRNA Gens (Abb. 16) lässt vermuten, dass Änderungen in der Kopienzahl der *housekeeping* Gen-Transkripte Unterschiede in der Transkriptionsrate darstellen und nicht eine Zunahme der Zellzahl widerspiegeln. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zellzahl-basierter Ansatz zur Normalisierung der Transkriptionsdaten gewählt. Dazu wurde die Kopienzahl der *rdhA* Transkripte auf die Kopienzahl der entsprechenden *rdhA* Gene

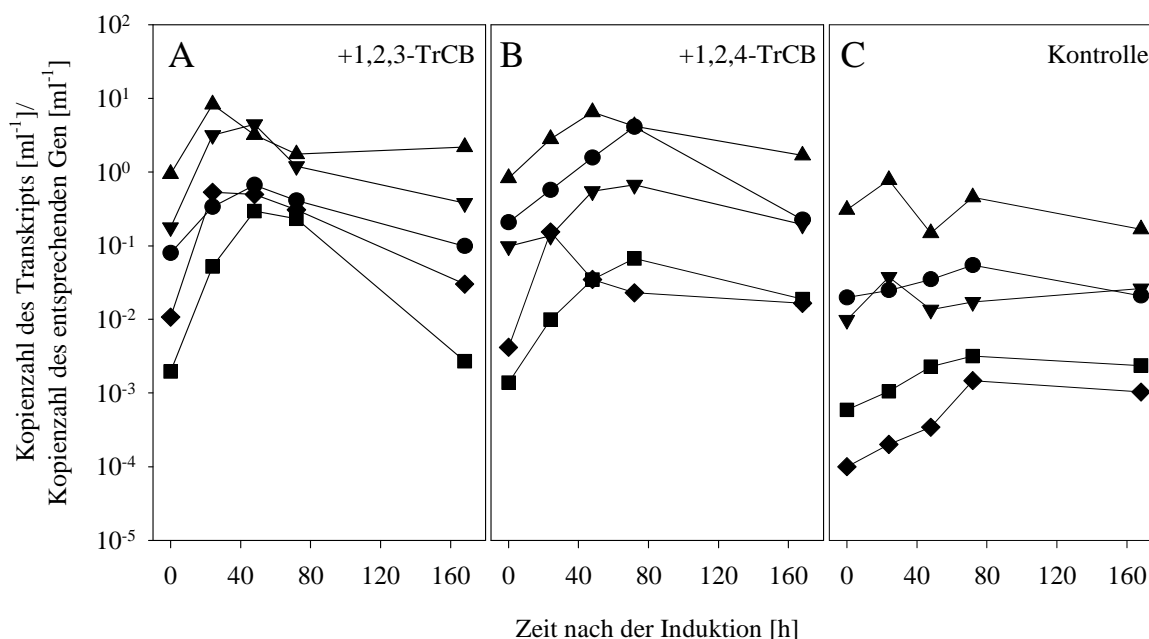


Abb. 20. Quantitative Transkriptionsanalyse ausgewählter *rdhA* Gene (*cbrA* (▲), *cbdbA1624* (●), *cbdbA1453* (▼), *cbdbA1588* (■) und *cbdbA187* (◆)) des Stammes CBDB1 nach Kultivierung mit 1,2,3-TrCB (A), 1,2,4-TrCB (B) oder Aceton (Kontrolle, C). Die Kulturen wurden 10%ig mit Zellen beimpft, die in Zweiflüssigphasenkulturen mit 1,2,4-TrCB angezogen wurden.

bezogen. So konnten die Transkriptmengen verschiedener *rdhA* Gene trotz unterschiedlicher Amplifikationseffizienzen verschiedener Primerpaare und Zielgene direkt miteinander verglichen werden.

Der zeitliche Verlauf der Transkription der *rdhA* Gene *cbdbA1624*, *cbdbA1453*, *cbdbA1618* und *cbdbA187* wurde aufgrund der Substrat-spezifischen Unterschiede in der Expression (Abb. 15, 18, Anhang 7) durch RT-qPCR in 1,2,3- und 1,2,4-TrCB induzierten Kulturen näher analysiert. Außerdem wurde die Expression der Gene *cbrA* und *cbdbA1563* untersucht, da die relative Peakfläche von *cbrA* bezogen auf *cbdbA1563* in t-RFLP Profilen von cDNA höher war als in den entsprechenden Profilen genomischer DNA (Kap. 3.3.2.2.2, Anhang 14). Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass *cbrA* für eine Trichlorbenzol-RdhA kodiert (Adrian *et al.*, 2007 b). Ein weiteres analysiertes Gen war *cbdbA1588*, dessen orthologes Gen in *Dehalococcoides ethenogenes* für eine PCE- und putative 2,3-Dichlorphenol-RdhA kodiert (Fung *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2007). Die Gene *cbdbA243*, *cbdbA80* und *cbdbA88* wurden untersucht, da die entsprechenden Transkripte mit dem degenerierten Primerpaar cluster 3_f/r nicht amplifiziert werden konnten.

Die meisten untersuchten *rdhA* Transkripte zeigten sowohl mit 1,2,3- als auch mit 1,2,4-TrCB einen Anstieg des Transkriptionsniveaus um mindestens eine Zehnerpotenz innerhalb der ersten 24 h und in der Regel auch einen weiteren Anstieg bis zu 72 h (Abb. 20 A, B). Solange eine aktive Dechlorierung zu beobachten war (Abb. 16), blieben auch die Transkriptmengen

relativ hoch. Nach Induktion mit beiden untersuchten chlorierten Elektronenakzeptoren zeigte *cbrA* das höchste Transkriptionsniveau aller analysierten *rdhA* Gene. Die zweithöchste Expression wiesen *cbdbA1453* in Kulturen mit 1,2,3-TrCB bzw. *cbdbA1624* in Kulturen mit 1,2,4-TrCB auf. Diese Abhängigkeit der Transkriptionsniveaus vom verwendeten Substrat bestätigten die Ergebnisse der t-RFLP (Abb. 15, 18). Die t-RFLP Ergebnisse wurden auch in Bezug auf *cbdbA187* verifiziert, denn dieses Gen wurde in Gegenwart von 1,2,3-TrCB stärker transkribiert als mit 1,2,4-TrCB.

Eine interessante Beobachtung war, dass alle untersuchten *rdhA* Gene unterschiedliche initiale Transkriptmengen besaßen. Während *cbrA*, *cbdbA1624* und/oder *cbdbA1453* ähnliche Anfangswerte zeigten, lagen die Transkriptmengen der Gene *cbdbA187*, *cbdbA1588* (Abb. 20) und *cbdbA1563* (Daten nicht gezeigt) zum selben Zeitpunkt eine bis vier Größenordnungen unterhalb dieser Werte. Nach 168 h der Kultivierung befanden sich die Endwerte in etwa im Bereich des Ausgangsniveaus.

Die mit dem Primerpaar cluster 3_f/r nicht detektierbaren *rdhA* Transkripte *cbdbA243*, *cbdbA80* und *cbdbA88* wurden zusätzlich mittels RT-qPCR analysiert. Alle drei Gene wiesen Transkriptkopienzahlen von 10^{-4} bis 10^{-3} pro Genkopienzahl zu Beginn des Versuches auf. Trotz Induktion der Transkription um eine bis zwei Größenordnungen waren auch nach 48 h nur geringe Transkriptmengen der drei *rdhA* Gene nachweisbar (Anhang 12). Die Transkriptionsniveaus lagen in etwa im Bereich des Gens *cbdbA1588*.

Um einen Einfluss des Lösungsmittels Aceton auf die Expression der *rdhA* Gene auszuschließen, wurden Kontrollkulturen anstelle des TrCB/Aceton-Gemisches nur mit Aceton versetzt. Die Transkriptionsniveaus der untersuchten *rdhA* Gene zeigten in diesen Kulturen über den Versuchsverlauf nur geringe Unterschiede (Abb. 20 C). Ein leichter Anstieg im Transkriptionsniveau wurde bei *cbdbA1624*, *cbdbA187* und *cbdbA1588* beobachtet. Dieser Anstieg war aber im Vergleich zum Anstieg in den mit TrCB versetzten Kulturen gering. Interessanterweise waren die Transkripte auf ähnlich niedrigem Niveau noch nach 240 h Inkubation ohne TrCB (72 stündige Hungerphase nach dem Inokulieren und 168 h während des Versuchs) nachweisbar.

Um den Einfluss des in der Vorkultur genutzten chlorierten Substrates auf die *rdhA* Expression zu testen, wurden vergleichbare Experimente mit 1,2,3-TrCB-haltigen Vorkulturen durchgeführt. Diese Vorkulturen dienten als Inokulum für Kulturen mit 1,2,3-TrCB oder 1,2,4-TrCB in den Transkriptionsanalysen. In diesem Ansatz wurden in Bezug auf die Zahl der transkribierten Gene und die Transkriptionsniveaus der untersuchten Gene ähnliche Ergebnisse erhalten wie in dem Ansatz mit 1,2,4-TrCB-haltigen Vorkulturen.

RT-PCR t-RFLP und RT-qPCR Analysen zeigten, die Expression aller 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 nach Induktion mit 1,2,3- bzw. 1,2,4-TrCB (Anhang 8, 9, 11, 12). Im RT-qPCR Ansatz wurde zusätzlich das Transkriptionsniveau des Gens *cbdbA1618* bestimmt. Dieses Gen wurde unter beiden Kultivierungsbedingungen (1,2,3-TrCB oder 1,2,4-TrCB) induziert, zeigte aber vergleichsweise niedrige Transkriptionsniveaus (Anhang 9).

3.3.3 Transkriptionsanalysen mit 2,3-DCDD und 1,3-DCDD

Für die Untersuchung der Induktion der *rdhA* Gen-Transkription durch 2,3- und 1,3-DCDD war ein verändertes Versuchsregime notwendig, da die Dioxine in Aceton so schlecht löslich waren, dass sie nicht direkt in einer kleinen Acetonmenge zugesetzt werden konnten. Deshalb wurden die Dioxine in einer Acetonlösung in die leeren Röhrchen überführt. Erst nach dem Abdampfen des Acetons wurde das Medium zugegeben. So mussten die Transkriptionsexperimente mit dem Beimpfen der Kulturen gestartet werden. Die Transkriptionsversuche basierten auf Vorkulturen mit 1,2,3-TrCB (Zweiflüssigphasenkulturen). Während der Transkriptionsversuche mit 40 μM 2,3- oder 1,3-DCDD wurden zu jedem Probenahmezeitpunkt zwei parallele 50 ml-Kulturen aufgearbeitet. Die Messung der Dioxinkonzentration erfolgte nicht in den 50 ml Kulturen, sondern in parallel angesetzten 3 ml-Kulturen, von denen ebenfalls jeweils zwei zu jedem Probenahmezeitpunkt aufgearbeitet wurden. Um eine DCDD-unabhängige Expression der *rdhA* Gene auszuschließen, wurden Kulturen ohne chlorierte Dioxine mitgeführt. Zu jedem Probenahmezeitpunkt wurde eine Einzelkultur dieser Kontrollkulturen aufgearbeitet.

3.3.3.1 Dechlorierung von 2,3- und 1,3-DCDD

Die Dechlorierung von 2,3- und 1,3-DCDD durch Stamm CBDB1 führte zur Bildung von 2-MCDD, wenn die Kulturen mit 1,2,3-TrCB vorinkubierten Zellen beimpft wurden (Abb. 21 A, B). Circa 12 μM 2,3-DCDD wurden im Verlauf von 168 h vollständig zu 2-MCDD umgesetzt, während im selben Zeitraum rund 25 μM 1,3-DCDD zu 10 μM 2-MCDD dechloriert wurden. Zellen, die auf 2,3-DCDD kultiviert wurden, behielten die Fähigkeit 2,3-DCDD zu dechlorieren auch nach Überführung in einen 2. Transfer (Abb. 21 C). Zellen, die auf 1,3-DCDD vorkultiviert wurden, zeigten hingegen in einer 2. Passage keine Dechlorierungsaktivität mehr gegenüber 1,3-DCDD (Abb. 21 C). Wenn die mit 1,3-DCDD vorinkubierten Zellen allerdings in eine Kultur mit 2,3-DCDD überführt wurden,

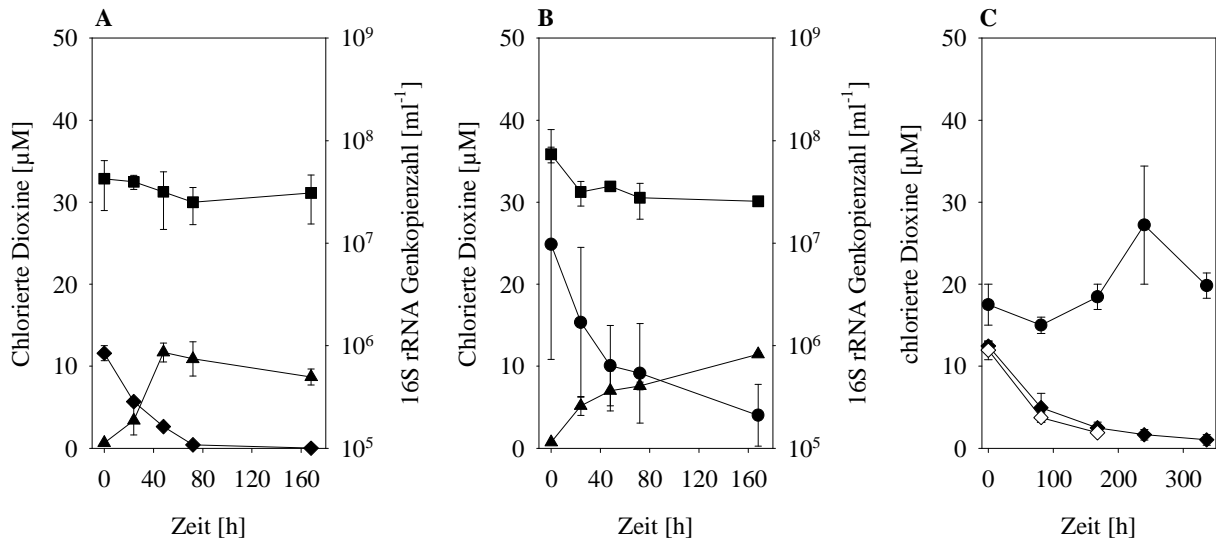
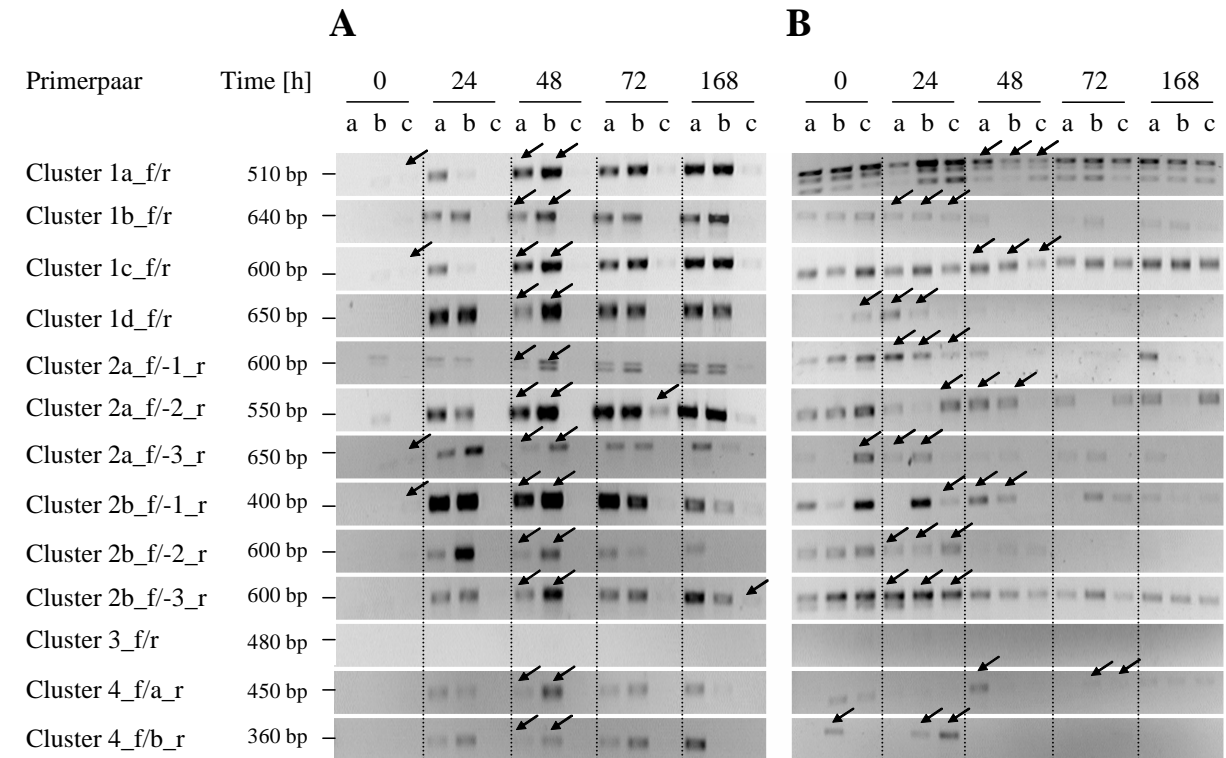


Abb. 21. Dechlorierung von 2,3-DCDD (◆, ◇) und 1,3-DCDD (●) über zwei Passagen durch Stamm CBDB1 und Verlauf der Kopienzahl des 16S rRNA Gens (■). (A) 2,3-DCDD-Dechlorierung zu 2-MCDD (▲) und Kopienzahl des 16S rRNA Gens in der 1. Passage. (B) 1,3-DCDD-Dechlorierung zu 2-MCDD (▲) und Kopienzahl des 16S rRNA Gens in der 1. Passage. (C) Dechlorierung von 2,3-DCDD und 1,3-DCDD in der 2. Passage: 1,3-DCDD nach Vorkultur mit 1,3-DCDD (●), 2,3-DCDD nach Vorkultur mit 1,3-DCDD (◇), 2,3-DCDD nach Vorkultur mit 2,3-DCDD (◆). Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammten aus der Analyse von parallelen Kulturen.

wiesen sie keine Einschränkungen in der Dechlorierungsaktivität auf (Abb. 21 C). Während 2,3-DCDD von Stamm CBDB1 metabolisch umgesetzt wurde, war die Dechlorierung von 1,3-DCDD nur in Gegenwart eines Wachstumssubstrates möglich. Wie gaschromatographische Messungen zeigten, beruhte die in der 1. Passage verzeichnete Dechlorierung von 1,3-DCDD auf einer Überführung von 1,2,3-TrCB aus der Vorkultur (Daten nicht gezeigt). Die Kopienzahl des 16S rRNA Gens wurde im Verlauf der Dechlorierung von 2,3-DCDD und 1,3-DCDD im 1. Transfer nach Wachstum mit 1,2,3-TrCB mittels quantitativer PCR bestimmt (Abb. 21 A, B). Die 16S rRNA Genkopienzahl blieb während der Dechlorierung von 2,3-DCDD weitgehend konstant, während sie nach Zugabe von 1,3-DCDD innerhalb der ersten 24 h absank und dann stabil blieb.

3.3.3.2 Transkription der *rdhA* Gene während der Dechlorierung von 2,3-DCDD und 1,3-DCDD

Die Transkriptionsanalysen mit 2,3- bzw. 1,3-DCDD wurden mit dem Beimpfen von je 10 parallelen Kulturen gestartet. Wie bereits erläutert, gab es keine Hungerphase ohne chlorierten Elektronenakzeptor. Direkt nach dem Inokulieren, nach 24 h, 48 h, 72 h und 168 h wurden je Substrat zufällig zwei parallele Kulturen und je Kontrolle eine Kultur ausgewählt und zur



C Durch t-RFLP identifizierte Transkripte:

Primerpaar	mit 2,3-DCDD (a, b-2 Parallelen)	Kontrolle (c-Einzelansatz)	mit 1,3-DCDD (a, b-2 Parallelen)	Kontrolle (c-Einzelansatz)
Cluster 1a_f/r	<i>cbdbA1453, 1624, 1550, 1570, 1595</i>	<i>cbdbA1453, 1624, 1550, 1570, 1595</i>	<i>cbdbA1453, 1624, 1550, 1570, 1595</i>	<i>cbdbA1453, 1624, 1550, 1570, 1595</i>
Cluster 1b_f/r	<i>cbdbA1495, 1508</i>	-	<i>cbdbA1495, 1508</i>	<i>cbdbA1495, 1508</i>
Cluster 1c_f/r	<i>cbdbA1588, 96, 1535, 1582</i>	<i>cbdbA1588, 96, 1535, 1582</i>	<i>cbdbA1588, 96, 1535, 1582</i>	<i>cbdbA1588, 96, 1535, 1582</i>
Cluster 1d_f/r	<i>cbdbA1578, 1546, 1575</i>	-	<i>cbdbA1575</i>	<i>cbdbA1575</i>
Cluster 2a_f/-1_r	<i>cbrA, 1563</i>	-	<i>cbrA, 1563</i>	<i>cbrA, 1563</i>
Cluster 2a_f/-2_r	<i>cbdbA1638</i>	<i>cbdbA1638</i>	<i>cbdbA1638</i>	<i>cbdbA1638</i>
Cluster 2a_f/-3_r	<i>cbdbA1560, 1627</i>	<i>cbdbA1560</i>	<i>cbdbA1560</i>	<i>cbdbA1560</i>
Cluster 2b_f/-1_r	<i>cbdbA1542, 1491</i>	<i>cbdbA1542, 1491</i>	<i>cbdbA1542, 1491</i>	-
Cluster 2b_f/-2_r	<i>cbdbA238, 1455</i>	-	<i>cbdbA1455</i>	<i>cbdbA238, 1455</i>
Cluster 2b_f/-3_r	<i>cbdbA1598, 1618</i>	<i>cbdbA1598, 1618</i>	<i>cbdbA1598, 1618</i>	<i>cbdbA1598, 1618</i>
Cluster 3_f/r	-	-	-	-
Cluster 4_f/a_r	<i>cbdbA1503, 1092</i>	-	<i>cbdbA1503</i>	<i>cbdbA1503</i>
Cluster 4_f/b_r	<i>cbdbA1539, 187</i>	-	<i>cbdbA1539, 187</i>	<i>cbdbA1539, 187</i>

Abb. 22. RT-PCR-Produkte bis zu einer Länge von 650 bp, die mit 13 degenerierten und spezifischen Primerpaaren amplifiziert wurden (A, B) und die Zuordnung von *rdhA* Genen zu diesen Amplifikaten nach den t-RFLP Analysen (C). Als *template* für die PCR diente cDNA aus je zwei parallelen Kulturen (a, b) pro Probenahmezeitpunkt, die mit 2,3-DCDD (A) oder 1,3-DCDD (B) kultiviert wurden. Als Kontrollen dienten Kulturen, die ohne DCDD inkubiert wurden (c). Von den Kontrollkulturen wurde zu jedem Probenahmezeitpunkt eine Kultur aufgearbeitet. Die Größe der RT-PCR-Produkte wurde anhand eines DNA-Markers bestimmt und ist links neben den Gelausschnitten dargestellt. Die Pfeile geben an, dass die entsprechenden PCR-Produkte durch t-RFLP Analysen näher charakterisiert wurden.

Präparation der Nukleinsäuren (DNA, RNA) vollständig aufgearbeitet. Nach RNA-Extraktion, DNaseI Behandlung und reverser Transkription wurden mit 13 degenerierten und spezifischen Primerpaaren PCR-Produkte an der cDNA amplifiziert, die eine Länge von bis zu 650 bp besaßen (Tab. 8). Die absoluten Peakflächen aller detektierten t-RFs sind in Anhang 15 und 16 zusammengefasst.

Mit 2,3-DCDD wurde zum Zeitpunkt 0 kein oder nur wenig RT-PCR-Produkt in 1%igen Agarosegelen nachgewiesen (Abb. 22 A). Nach 24 h wurden mit 12 der 13 verwendeten Primerpaare PCR-Produkte amplifiziert. Mit dem Primerpaar cluster 3_f/r konnten über den gesamten Versuchsverlauf keine RT-PCR-Produkte identifiziert werden. Die Intensität der Banden, die einzelne *rdhA* Transkriptgruppen repräsentierten, war im Zeitraum zwischen 24 h und dem Ende des Versuches konstant. Obwohl 2,3-DCDD bereits nach 72 h vollständig zum 2-MCDD umgesetzt worden war (Abb. 21), gab es keinen Abfall in der Bandenintensität (Abb. 22 A). Das könnte eventuell auf Unterschiede in der Dechlorierungsgeschwindigkeit in den 50 ml-Kulturen im Vergleich zu den gemessenen parallelen 3 ml-Kulturen hindeuten. Die Analyse der in Abb. 22 A mit Pfeilen gekennzeichneten 6-FAM-markierten RT-PCR-Produkte mittels t-RFLP ergab die Transkription von 29 der 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 in beiden parallel analysierten Kulturen.

In den Kulturen mit 1,3-DCDD wurden bereits direkt zu Beginn des Versuches RT-PCR-Produkte (Länge bis 650 bp) mit 12 der degenerierten und spezifischen Primerpaare amplifiziert (Abb. 22 B). Auf mögliche Ursachen wird später eingegangen. Mit Primerpaar cluster 3_f/r wurden erneut keine Amplifikate an cDNA erhalten. Mit den Cluster-Primerpaaren 1a_f/r, 1c_f/r, 2a_f/-1_r und 2b_f/-3_r blieb die Bandenintensität der RT-PCR-Produkte über den gesamten Versuchsverlauf im wesentlichen konstant (Abb. 22 B). Die Bandenintensität aller weiteren PCR-Produkte nahm hingegen mit fortschreitender Zeit ab. Eine Zunahme in der Bandenintensität konnte nicht beobachtet werden. Demzufolge ist es unwahrscheinlich, dass 1,3-DCDD die Transkription von *rdhA* Genen induziert. Die Analyse einzelner RT-PCR-Produkte mittels t-RFLP zeigte, dass zu den untersuchten Zeitpunkten maximal 24 *rdhA* Gentranskripte nachweisbar waren (Abb. 22 C, Anhang 16). Da RT-PCR-Produkte bereits zu Beginn des Versuchs nachweisbar waren, sind die identifizierten *rdhA* Transkripte wahrscheinlich auf eine Induktion durch 1,2,3-TrCB in der Vorkultur zurückzuführen.

Im Vergleich der Primerpaar-spezifischen t-RFLP Profile zeigte sich, dass es außer den zum Teil fehlenden Transkripten in den Kulturen mit 1,3-DCDD kaum Unterschiede in den relativen Häufigkeiten der einzelnen t-RFs in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat

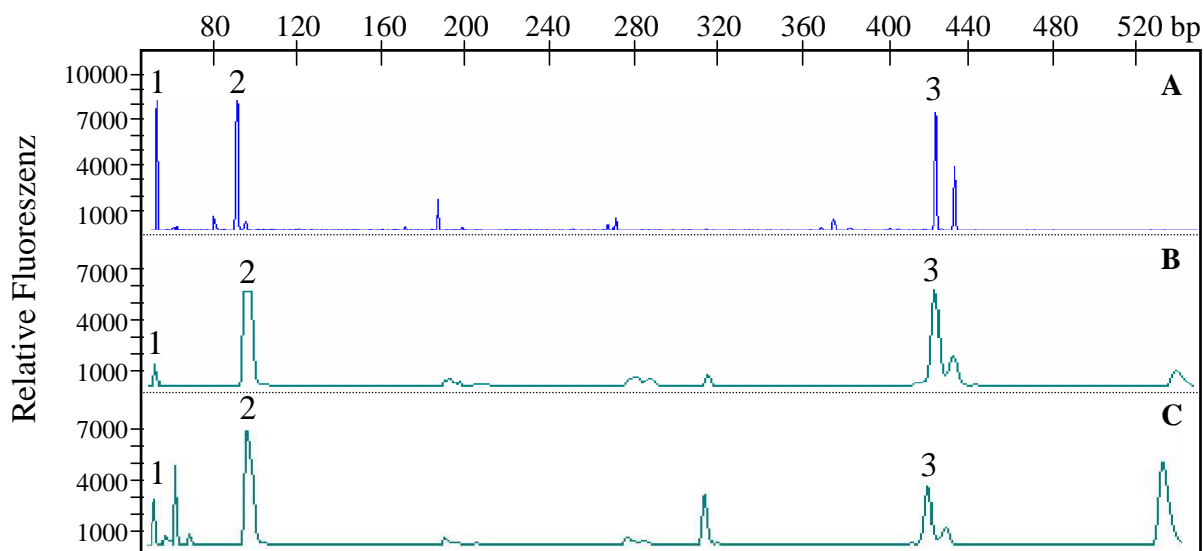


Abb. 23. T-RFLP Profile von RT-PCR-Produkten amplifiziert mit dem Primerpaar cluster 1c_f/r nach MspI Verdau. Als *template* für die PCR diente cDNA aus Kulturen mit 2,3-DCDD (A, siehe Abb. 22 A, 48h, a) oder 1,3-DCDD (B, siehe Abb. 22 B, 48 h, a) oder aus den Kontrollkulturen ohne chlorierten Elektronenakzeptor (C, siehe Abb. 22 B, 48 h, c). 1-t-RF des *cbdbA1588* Transkripts, 2-t-RF des *cbdbA1582* Transkripts, 3-t-RF des *cbdbA96* Transkripts

(1,3- oder 2,3-DCDD oder Kontrolle ohne chlorierte Verbindung) gab. Ein Unterschied war allerdings auffällig. Während in den Kulturen mit 1,3-DCDD oder den Kontrollkulturen (Abb. 23 B, C) der Anteil des t-RF, das das *cbdbA1588* Transkript repräsentierte, bezogen auf die Gesamtpeakfläche gering war (2 bis 7 %), betrug der Anteil in den Kulturen mit 2,3-DCDD zwischen 37 und 38 % (Abb. 23 A). Das deutet darauf hin, dass die Expression des Gens *cbdbA1588* in Gegenwart von 2,3-DCDD stark induziert wurde.

Um eine DCDD-unabhängige Transkription der *rdhA* Gene auszuschließen, wurden parallel zu jeder Versuchsreihe (1,3-DCDD oder 2,3-DCDD) Kontrollkulturen mitgeführt, die ohne chlorierten Elektronenakzeptor inkubiert wurden. In den Kontrollkulturen zur Reihe mit 2,3-DCDD wurde kein oder nur wenig RT-PCR-Produkt mit den 13 genutzten Primerpaaren an cDNA amplifiziert (Abb. 22 A). Zu Beginn des Versuches waren mit den Cluster-Primerpaaren cl1a_f/r, 1c_f/r, cl2a_f/-3_r, cl2b_f/-1_r schwache RT-PCR-Produkte nachweisbar. Nach Analyse dieser Produkte mittels t-RFLP wurden Transkripte von 12 *rdhA* Genen identifiziert (Abb. 22 C, Anhang 15). Diese Transkripte wurden allerdings nur zu Beginn des Versuchs identifiziert und sind deshalb wahrscheinlich auf eine Induktion in den Vorkulturen zurückzuführen. Nach 72 h und/oder 168 h wurden schwache RT-PCR-Produkte mit den Cluster-Primerpaaren 2a_f/-2_r und 2b_f/-3_r amplifiziert. Die Analyse der Amplifikate durch t-RFLP ergab, dass diese RT-PCR-Produkte drei *rdhA* Gene repräsentierten (Abb. 22 C, Anhang 15). Begründen lässt sich dieser Effekt möglicherweise durch die Aufarbeitung von Einzelkulturen, die unterschiedlich hohe initiale

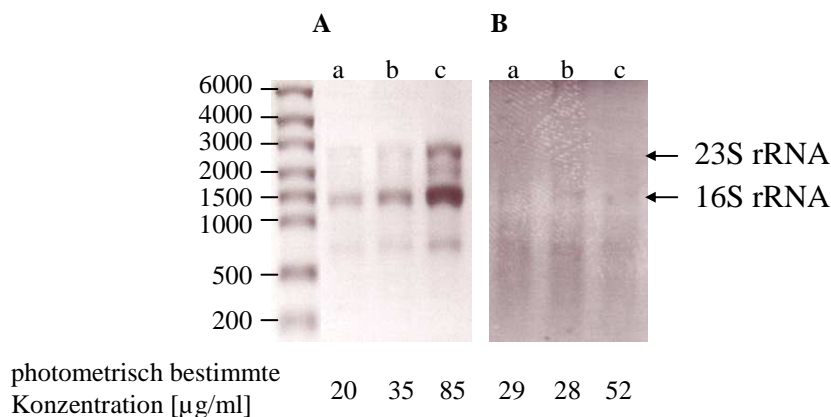


Abb. 24. Denaturierende Gelelektrophorese mit je 8 µl Gesamt-RNA von *Dehalococcoides* sp. CBDB1 nach Kultivierung auf 1,3-DCDD (A) und 2,3-DCDD (B) und die photometrisch bestimmten RNA-Konzentrationen. Die Zellernte der beiden Parallelen mit chloriertem Substrat (a, b) und der Kontrollkulturen ohne DCDD (c) erfolgte 24 h nach Start des Versuches. Als Größenstandard wurde der RiboRuler™ RNA Ladder, High Range (Fermentas) verwendet (links). Die Positionen der 16S und 23S rRNA sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Transkriptionsniveaus besessen haben können. Im Vergleich zu den Kulturen mit 2,3-DCDD wiesen die RT-PCR-Produkte der Kontrollkulturen eine wesentlich geringere Bandenintensität auf.

Die Kontrollen der 1,3-DCDD-Kulturen zeigten ein anderes Bild. Wie in den Kulturen mit 1,3-DCDD waren bereits zu Beginn des Versuches RT-PCR-Produkte mit 12 der genutzten Primerpaare nachweisbar (Abb. 22 B). Auch über den zeitlichen Verlauf wurden in den Kontrollkulturen Produkte mit der RT-PCR amplifiziert, die von der Bandenintensität her mit denen der Kulturen mit 1,3-DCDD vergleichbar waren. Mit einigen Primerpaaren blieb die Menge an amplifiziertem RT-PCR-Produkt über die Zeit konstant und mit anderen nahm die Bandenintensität der Amplifikate über die Zeit ab. Eine Induktion der Transkription war nicht zu beobachten. Die Analyse ausgewählter RT-PCR-Produkte (Abb. 22 B) mittels t-RFLP ergab den Nachweis von 23 *rdhA* Transkripten in den Kontrollkulturen (Abb. 22 C, Anhang 16).

Die Unterschiede zwischen den Kulturreihen mit 1,3- bzw. 2,3-DCDD (einschließlich der Kontrollen) bezüglich des initialen Transkriptionsniveaus lassen sich wahrscheinlich auf die in die reverse Transkription eingesetzten RNA-Mengen zurückführen. Die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration ergab zwar für beide Versuchsreihen ähnliche Werte, die Analyse der RNA-Gele ergab allerdings ein anderes Bild. In der Versuchsreihe mit 1,3-DCDD wurden im RNA-Gel wesentlich größere RNA-Mengen sichtbar (Abb. 24). Die Diskrepanz zwischen den photometrisch und im Gel bestimmten Konzentrationen beruht wahrscheinlich auf dem verwendeten Reduktionsmittel Ti-III-citrat. Photometrische Analysen

im Rahmen dieser Arbeit verdeutlichen, dass Ti-III-citrat genau wie Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm stark absorbiert und es bei der Isolierung der RNA oft nicht vollständig entfernt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die im Gel sichtbaren RNA-Konzentrationsunterschiede der beiden Kulturreihen mit 1,3-DCDD oder 2,3-DCDD ließen sich nicht auf unterschiedliche Zellzahlen zurückführen (Abb. 21). Die Quantifizierung des mitgeführten Wiederfindungsstandards (Luziferase mRNA) mittels qPCR ergab jedoch, dass die Wiederfindung in der 1,3-DCDD-Kulturreihe (einschließlich der Kontrollkulturen) bei ca. 50 % lag, wohingegen sie in der 2,3-DCDD-Reihe (einschließlich der Kontrollkulturen) bei nur ca. 5 % lag. Da Konzentrationsunterschiede bereits im RNA-Gel sichtbar wurden, deutet alles darauf hin, dass die Verluste während der RNA-Präparation selbst zustande gekommen sind.

3.3.3.3 Transkriptionsniveau der *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 in Gegenwart von 2,3-DCDD und 1,3-DCDD

Der zeitliche Verlauf der Transkription der *rdhA* Gene *cbrA*, *cbdbA1624*, *cbdbA1453* und *cbdbA1588* wurde mittels RT-qPCR in Kulturen untersucht, die mit 2,3-DCDD, 1,3-DCDD oder ohne chlorierten Elektronenakzeptor inkubiert wurden. Die Transkriptmengen der untersuchten Gene bestätigten die Ergebnisse aus der RT-PCR. In den Kulturen mit 1,3-DCDD blieben die Transkriptmengen der untersuchten *rdhA* Gene über den gesamten Versuchsverlauf konstant im Bereich des initialen Niveaus (Abb. 25 B). Eine Induktion der Transkription konnte nicht beobachtet werden. In den Kulturen mit 2,3-DCDD hingegen stiegen die Transkriptionsniveaus aller vier analysierten *rdhA* Gene innerhalb von 48 h um zwei bis drei Größenordnungen an (Abb. 25 A). Im weiteren Verlauf gab es zusätzlich einen Anstieg im Transkriptniveau der Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1453* um eine Größenordnung, während die Zahl der Transkripte/Gen von *cbrA* und *cbdbA1588* weitgehend gleich blieb. Das *cbrA* Gen zeigte über den gesamten Versuchsverlauf das vergleichsweise höchste Transkriptionsniveau (0,7 Transkripte/Gen). Die anderen untersuchten *rdhA* Gene wiesen am Ende des Versuches ähnliche Werte um 0,1 bis 0,2 Transkripte/Gen auf. Trotz des vollständigen Umsatzes von 2,3-DCDD 72 h nach Beginn des Versuches kam es im weiteren Verlauf nicht zu einem Abfall der Transkriptmenge pro Zelle, wie vorher in den Ansätzen mit TrCB beobachtet (Abb. 20). Das lag, wie bereits erwähnt, vermutlich daran, dass die Messung der Dioxindechlorierung in parallelen 3 ml Kulturen erfolgte. Während 2,3-DCDD in diesen Kulturen bereits vollständig umgesetzt worden war, war das in den 50 ml Kulturen, die für die

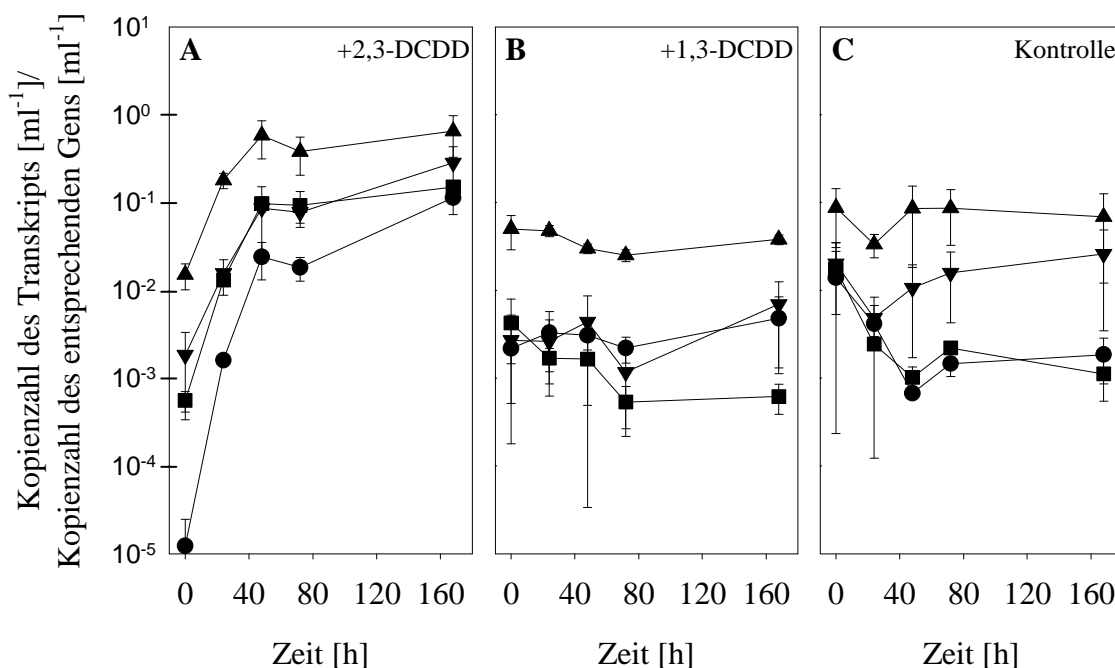


Abb. 25. Quantitative Transkriptionsanalyse vier ausgewählter *rdhA* Gene (*cbrA* (▲), *cbdbA1624* (●), *cbdbA1453* (▼) und *cbdbA1588* (■)) des Stammes CBDB1 nach Kultivierung mit 2,3-DCDD (A), 1,3-DCDD (B) oder ohne chlorierten Elektronenakzeptor (C). Die Kulturen wurden 10%ig mit Zellen beimpft, die in Zweiflüssigphasenkulturen mit 1,2,3-TrCB angezogen wurden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammten aus der Analyse paralleler Kulturen.

Nukleinsäureextraktion genutzt wurden, nicht der Fall, wie gaschromatographische Messungen zeigten.

Wie bereits in den Transkriptionsanalysen mit 1,2,3- und 1,2,4-TrCB gesehen, zeigten die untersuchten *rdhA* Gene auch mit den DCDD unterschiedlich hohe initiale Transkriptionsniveaus. In den Kulturen mit 1,3-DCDD besaßen die Gene *cbdbA1624*, *cbdbA1453* und *cbdbA1588* zu Beginn des Versuches ähnliche Transkriptionsniveaus (Abb. 25 B), während das Startniveau des Gens *cbrA* um den Faktor 10 höher lag. Mit 2,3-DCDD war der Effekt noch ausgeprägter. Die initialen Transkriptmengen der Gene *cbrA*, *cbdbA1453*, *cbdbA1588* und *cbdbA1624* lagen bei 1000, 200, 50 und 1 Transkript(en) pro 100000 Zellen (Abb. 25 A).

In Kontrollkulturen ohne chlorierten Elektronenakzeptor verliefen die Transkriptionsniveaus der untersuchten *rdhA* Gene ähnlich wie in den mit 1,3-DCDD inkubierten Kulturen. Das Transkriptionsniveau fiel entweder um eine Größenordnung (*cbdbA1624*, *cbdbA1588*) oder war relativ konstant während des gesamten Versuches (*cbrA*, *cbdbA1453*; Abb. 25 C). Auch nach 168 h ohne chloriertes Substrat waren auf niedrigem Niveau *rdhA* Transkripte nachweisbar.

3.3.4 Transkriptionsniveau der *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 in Gegenwart von Tetrachlorethen (PCE)

In der Arbeit von Junick (2007) wurde u.a. die Induktion der *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 durch 200 μ M PCE nach einer Vorkultivierung mit 1,2,4-TrCB im Zweiflüssigphasensystem untersucht. Die Analyse des Dechlorierungsverlaufs zeigte, dass PCE zu Trichlorethen (TCE) umgesetzt wurde. TCE wurde nicht weiter dechloriert und stellte somit das Endprodukt der PCE-Dechlorierung dar. Im 168 stündigen Versuchsverlauf wurden 50 mol% des zugesetzten PCEs zu TCE umgesetzt. Nach RNA-Präparation, DNaseI Behandlung und cDNA-Synthese wurden mit acht der 13 verwendeten Primerpaare (Länge der PCR-Produkte bis 650 bp) *rdhA* Transkripte amplifiziert. Die t-RFLP-Charakterisierung dieser PCR-Produkte zeigte die Transkription von 17 *rdhA* Genen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Transkriptionsniveau der *rdhA* Gene *cbrA*, *cbdbA1624*, *cbdbA1453* und *cbdbA1588* näher betrachtet. Von besonderem Interesse war dabei die Expression der Gene *cbdbA1588* und *cbrA*. Für *cbdbA1588* wurde eine starke Induktion erwartet, da das orthologe Gen aus *Dehalococcoides ethenogenes* für eine PCE reduktive Dehalogenase kodiert (Fung *et al.*, 2007). CbrA hingegen wurde als Chlorbenzol reduktive Dehalogenase beschrieben (Adrian *et al.*, 2007 b).

Die Inkubation der untersuchten Kulturen mit PCE führte im Verlauf des Versuches zu einer Zunahme im Transkriptionsniveau der Gene *cbdbA1588*, *cbdbA1624* und *cbdbA1453* um eine bis zwei Größenordnungen (Abb. 26 A). Die Transkriptmenge von *cbrA* fiel dagegen innerhalb der ersten 24 h leicht ab und blieb anschließend bis zum Ende des Versuches konstant bei rund 0,08 Transkripten/Zelle (Abb. 26 A). Das Gen mit dem höchsten Transkriptionsniveau nach 168 stündiger Inkubation mit PCE war *cbdbA1588*. Das zweithöchste Transkriptionsniveau zeigte das Gen *cbdbA1624*. Der Anstieg des Transkriptionsniveaus der Gene *cbdbA1588*, *cbdbA1624* und *cbdbA1453* korrelierte mit einer fortschreitenden Dechlorierung von PCE zu TCE (Junick, 2007). Die initialen Transkriptionsniveaus waren auch in diesem Versuch mit PCE für die untersuchten *rdhA* Gene verschieden. Wie nach einer Vorkultivierung mit 1,2,4-TrCB zu erwarten, besaß *cbrA* das höchste Transkriptionsniveau, während die anderen untersuchten Gene um bis zu zwei Größenordnungen geringere Transkriptmengen aufwiesen (Abb. 26 A).

Um einen PCE-unabhängigen Einfluss auf die Transkription der *rdhA* Gene auszuschließen, wurden parallel Kontroll-Kulturen ohne chloriertes Substrat inokuliert. Die Analyse der Transkriptmengen in den Kontrollen zeigte einen Abfall im Zeitraum von 48 h nach dem Start

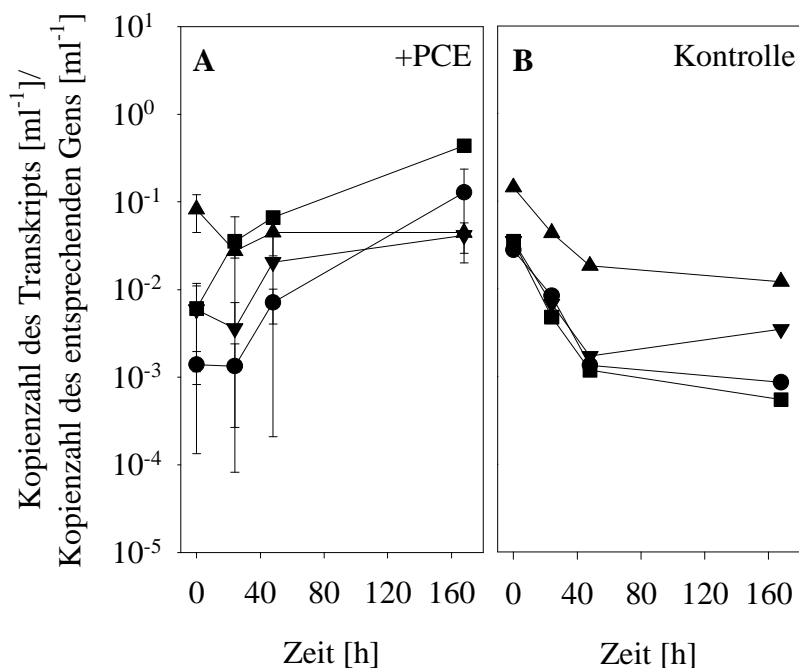


Abb. 26. Quantitative Transkriptionsanalyse der vier ausgewählten *rdhA* Gene *cbrA* (▲), *cbdbA1624* (●), *cbdbA1453* (▼) und *cbdbA1588* (■) des Stammes CBDB1 nach Kultivierung mit PCE (A) oder ohne chlorierten Elektronenakzeptor (B). Die Kulturen wurden 10%ig mit Zellen beimpft, die in Zweiflüssigphasenkulturen mit 1,2,4-TrCB angezogen wurden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammten aus der Analyse paralleler Kulturen (A).

des Versuches für die vier untersuchten Gene (Abb. 26 B). Während das Transkriptionsniveau der Gene *cbrA*, *cbdbA1624* und *1588* anschließend bei einer leichten Abwärtstendenz relativ konstant blieb, stieg die Transkriptmenge von *cbdbA1453* leicht an. Dieser Anstieg war aber im Vergleich zum Anstieg in den mit PCE versetzten Kulturen gering (Abb. 26).

3.4 Untersuchung der Rolle von CbdbA1625 aus *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 bei der Dechlorierung von Chlorbenzolen

Die Analyse der Transkription des *rdhA* Gens *cbdbA1624* mittels RT-qPCR zeigte eine induzierte Expression in Gegenwart von 1,2,4- und 1,2,3-TrCB, 2,3-DCDD und PCE. Eine Analyse der Genomsequenz des Stammes CBDB1 (Kube *et al.*, 2005) ergab, dass vor *cbdbA1624* ein Gen liegt, das für einen MarR-ähnlichen Transkriptionsregulator kodiert (*cbdbA1625*, Abb. 3). MarR-ähnliche Regulatoren spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des aeroben Abbaus aromatischer Verbindungen (Tropel und van der Meer, 2004) und sind bekannt dafür, lipophile (in der Regel phenolische) Verbindungen zu binden (Wilkinson und Grove, 2006). Um eine Bindung von CbdbA1625 an die *cbdbA1624* Operatorregion zu zeigen oder mögliche Liganden (1,2,3-TrCB; 1,2,4-TrCB; 1,3,5-TrCB) zu identi-

fizieren, sollte *cbdbA1625* im Rahmen der vorliegenden Arbeit heterolog in *E. coli* als *Strep-tag* Fusionsprotein exprimiert werden. Die Bindestudien erfolgten in Gelshiftexperimenten.

3.4.1 Reinigung von CbdbA1625

Als Expressionsvektoren wurden pASK-IBA5 und pASK-IBA3 genutzt. Nach Expression von *cbdbA1625* in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL wurden die *Strep-tag*-Fusionsproteine (folgend als CbdbA1625-Strep bezeichnet) über StrepTactin Sepharose Affinitätschromatographie gereinigt. Die Zellernte erfolgte 3 h nach der Induktion mit AHT. Im Falle beider Fusionsproteine (N- und C-terminaler *Strep-tag*) wurde nach der Reinigung im 15%igen SDS-Polyacrylamidgel eine ca. 20 kDa große Hauptbande identifiziert (Abb. 27). Die Größe stimmte mit der aus der Proteinsequenz abgeleiteten molekularen Masse von CbdbA1625 (18,9 kDa) inklusive des *Strep-tag* überein. Die entsprechenden Proteine konnten in Kontrollexperimenten mit *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL und den leeren Vektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5 nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aus 100 ml Kulturvolumen wurden 3 mg C-terminales und 0,75 mg N-terminales CbdbA1625-*Strep-tag*-Fusionsprotein isoliert.

Gelfiltrationsexperimente mit einer Superdex SD75 Säule zeigten, dass das C-terminale *Strep-tag*-Fusionsprotein stark zur Multimerisierung neigte. Unter aeroben Bedingungen waren neben großen Mengen des Multimers nur kleine Mengen des Monomers und von Oligomeren verschiedener Größen nachweisbar. Unter anaeroben Bedingungen (Puffer mit DTT, N₂-begast) wurden das Monomer, das Dimer und Multimere detektiert (Abb. 28).

3.4.2 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte von *cbdbA1624*, *cbdbA1453* und *cbrA*

Die Transkriptionsstartpunkte der Gene *cbdbA1624*, *cbdbA1453* und *cbrA* wurden 105 bp, 115 bp und 107 bp stromaufwärts des ATG Startcodons mittels *primer extension*-Reaktion bestimmt (Abb. 29). Die *cbdbA1624* Promotorregion enthielt typische Elemente für die Erkennung durch den σ^{70} -Faktor der RNA-Polymerase. Dazu zählten die Sequenzen 5 bp (TATATG) und 33 bp (TTGACA) stromaufwärts des Transkriptionsstarts, die den *E. coli* σ^{70} Regionen -10 (TATAAT) und -35 in vier von sechs Positionen bzw. komplett entsprachen. Die Promotorregion des Gens *cbdbA1453* zeigte eine hoch konservierte -10 Region (5 Übereinstimmungen) inklusive des wichtigen TAx₃T Motivs, aber nur eine schwache -35 Region (4 Übereinstimmungen) mit einem imperfekten TTG₃ Motiv

(TTtxxx). Die potentiellen -10 und -35 Regionen der *cbrA* Promotorregionen zeigten jeweils nur 3 von 6 möglichen Übereinstimmungen zur *E. coli* σ^{70} Konsensusbindesequenz, wobei auch hoch konservierte Basen ausgetauscht wurden (TAXXXT→TtxxxT, TTGXXX→TTcxxx). Es konnte jedoch das TGTG Motiv stromaufwärts der -10 Region identifiziert werden, das dafür bekannt ist, die Bildung des offenen Komplexes zu stabilisieren. Diese konservierte Sequenz tritt oft im Zusammenhang mit wenig konservierten -35 Regionen auf (Voskuil und Chambliss, 2002).

3.4.3 Bindestudien mit den CbdbA1625-*Strep-tag*-Fusionsproteinen und der intergenen Region der Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1625*

Ein 289 bp langes DNA-Fragment, welches die 246 bp lange intergene Region der Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1625* enthielt, wurde an Plasmid-DNA des Vektors pP1-P2 mittels PCR amplifiziert (Abb. 6). Gelretardationsexperimente wurden durchgeführt, um eine mögliche Bindung der CbdbA1625-*Strep-tag*-Fusionsproteine an das Amplifikat der intergenen Region der Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1625* zu analysieren. Es wurde dabei das Fusionsprotein sowohl mit N-terminalem als auch mit dem C-terminalen *Strep-tag* II untersucht. Es konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Art des verwendeten *tag* beobachtet werden. Nach der Inkubation des gereinigten PCR-Produktes (13 nM) mit verschiedenen Konzentrationen an CbdbA1625-*Strep*_{C-terminal} (10 μ M; 3,3 μ M; 1,1 μ M; 0,4 μ M; 0,1 μ M) wurde in 8%igen nativen Polyacrylamidamidgelen eine Retention der DNA sichtbar (Abb. 30). Es war jedoch ein 40-facher Protein-Überschuss nötig, um die Bildung des Protein-DNA-Komplexes nachweisen zu können. Zwei Protein-DNA-Komplexe erschienen bei Proteinkonzentrationen zwischen 0,4 und 3,3 μ M. Das deutet auf das Vorhandensein von zwei CbdbA1625-Bindestellen in der intergenen Region der Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1625* hin. Wenn das Verhältnis von CbdbA1625-*Strep*_{C-terminal} zur Operator-DNA weiter erhöht wurde (Proteinkonzentrationen >3,3 μ M), traten zusätzliche Banden mit einer geringeren elektrophoretischen Mobilität auf. Es konnte bestimmt werden, dass die Bindung von CbdbA1625-*Strep* an die intergene Region der Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1625* spezifisch ist, da keine Retention der DNA beobachtet wurde, wenn die amplifizierten Promotorregionen anderer *rdhA* Gene (*cbdbA1453*, *cbrA*) verwendet wurden (Daten nicht gezeigt).

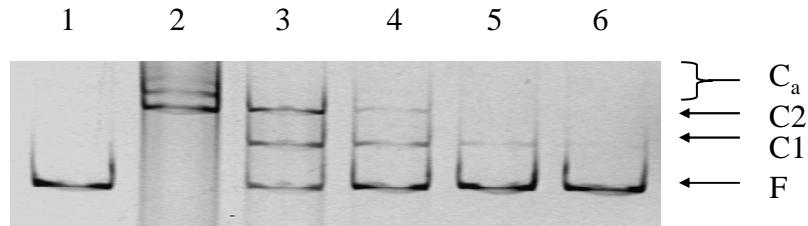


Abb. 30. Gelretardationsexperimente mit CbdbA1625-Strep_{C-terminal} und der intergenen Region der Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1625*. Das 289 bp große, an Plasmid-DNA des Vektors pP1-P2 reamplifizierte PCR-Produkt (13 nM) wurde ohne (Spur 1) oder mit 10 µM (Spur 2), 3,3 µM (Spur 3), 1,1 µM (Spur 4), 0,4 µM (Spur 5) und 0,1 µM (Spur 6) CbdbA1625-Strep_{C-terminal} inkubiert. Protein-DNA-Komplexe (C1, C2, C_a) und freie DNA (F) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

CbdbA1625-Strep [µM]	-	3.3	1.1	0.4	-	3.3	1.1	0.4
P1-P3 DNA [18 nM]	+	+	+	+				
P4-P5 DNA [18 nM]					+	+	+	+

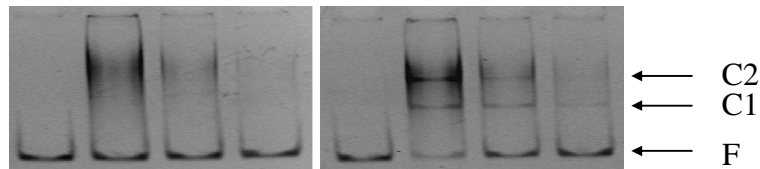


Abb. 31. Bindung von CbdbA1625-Strep_{C-terminal} an die DNA Fragmente P1-P3 und P4-P5, die Teile der intergenen Region der Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1625* repräsentieren (Abb. 6). Die DNA-Fragmente wurden an Plasmid-DNA der Vektoren pP1-P3 und pP4-P5 reamplifiziert. Ca. 18 nM der DNA-Fragmente wurden mit den angegebenen abnehmenden Konzentrationen an CbdbA1625-Strep_{C-terminal} inkubiert. C1, C2 - Protein-DNA-Komplexe, F - freie DNA

3.4.4 Lokalisierung der Bindestellen der CbdbA1625-Strep-tag-Fusionsproteine

Um die Bindestellen der CbdbA1625-Strep-tag-Fusionsproteine in den intergenen Regionen der Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1625* näher einzugrenzen, wurden kürzere DNA-Fragmente mit Größen von 100 und 107 bp (Abb. 6) mit den Primerpaaren P1/P2 und P4/P5 (Tab. 8) an Plasmid-DNA der Vektoren pP1-P3 bzw. pP4-P5 (Tab. 3) reamplifiziert. Das DNA Fragment P1-P2 beinhaltete die Region stromaufwärts des ATG Startcodons, während das Fragment P4-P5 die Region um den Transkriptionsstartpunkt von *cbdbA1624* umspannte. Diese Fragmente wurden nach der Reinigung erneut in Gelretardationsexperimenten untersucht. Die zwei Amplifikate (ca. 18 nM) wurden dazu jeweils ohne CbdbA1625-Strep bzw. mit 3,3 µM; 1,1 µM oder 0,4 µM CbdbA1625-Strep (sowohl als C- als auch N-terminales Strep-tag-Fusionsprotein) inkubiert (Abb. 31). Eine CbdbA1625-Strep abhängige Retention der DNA trat mit dem Fragment P4-P5 auf, aber nicht mit dem Fragment P1-P3. Mit dem P4-P5 Amplifikat wurden erneut zwei Proteinkomplexe beobachtet, was darauf hindeutet, dass die beiden putativen Bindestellen von CbdbA1625-Strep in dem entsprechenden Bereich der

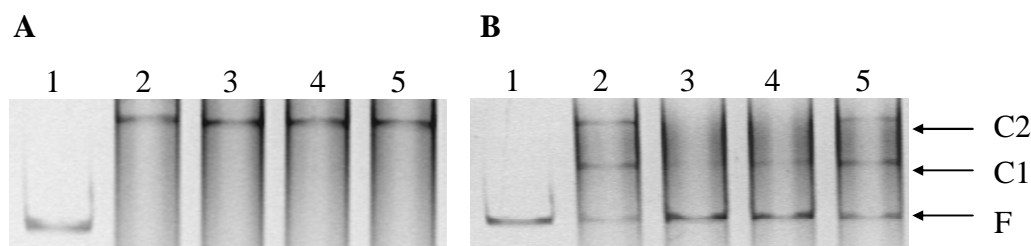


Abb. 32. Einfluss von Trichlorbenzolen auf die Komplexbildung (C1, C2) der intergenen Region der Gene *cdbA1624/cdbA1625* und *CdbA1625-Strep_{C-terminal}* bei einer Reaktionstemperatur von 24 °C (A) oder 45 °C (B, Vorinkubation des Reaktionspuffers mit den TrCB's über Nacht bei 70 °C). Ca. 0,1 μM gereinigtes PCR-Produkt P1-P2 wurde ohne *CdbA1625-Strep_{C-terminal}* (Spur 1) oder mit 12,4 μM *CdbA1625_{C-terminal}* (Spuren 2-5) inkubiert. Die Trichlorbenzole wurden in Konzentrationen von 80 μM (1,2,4-TrCB; A), 40 μM (1,2,3-TrCB; 1,3,5-TrCB; A) oder im Überschuss zum Reaktionsansatz hinzugefügt (B). Spur 2 - ohne TrCB; Spur 3 - mit 1,2,4-TrCB; Spur 4 - mit 1,2,3-TrCB; Spur 5 - mit 1,3,5-TrCB; F - freie DNA

intergenen Region der Gene *cdbA1624* und *cdbA1625* lokalisiert sind. Im Bindeverhalten konnten keine Unterschiede zwischen dem N- bzw. C-terminalen *Strep-tag*-Fusionsprotein beobachtet werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Sequenzanalyse der intergenen Region der Gene *cdbA1624* und *cdbA1625* in Bezug auf invertierte Sequenzwiederholungen durchgeführt. Invertierte Sequenzwiederholungen stellen mögliche Bindestellen für MarR-ähnliche Proteine dar (Wilkinson und Grove, 2006). In dem 107 bp großen Fragment P4-P5 wurden zwei 19 bp umfassende Regionen identifiziert, die einen perfekten *inverted repeat* bilden und zusätzlich jeweils zwei invertierte Bereiche der Sequenz ATAT beinhalten. Die beiden putativen Bindestellen lagen direkt nebeneinander und umschlossen den Transkriptionsstart von *cdbA1624*.

3.4.5 Ligandenbindung durch *CdbA1625-Strep*

Um die Bindung der drei Trichlorbenzol-Kongenere durch *CdbA1625-Strep* (C- und N-terminales *Strep-tag*-Fusionsprotein) zu untersuchen, wurde gereinigtes Protein (3,3 μM) mit 6 nM gereinigtem PCR-Produkt (Fragment P1-P2, Abb. 6), das am Plasmid pP1-P2 (Tab. 3) amplifiziert wurde, versetzt und danach mit den Liganden 1,2,3-TrCB (40 μM), 1,2,4-TrCB (80 μM) oder 1,3,5-TrCB (40 μM) inkubiert. Die Zugabe der Trichlorbenzole zerstörte bei einer Reaktionstemperatur von 24 °C die Bildung des DNA-Protein-Komplexes nicht (Abb. 32 A). Die Vorinkubation des Reaktionspuffers mit einem Überschuss der entsprechenden Trichlorbenzole über Nacht bei 70 °C gefolgt von der Zugabe von *CdbA1625-Strep* (N- und C-terminales *Strep-tag*-Fusionsprotein) und dem gereinigten Fragment P1-P2 und der

Inkubation bei 45 °C für 30 min führte jedoch zu einer Schwächung des DNA-Protein-Komplexes (Abb. 32 B). Während 1,2,4- und 1,2,3-TrCB die Bildung der Protein-DNA-Bindung am stärksten inhibierten, zeigte 1,3,5-TrCB nur einen schwachen oder keinen Effekt. Es konnten keine Unterschiede im Reaktionsverhalten von N-terminalem bzw. C-terminalen *Strep-tag*-Fusionsprotein beobachtet werden. Um die Ligandenbindung von CbdbA1625-Strep (N- und C-terminales *Strep-tag*-Fusionsprotein) näher zu untersuchen, wurden Analysen mittels Isothermer Titrations-Kalorimetrie und den Liganden 1,2,4- und 1,2,3-TrCB durchgeführt. Allerdings konnte auf diesem Weg die Bindung der getesteten Trichlorbenzole an CbdbA1625-Strep nicht detektiert werden.

4. Diskussion

4.1 Anreicherung von obligat dechlorierenden Bakterien

Die reduktive Dechlorierung halogener Aromaten und Aliphaten wurde für eine große Bandbreite an Bakteriengruppen beschrieben. Sowohl δ -Proteobakterien (z.B. *Desulfomonile* sp., *Desulfovibrio* sp.), γ -Proteobakterien (z.B. *Enterobacter* sp.), ϵ -Proteobakterien (z.B. *Sulfurospirillum* sp.), grampositive Bakterien (*Clostridium* sp., *Desulfitobacterium* ssp., *Dehalobacter* sp.) als auch *Chloroflexi* (z.B. *Dehalococcoides* ssp.) sind in der Lage, halogenierte Verbindungen abzubauen (Löffler *et al.*, 2003). Viele dieser Organismen zeigen eine physiologische Diversität und können unterschiedliche Elektronenakzeptoren nutzen. *Anaeromyxobacter* ssp. reduzieren beispielsweise Sauerstoff, Nitrat, Nitrit, oxidierte Metallspezies, Fumarat oder Halophenole (Löffler *et al.*, 2005). *Dehalobacter* sp. und *Dehalococcoides* sp. sind im Gegensatz dazu abhängig von der Anwesenheit von halogenierten Verbindungen, um Energie im Prozess der Dehalorespiration zu konservieren (Maymó-Gatell *et al.*, 1997; Holliger *et al.*, 1998; Adrian *et al.*, 2000 b; He *et al.*, 2003 b; He *et al.*, 2005). Die spezialisierte Lebensweise der *Dehalococcoidetes* und die geringen Zellausbeuten (10^6 bis 10^9 Zellen/ml (Maymó-Gatell *et al.*, 1997; Adrian *et al.*, 2000 b)) erschweren die Isolierung dieser Organismen. Bis zum heutigen Tag sind acht Stämme in Reinkultur vorhanden, die in die Gruppe der *Dehalococcoidetes* einzuordnen sind (Maymó-Gatell *et al.*, 1997 (Stamm 195); Adrian *et al.*, 2000 b (Stamm CBDB1); He *et al.*, 2003 b (Stamm BAV1); He *et al.*, 2005 (Stamm FL2); Sung *et al.*, 2006 (Stamm GT); Bunge *et al.*, 2007 (Stamm VZ); Bunge *et al.*, 2008 (Stamm DCMB5); May *et al.*, 2008 (Stamm DF-1)). Die für die Anreicherung und Isolierung verschiedener Stämme verwendeten Strategien sollen vergleichend mit der in der vorliegenden Arbeit für Stamm DCMB5 vorgestellten Variante diskutiert werden, um kritische Punkte im Isolierungsprozess hervorzuheben (Tab. 19). Generell werden bis zum Erhalt einer Reinkultur fünf Schritte durchlaufen: die Probenahme, die Erstellung eines Mikrokosmos, der Übergang in Sediment-freie Kulturen, die Anreicherung und abschließend die Isolierung.

Tab. 19. Im Anreicherungsprozess ausgewählter *Dehalococcoidetes* Stämme verwendete Elektronenakzeptoren, -donatoren, Inhibitoren, komplexe Zusätze und Reduktionsmittel.

Stamm	DCMB5	CBDB1	195	BAV1	FL2	VZ	DF-1
Primäres Inokulum	Spittelwassersediment	Saalesediment	Faulschlamm, Ithaca Abwasseraufbereitungsanlage	Grundwassermaterial, Bachman road site	Red Cedar Sediment	Grundwassermaterial, PCE-kontaminierter Standort, Victoria	Charlston Hafensediment
Angereichert/isoliert auf:							
Elektronenakzeptor	TrCB-10 mM ¹ , (TrCDD-25 bis 50 µM, TeCDD-50 µM bis 3,3 mM ¹)	1,2,3-/1,2,4-TrCB (äquimolares Gemisch, je 15 µM)	PCE (bis 0,55 mM)	VC (0,27 bis 1,6 mM)	TCE (0,28 mM) ¹	cDCE (250-500 µM)	2,3,5,6-PCB (350 µM)
Elektronendonatoren und C-Quelle im Anreicherungsprozess	Pyruvat, Fumarat, Formiat, Benzoat, Acetat	Pyruvat, Butyrat, Succinat, Formiat, Citrat, Acetat, Glukose	Methanol, Glukose, Formiat, Essigsäure, Wasserstoff	Laktat, Acetat, Formiat, Pyruvat	Pyruvat, Glycerol	Benzoat	Formiat, Wasserstoff
Elektronendonator der Reinkultur:	Wasserstoff	Wasserstoff	Wasserstoff	Wasserstoff	Wasserstoff	Wasserstoff	Formiat, Wasserstoff
C-Quelle der Reinkultur:	Acetat	Acetat	Acetat	Acetat	Acetat	Acetat	Formiat
komplexe Zusätze	- fermentierter Hefeextrakt - steriler Kulturüberstand der Mischkultur - steriler Faulschlamm Überstand Stamm 195 →kein fördernder Effekt	- steriler Überstand aus Mischkulturen →war in Reinkulturen zur Erhaltung der Dechlorierungsaktivität nicht nötig	- steriler Faulschlammüberstand - Filter-sterilisiertes Extrakt aus Stamm 195-Mischkulturen →Veränderung des Mediums und entsprechende B ₁₂ -Konz. machten beides unnötig	-	-	steriler Kulturüberstand aus dechlorierenden VZ-Mischkulturen →in Reinkulturen zur Erhaltung der Dechlorierungsaktivität nicht nötig	autoklavierter Zellextrakt aus <i>Desulfovibrio</i> sp. Kulturen
Antibiotika	BES, Vancomycin, Penicillin	BES, Vancomycin	Vancomycin, Ampicillin	Ampicillin	Ampicillin	nicht beschrieben	BES, Vancomycin
Agarshakes	+	+	-	+	-	+	+
Reduktionsmittel	Ti(III)-NTA, Na ₂ S, FeS	Ti(III)-Citrat→Ti(III)-NTA→Ti(III)-Citrat, Na ₂ S	Na ₂ S, FeCl ₂	L-Cystein, Na ₂ S	L-Cystein, Na ₂ S	Ti(III)-Citrat, Na ₂ S	Cystein→Ti(III)-NTA→Cystein
Literatur	Bunge <i>et al.</i> , 2001; Bunge <i>et al.</i> , 2008	Novak <i>et al.</i> , 1996; Adrian <i>et al.</i> , 1998; Adrian <i>et al.</i> , 2000 b	Freedman und Gossett, 1989; DiStefano <i>et al.</i> , 1991; Maymó-Gatell <i>et al.</i> , 1997; He <i>et al.</i> , 2007	He <i>et al.</i> , 2003 a; He <i>et al.</i> , 2003 b	He <i>et al.</i> , 2005	Bunge <i>et al.</i> , 2007	Wu <i>et al.</i> , 2002 b; May <i>et al.</i> , 2008

¹ Zweiflüssigphasensystem

4.1.1 Probenahme und Übergang aus den Mikrokosmen in Sediment-freie Kulturen

Hendrickson *et al.* (2002) zeigten, dass *Dehalococcoides* sp. in verschiedenen Chlorethen-verunreinigten anaeroben Standorten unterschiedlicher geographischer und klimatischer Zonen in Nordamerika und Europa vorkommen. Ein Zusammenhang zwischen einer hohen Belastung an halogenierten Verbindungen und dem Auftreten von *Dehalococcoides* sp. wurde auch für weitere anaerobe Habitate beobachtet (Bunge und Lechner, 2001; Hiraishi *et al.*, 2005 b). Die Mehrheit der reduktiv dechlorierenden Kulturen wurde aus Proben anaerober, kontaminierter Standorte angereichert. Dabei handelte es sich um kontaminierte Sedimente (Nowak *et al.*, 1996; Adrian *et al.*, 1998, Bunge *et al.*, 2001; He *et al.*, 2005; May *et al.*, 2008), Grundwasser-Material (He *et al.*, 2003 a; Bunge *et al.*, 2007) oder Faulschlamm aus einer Kläranlage (Freedman und Gossett, 1989).

Der Übergang in Sediment-freie Kulturen kann ein kritischer Punkt bei der Anreicherung sein. So beschrieben Cutter *et al.* (1998), dass die untersuchten Mikrokosmen in der Lage waren, die zugesetzten polychlorierten Biphenyle sowohl in der meta- als auch in der para-Position zu dechlorieren. Beim Übergang in Kulturen ohne Sediment kam es zum Verlust der meta-Dechlorierung. Die Dechlorierungsaktivität gegenüber 1,2,3- und 1,2,4-TrCDD wurde jedoch in unseren Anreicherungskulturen beim Ausverdünnen des Sediments nicht beeinträchtigt.

4.1.2 Wahl der Elektronendonatoren

Vertreter der Gattung *Dehalococcoides* sp. konservieren Energie ausschließlich durch Dehalorespiration mit Wasserstoff als Elektronendonator, einem halogenierten Aromaten oder Aliphaten als Elektronenakzeptor und Acetat als Kohlenstoffquelle (Maymó-Gatell *et al.*, 1997; Adrian *et al.*, 2000 b). Trotzdem wurden im frühen Anreicherungsprozess entweder organische Säuren, Glukose oder Methanol verwendet (Tab. 19). Bei der Anreicherung von Stamm DCMB5 wurde z.B. ein Gemisch aus organischen Säuren als Elektronendonatoren (Pyruvat, Fumarat, Formiat und Benzoat) und Acetat als Kohlenstoffquelle genutzt (Bunge *et al.*, 2001; Bunge 2004; Wagner, 2004). Auf den direkten Einsatz von Acetat und Wasserstoff wurde verzichtet, da die Gabe von Wasserstoff bei gleichzeitiger Anwesenheit von Carbonat neben den Dechlorierern auch das Wachstum einer Reihe anderer Bakterien (Methanogene, Acetogene, Sulfatreduzierer) fördert (Bunge *et al.*, 2007, Abb. 10). Es wurde auch gezeigt, dass die externe Zugabe von Wasserstoff zu Mikrokosmen und frühen Anreicherungskulturen

die reduktive Dechlorierung hemmte (Ballerstedt *et al.*, 2004; Rysavy *et al.*, 2005). Substrate, die die kontinuierliche Freisetzung von Wasserstoff erlaubten, erwiesen sich als geeigneter für die Anreicherung von *Dehalococcoides* (Bunge *et al.*, 2007). Sie verschaffen den dechlorierenden Bakterien einen Selektionsvorteil, da z.B. die Methanogenese nur bei höheren Wasserstoffkonzentrationen abläuft (≥ 5 nM), während die Dechlorierung hingegen noch bei Wasserstoffkonzentrationen um 0,3 nM nachgewiesen werden kann (Löffler *et al.*, 1999). In anderen Studien wurde der Einfluss von Elektronendonatoren auf die Dechlorierungsaktivität untersucht, die zum einen zu einer langsamen (Butyrat, Propionat) und zum anderen zu einer schnellen (Laktat, Methanol) Freisetzung von Wasserstoff und damit zu unterschiedlich hohen Partialdrücken führten (Fennell *et al.*, 1997; Freeborn *et al.*, 2005). Unter beiden Bedingungen wurden ähnliche Dechlorierungsaktivitäten beobachtet.

Die Eignung bestimmter organischer Säuren im Anreicherungsprozess ist offenbar stark abhängig von der Populationszusammensetzung. Während bei der Anreicherung von Stamm CBDB1 der Elektronendonator Formiat die Dechlorierung förderte (Adrian *et al.*, 1998), zeigte sich in den Anreicherungskulturen mit Stamm DCMB5 im Rahmen dieser Arbeit nur eine sehr schwache Dechlorierungsaktivität (Abb. 7). Ein ähnliches Phänomen wurde in polychlorierten Biphenyl-dechlorierenden Kulturen (Bedard *et al.*, 2006) und in 1,2,3- bzw. 1,2,4-TrCB-dechlorierenden Mischkulturen (Holliger *et al.*, 1992; Middeldorp *et al.*, 1997) beobachtet. Eine Begrenzung der organischen Säuren auf Acetat bei gleichzeitiger Gabe von Wasserstoff brachte in dieser Arbeit nicht den gewünschten Erfolg im Anreicherungsprozess (Abb. 10, Tab. 16). Die Verwendung von Benzoat, das häufig in Syntrophie mit Wasserstoffverbrauchenden Organismen umgesetzt wird (Jackson *et al.*, 1999), eignete sich hingegen besser zur Anreicherung von *Dehalococcoides*. Bunge *et al.* (2007) zeigten die Bildung einer syntrophen Gemeinschaft aus *Desulfitobacterium* sp., *Dehalococcoides* sp. und *Syntrophus* sp., in der *Dehalococcoides* sp. Stamm VZ einen Anteil von bis zu 54 % besaß.

Neben den bereits beschriebenen Verbindungen wurde auch der Einfluss von Fe^0 auf die Dechlorierung untersucht (Rosenthal *et al.*, 2003; Rysavy *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2005). Die Freisetzung von Wasserstoff erfolgt dabei abiotisch durch Eisenkorrosion (Rosenthal *et al.*, 2003). Dabei zeigte sich, dass Fe^0 die Dechlorierung förderte, solange es nicht in zu hohen Konzentrationen eingesetzt wurde. Ein Vergleich von Tetrachlorbiphenyl-dechlorierenden Kulturen, die entweder mit organischen Säuren oder Fe^0 versetzt wurden, ergab, dass die lag Phase vor dem Start der Dechlorierung mit Fe^0 wesentlich verkürzt war (Yan *et al.*, 2005).

Die PCB-dechlorierenden Stämme DF-1 (Wu *et al.*, 2002 b) und o-17 (Cutter *et al.*, 1998; Pulliam Holoman *et al.*, 1998; Cutter *et al.*, 2001), die nur eine entfernte Verwandtschaft zu

Dehalococcoides besitzen ($\leq 90\%$ Sequenzidentität der 16S rRNA Gene, Bedard *et al.*, 2007), wiesen abweichende Bedürfnisse hinsichtlich der verwendeten Elektronendonatoren und der Kohlenstoffquelle auf. Dem Stamm o-17 diene Acetat als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator (Cutter *et al.*, 2001), die Zugabe von Wasserstoff hemmte auch in hoch angereicherten Kulturen die Dechlorierung. Stamm DF-1, dessen Isolierung May *et al.* (2008) erst kürzlich gelang, nutzt im Gegensatz zu Stamm o-17 Wasserstoff oder Formiat als Elektronendonator, ist aber nicht in der Lage, Acetat als Kohlenstoffquelle zu verwenden (Tab. 19).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Nutzung von Acetat als Kohlenstoffquelle und Wasserstoff als Elektronendonator in der vorliegenden Arbeit eine Koanreicherung von *Dehalococcoides* sp. und Acetogenen nach sich zog (Abb. 10, Tab. 16). Die Verwendung von organischen Säuren als Elektronendonatoren verhinderte vermutlich aufgrund der Freisetzung geringer Wasserstoffmengen eine Vorherrschaft der Acetogenen. Nach dem Umsatz der organischen Säuren durch die fermentierende Gemeinschaft kam es zu einer starken Anreicherung von *Dehalococcoides* (Abb. 10, Tab. 16).

4.1.3 Einfluss von Inhibitoren auf den Anreicherungsprozess

Sowohl im Anreicherungsprozess des Stammes DCMB5 als auch bei der Isolierung der Stämme CBDB1, 195, BAV1, FL2 und DF-1 wurden Inhibitoren verwendet (Tab. 19). Dabei handelte es in der Regel um Bromethansulfonsäure (BES), den Inhibitor methanogener Archaea, und Antibiotika, die gegen grampositive Bakterien wirken (Amp, Van). BES ist ein Struktur analogon des Coenzym M und hemmt kompetitiv die Methyl-Coenzym M-Reduktase. Bei der Anreicherung der Stämme CBDB1 und DCMB5 zeigte sich, dass die Zugabe von BES zu einer gesteigerten Dechlorierungsaktivität führte (Adrian *et al.*, 1998; Bunge *et al.*, 2008). Adrian *et al.* (1998) machten die Hemmung der Methanogenen, die mit den dechlorierenden Bakterien in Konkurrenz um den Wasserstoff standen, für diesen Effekt verantwortlich. In anderen dechlorierenden Kulturen wurde nach Zusatz von BES kein Effekt (Holliger *et al.*, 1992; Ballerstedt *et al.*, 2004) oder nur eine leicht verringerte Dechlorierungsrate beobachtet (Wu *et al.*, 2000). In anderen Studien führte die Nutzung von BES zu einer Hemmung einiger Dechlorierungsschritte (Löffler *et al.*, 1997; Middeldorp *et al.*, 1997) oder zur vollständigen Inhibierung des Umsatzes der halogenierten Verbindungen (Cutter *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2005). Die Inhibierung der Dechlorierung von niedriger chlorierten Intermediaten wurde für die Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCB beschrieben, bei der

es zu einer Akkumulation von 1,2,3-DCB kam (Middeldorp *et al.*, 1997). Löffler *et al.* (1997) beobachteten für die Dechlorierung von PCE, dass die Dechlorierungsschritte vom DCE zum Ethen besonders betroffen waren. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass durch BES einige reduktive Dehalogenasen gehemmt werden oder dass nach Inhibierung der Methanogenen steigende Wasserstoffkonzentrationen die thermodynamisch weniger günstige Dechlorierung niedrig halogener Verbindungen unterdrücken.

Sowohl Ampicillin, Penicillin (β -Lactam-Antibiotika) als auch Vancomycin (Glykopeptid-Antibiotikum) hemmen die Zellwandbiosynthese. Das Fehlen von Peptidoglykan ist wahrscheinlich für die Unempfindlichkeit von *Dehalococcoides* gegenüber Ampicillin und Vancomycin verantwortlich (Maymó-Gatell *et al.*, 1997; Adrian *et al.*, 2000 b). Die Zugabe dieser Antibiotika zu diversen Anreicherungskulturen bewirkte eine leichte Verringerung der Dechlorierungsrate (Watts *et al.*, 2001; Ballerstedt *et al.*, 2004; Bunge *et al.*, 2008). Während Stamm DF-1 empfindlich gegenüber Ampicillin war, wurde die Dechlorierung von 2,3,4,5-PCB durch 100 μ g/ml Vancomycin nicht beeinflusst. Vancomycin und Ampicillin scheinen daher gut geeignet, um Vertreter der *Dehalococcoidetes* anzureichern. Bei der Isolierung der Stämme CBDB1 und 195 war die Zugabe von Vancomycin oder eines Vancomycin/Ampicillin-Gemisches einer der entscheidenden Schritte. Die Anwendung dieser Antibiotika besitzt allerdings auch den Nachteil, dass die Zugabe nicht zum Tod der Bakterienzellen, sondern nur zu einer Wachstumsinhibierung führt, so dass Verdünnungsreihen oder mehrere Transfers in neues Medium notwendig bleiben (Löffler *et al.*, 1999). Bei der Anreicherung des Stammes DCMB5 im Rahmen dieser Arbeit brachte die Zugabe von Vancomycin nicht den erwarteten Erfolg (Kap. 3.1.3). Durch Zugabe von Penicillin wurde jedoch der überwiegende Teil der grampositiven Bakterien aus dem Konsortium entfernt. Damit wurde die Grundlage für die spätere Isolierung des Stammes DCMB5 geschaffen.

4.1.4 Zugabe undefinierter Zusätze

Im Anreicherungsprozess der Stämme CBDB1, 195 bzw. VS und nach Isolierung des Stammes DF-1 zeigte sich, dass durch Hemmung oder Verlust von Mitgliedern der Mischkulturen die Dechlorierungsaktivität nicht in neue Kulturen überführt werden konnte (Maymó-Gatell *et al.*, 1997; Adrian *et al.*, 2000 a; Müller *et al.*, 2004; May *et al.*, 2008). Der Zusatz von sterilem Mischkulturüberstand glich den Verlust der entsprechenden Organismen allerdings aus.

Im Isolierungsprozess von *Dehalococcoides* sp. Stamm 195 zeigte sich, dass es bereits in frühen Anreicherungskulturen nötig war, komplexe Zusätze zuzugeben, um einen Verlust der Dechlorierungsaktivität zu vermeiden (Maymó-Gatell *et al.*, 1995). So wurden 25 % (v/v) Filter-sterilisierter anaerober Faulschlamm zugegeben. Es wurden verschiedenste Nährstoffe auf eine stimulierende Wirkung getestet (Cholesterin, flüchtige Fettsäuren oder auch Aminosäuren aus verdautem Casein), und obwohl einige Substanzen die Dechlorierung förderten, konnte die Dechlorierungsaktivität nur durch Zugabe von steriltfiltriertem Überstand aus dechlorierenden Mischkulturen erfolgreich transferiert werden. He *et al.* (2007) gelang es inzwischen, Stamm 195 in definiertem Mineralmedium zu kultivieren. Ausschlaggebend waren ein Wechsel des Mediums und die Verwendung einer erhöhten Vitamin B₁₂-Konzentration (0,025 mg/l). Auch bei der Isolierung des Stammes DF-1 war es nur möglich, die Dechlorierungsaktivität in den Reinkulturen zu erhalten, wenn steriler Kulturüberstand eines aus der Mischkultur isolierten *Desulfovibrio* Stammes zugegeben wurde (May *et al.*, 2008). Eine genauere Analyse des Metabolismus des Partners kann in diesem Zusammenhang helfen, den für das dechlorierende Bakterium essentiellen Nährstoff zu identifizieren. So gelang es De Wildeman *et al.* (2003) durch die Analyse verschiedener Kulturüberstände herauszufinden, dass für den Erhalt der Dechlorierungsaktivität von *Desulfotobacterium dichloroeliminans* der Zusatz von Vitamin K₁ oder K₂ nötig war und den Zusatz des sterilen Kulturüberstandes überflüssig machte.

Während der Anreicherung von Stamm DCMB5 wurden 0,005 % Hefeextrakt zugesetzt. Die Kultivierung des Stammes DCMB5 gelang jedoch abschließend wie die der Stämme VZ, CBDB1, BAV1, FL2, GT und 195 in synthetischem Mineralmedium (He *et al.*, 2003 b; He *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2006; Bunge *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007; Bunge *et al.*, 2008; Tab. 19). Dies ist ein Hinweis darauf, dass möglichst frühzeitig im Anreicherungsprozess versucht werden sollte, komplexe Zusätze wegzulassen, um die Anzahl von Begleitorganismen zu reduzieren.

4.1.5 Konzentration und Toxizität der chlorierten Elektronenakzeptoren

Da viele chlororganische Verbindungen ab einer bestimmten Konzentration toxisch für die dechlorierenden Mikroorganismen sind, sollten zu Beginn der Anreicherung geringe Mengen an halogeniertem Elektronenakzeptor verwendet werden (Löffler *et al.*, 2005). Speziell Chloraromaten führen in höheren Konzentrationen zu einer Hemmung der Dechlorierung, wie beispielsweise für Chlorbenzole gezeigt wurde (Holliger *et al.*, 1992; Adrian und Görisch,

2002). Andererseits ist es aber auch notwendig, ausreichende Mengen an Elektronenakzeptor zuzugeben, um die Anreicherung zu fördern. So beschrieben Maymó-Gatell *et al.* (1995), Ballerstedt *et al.* (2004) und Bedard *et al.* (2006), dass die Zugabe höherer Konzentrationen an Elektronenakzeptor zu einer höheren Dechlorierungsaktivität führte. Für die Dechlorierung von cDCE und Vinylchlorid wurde eine Grenzkonzentration von 0,7 μM ermittelt, unter der keine Dechlorierung und kein Wachstum mehr stattfanden (Cupples *et al.*, 2004 a). Dabei handelt es sich um eine Beobachtung, die sowohl für die Anreicherung der dehalo-respirierenden Bakterien als auch für die Sanierungspraxis von Bedeutung ist.

Höhere Elektronenakzeptorkonzentrationen fördern zudem nicht nur die Dechlorierungsaktivität, sondern inhibieren gleichzeitig das Wachstum einiger Mitglieder in den dehalogenierenden Mischkulturen. So wurden insbesondere methanogene Archaea in Kulturen der Stämme 195, BAV1 und FL2 durch hohe Konzentrationen an chlorierten Ethenen gehemmt (Maymó-Gatell *et al.*, 1995; He *et al.*, 2003 b; He *et al.*, 2005). Dies war besonders dann von Vorteil für die Anreicherung, wenn die Gabe von BES die Dechlorierungsaktivität negativ beeinflusste (Löffler *et al.*, 1997, Kap. 4.1.3).

Die Isolierung und Kultivierung von Dioxin-dechlorierenden *Dehalococcoides* ssp. gestaltete sich, möglicherweise aufgrund des hydrophoben Charakters der Dioxine (Shiu *et al.*, 1988), oft schwierig. Dennoch gelang es Hiraishi *et al.* (2005 a) vier *Dehalococcoides* Stämme mit 50 μM 1,2,3,4-TeCDD als Elektronenakzeptor und unter Nutzung von BES und Molybdat als Inhibitoren soweit anzureichern, dass anschließend eine Isolierung über Verdünnungsreihen in Agarshakes möglich war.

Eine Strategie, um trotz der Limitierung durch das verfügbare Substrat zu einer höheren Dechlorierungsaktivität und einer Anreicherung zu gelangen, ist die zusätzliche Gabe von halogenierten Verbindungen mit einer höheren Bioverfügbarkeit. Das sogenannte *priming* wurde schon in einer Vielzahl von Studien angewandt (Wu *et al.*, 1998, 1999; Ahn *et al.*, 2005, 2007; Bedard *et al.*, 2007; Liu und Fennell, 2008). Dabei wird der *primer* im Vergleich zu der Substanz mit der geringeren Bioverfügbarkeit in einem 7 bis 14 fachen Überschuss zugegeben (Adrian und Lechner, 2004). Der Zusatz von Substanzen ähnlicher Struktur, speziell die Zugabe von Tetrachlorbenzol, Tetrachloranisol oder Tetrachlorphenol, förderte beispielsweise die Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCDD (Ahn *et al.*, 2005, 2007). Die Zugabe von 2,3,5,6-Tetrachlorbiphenyl oder 2,6-Dibrombiphenyl erhöhte die Dechlorierung von Aroclor 1260, einem PCB-Gemisch (Wu *et al.*, 1998, 1999). Der fördernde Effekt des *priming* liegt in der Stimulierung des Wachstums des dechlorierenden Bakteriums (Wu *et al.*, 1999). Im Anreicherungsprozess des Stammes DCMB5 wurde dieser Effekt ebenfalls genutzt,

indem anstelle von 1,2,4-TrCDD 1,2,3-TrCB eingesetzt wurde. 1,2,3-TrCB ist besser wasserlöslich und lässt sich über eine Hexadecanphase zugeben. Die Nutzung dieses sogenannten Zweiflüssigphasensystems besitzt den Vorteil, dass es zu einer kontinuierlichen Nachlösung des Substrates in niedrigen Konzentrationen (Verteilungskoeffizient Hexadecan/Wasser für 1,2,3-TrCB: 4,04; Holliger *et al.*, 1992) kommt und eventuell toxische Intermediate oder Endprodukte des Dechlorierungsprozesses aus der wässrigen Phase entfernt werden (Holliger *et al.*, 1992; Adrian und Görisch., 2002). Ein positiver Nebeneffekt besteht darin, dass hohe Zellzahlen in den Kulturen erzielt werden können. Zweiflüssigphasensysteme wurden unter anderem im Isolierungsprozess der Stämme FL2 und DCMB5 verwendet (He *et al.*, 2005; Bunge *et al.*, 2008; diese Arbeit). Im Falle von *Dehalococcoides* sp. Stamm DCMB5 stieg der Anteil von 0,0007 % mit 1,2,4-TrCDD auf bis zu 48 % mit 1,2,3-TrCB im Zweiflüssigphasensystem (Bunge *et al.*, 2008; Tab. 16).

4.1.6 Isolierung der dechlorierenden Bakterien

Die Isolierung von *Dehalococcoides* Stämmen aus hoch angereicherten Kulturen erfolgte meist mittels Verdünnungsreihen in Flüssigmedium und/oder Weichagarshakes (Löffler *et al.*, 2005, May *et al.*, 2008). *Dehalococcoides* ssp. bilden zwar auf Agarplatten keine Kolonien, aber im Weichagar mit einem Anteil von 0,5-0,7 % *low melting* Agarose kam es zur Bildung sichtbarer Kolonien (Adrian *et al.*, 2000 b; He *et al.*, 2003 b, Sung *et al.*, 2006; Bunge *et al.*, 2007).

Bei der Isolierung des Stammes DCMB5 wurde zunächst eine Verdünnungsreihe in Zweiflüssigphasenkulturen mit 1,2,3-TrCB als Elektronenakzeptor und Wasserstoff als Elektronendonator hergestellt (Bunge *et al.*, 2008). Aus der höchsten Verdünnungsstufe mit nachweisbarer Dechlorierungsaktivität wurde anschließend eine Verdünnungsreihe in *low melting* Agarose erstellt. Koloniebildung wurde nur bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-4} festgestellt, wohingegen die Dechlorierungsaktivität bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-6} messbar war, das heißt, es waren keine Kolonien des Stammes DCMB5 sichtbar. Aus dem Agaroseshake der Verdünnungsstufe von 10^{-6} wurden zufällig sechs Agarose-Stücke ausgewählt und in frisches Medium mit 1,2,4-TrCDD überführt. Zwei dieser Kulturen zeigten anschließend Dechlorierungsaktivität und in mikroskopischen Analysen ausschließlich Zellen mit der für *Dehalococcoides* typischen Morphologie.

Die Nutzung von organischen Säuren als Elektronendonatoren und Kohlenstoffquelle im frühen Anreicherungsprozess, der Wechsel zu Acetat/Wasserstoff in angereicherten Kulturen,

die Verwendung von Antibiotika sowie hohen Konzentrationen des Elektronenakzeptors und die Entfernung komplexer Zusätze aus dem Kultivierungsmedium können zu einer starken Anreicherung von *Dehalococcoides* sp. führen. Diese hoch angereicherten Kulturen bieten die Möglichkeit der Isolierung von *Dehalococcoides* sp. über Agarshakes und Verdünnungsreihen. Eine Möglichkeit den Anreicherungszeitraum zu verkürzen, wäre die Nutzung eines Percoll-Gradienten (van Doesburg *et al.*, 2005; Fischer, 2007). Hiermit war es möglich, Stamm DCMB5 und den β -Hexachlorcyclohexan-dechlorierenden *D. restrictus* stärker anzureichern, die Isolierung gelang jedoch auf diesem Wege nicht. Weitere Faktoren, die die Anreicherung beeinflussen können, sind die Temperatur (Kittelman und Friedrich, 2008 a), der pH-Wert (Griffin *et al.*, 2004) und das verwendete Reduktionsmittel (May *et al.*, 2008).

4.2 Wachstumserträge des Stammes DCMB5

Die in dieser Arbeit ermittelten Wachstumserträge für Stamm DCMB5 lagen zwischen 2 und 6×10^7 16S rRNA Genkopien pro μmol an freigesetztem Chlorid. Diese Werte entsprechen weitgehend Erträgen der Stämme CBDB1 und 195 nach Wachstum auf 2,3-Dichlorphenol oder des Stammes BAV1 nach Wachstum auf Vinylchlorid (Tab. 20). Bei der Analyse der Wachstumserträge verschiedener *Dehalococcoides* sp. zeigte sich jedoch, dass der Ertrag um eine oder gar zwei (Stamm 195) Größenordnungen variieren konnte. Für diese Diskrepanz finden sich in der Literatur unterschiedliche Erklärungen. Während die Abweichungen im Ertrag des Stammes 195 wahrscheinlich auf die zugrunde gelegte Rechnung zurückzuführen sind (Holmes *et al.*, 2006), erklären Duhamel *et al.* (2004) die Varianz mit Unterschieden in der Physiologie verschiedener *Dehalococcoides* Stämme oder methodischen Fehlern. Dagegen spricht jedoch, dass sich die Wachstumserträge des Stammes DCMB5 für 1,2,3-TrCB bzw. zwei Trichlordibenzodioxine um bis zu einer Größenordnung unterschieden (Ewald *et al.*, 2007; Tab. 15, 16). Die Wahrscheinlichkeit, dass die Diskrepanz auf die verwendeten Elektronenakzeptoren zurückzuführen ist, ist gering, da zum Beispiel ähnliche Erträge nach Wachstum auf VC oder TCE (Cupples *et al.*, 2004 b), Aroclor 1260 (Bedard *et al.*, 2007) und TrCDDs (Ewald *et al.*, 2007) auftraten (Tab. 20). Bunge *et al.* (2008) begründeten die Unterschiede mit verschiedenen initialen Zellzahlen. Eine größere Zahl von Zellen könnte dazu führen, dass ein höherer Anteil des vorhandenen Elektronenakzeptors für den Erhaltungsstoffwechsel genutzt wird und somit nicht für Wachstum oder Biosynthese zur Verfügung steht. Widersprüchlich ist jedoch, dass 2,3-DCP dechlorierende Kulturen des Stammes CBDB1 trotz einer niedrigen Ausgangszellzahl (10^4 Zellen/ml) nur einen Ertrag von

Tab. 20. Wachstumserträge ausgewählter *Dehalococcoides* ssp. bei Nutzung verschiedener Elektronenakzeptoren.

Stamm	Substrat	Wachstumsertrag (10^7 16S rDNA Kopien/ μ mol Chlorid)	Referenz
DCMB5	1,2,3-TrCB	2,0-6,4	diese Arbeit (Tab. 15, 16)
DCMB5	1,2,4-TrCDD	28	Ewald <i>et al.</i> , 2007
DCMB5	1,2,3-TrCDD	25	
CBDB1	Pentachlorbenzol	14	Jayachandran <i>et al.</i> , 2003
CBDB1	Hexachlorbenzol	9	
CBDB1	2,3-DCP	6,3-7,6	Adrian <i>et al.</i> , 2007 a
<i>D. ethenogenes</i>	PCE	230	Holmes <i>et al.</i> , 2006
<i>D. ethenogenes</i>	2,3-DCP	8,3	Adrian <i>et al.</i> , 2007 a
BAV1	Vinylchlorid	6,3	He <i>et al.</i> , 2003 b
VS	Vinylchlorid	52	Cupples <i>et al.</i> , 2003
VS	Vinylchlorid	46	
VS	TCE	58	Cupples <i>et al.</i> , 2004 b
GT	Vinylchlorid	25	
GT	TCE	31	Sung <i>et al.</i> , 2006
<i>Dehalococcoides</i> sp. ANAS-Kultur	Vinylchlorid	1,3	
<i>Dehalococcoides</i> sp. ANAS-Kultur	<i>cis</i> DCE	1,1	Holmes <i>et al.</i> , 2006
<i>Dehalococcoides</i> sp. ANAS-Kultur	TCE	1,4	
<i>Dehalococcoides</i> sp. KB-1/VC-Kultur	Vinylchlorid	56	
<i>Dehalococcoides</i> sp. KB-1/VC-Kultur	TCE	36	Duhamel <i>et al.</i> , 2004
<i>Dehalococcoides</i> sp.	Arochlor1260	93	Bedard <i>et al.</i> , 2007
TrCB-Trichlorbenzol, TrCDD-Trichlordibenzo- <i>p</i> -dioxin, DCP-Dichlorphenol, TCE-Trichlorethen, DCE-Dichlorethen			

$7,6 \times 10^7$ Zellen/ μ mol Chlorid erreichten (Adrian *et al.*, 2007 a). Holmes *et al.* (2006) und Adrian *et al.* (2007 a) erklärten Unterschiede im Wachstumsertrag mit einer Entkopplung von Wachstum und Dechlorierung. Dieses Phänomen wurde bereits von Maymó-Gatell *et al.* (1997) für Stamm 195 beobachtet. Warum es zur Entkopplung von Wachstum und Dechlorierung kommt, ist bislang nicht bekannt. Es wird aber vermutet, dass eine Limitierung von einzelnen Medienkomponenten dafür verantwortlich sein könnte (Adrian *et al.*, 2007 a; Bunge *et al.*, 2008).

4.3 Methoden zur Untersuchung der Populationsstruktur

Die Analyse der Populationsstruktur erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels t-RFLP Analysen von 16S rRNA Genen. Die Sequenzen aus vorhandenen (Wagner, 2004) oder in dieser Arbeit neu generierten Klonbibliotheken (Tab. 13, 14) stellten für die Auswertung eine wichtige Voraussetzung dar. Die t-RFLP Analyse fand bereits eine breite Anwendung bei der Untersuchung von Populationsstrukturen in dechlorierenden Mischkulturen (Ritalahti und Löffler, 2004; Ahn *et al.*, 2007; Bunge *et al.*, 2008; Kittelmann und Friedrich, 2008 a, b), neben anderen 16S rDNA-bezogenen Methoden, wie *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE)-Analysen (Cutter *et al.*, 2001; Duhamel und Edwards, 2006), RFLP-Analysen (Gu *et al.*, 2004; Bedard *et al.*, 2007) oder Fluoreszenz-In situ-Hybridisierung (FISH; Richardson *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005).

T-RFLP, RFLP und DGGE Analysen sind PCR-basierte Methoden, was eine gewisse Fehlerhaftigkeit nach sich zieht. Bereits der Zellaufschluss hat einen Einfluss auf die späteren Ergebnisse (Pulliam Holoman *et al.*, 1998). Ist die Lyse-Methode zu sanft, werden gramnegative Bakterien überrepräsentiert. Ist die Methode zu hart, könnte es zur Scherung der DNA kommen (Kirk *et al.*, 2004). PCR bedingte Fehler entstehen durch die Selektivität der verwendeten Primer, die genutzten Amplifikationsbedingungen (Osborn *et al.*, 2000; Huws *et al.*, 2007) oder durch die Bildung von Chimären (Amann *et al.*, 1995; Kanagawa *et al.*, 2003). Yang *et al.* (2005) beschrieben, dass die mittels DGGE erhaltenen Ergebnisse stark von den verwendeten Primerpaaren abhingen. Auch im Rahmen der Untersuchungen von Wagner (2004) und der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Wahl der Primerpaare entscheidend für die späteren Ergebnisse war. So war beispielsweise die Amplifikation der 16S rRNA Gene an DNA aus dechlorierenden Mischkulturen mit dem Primerpaar fd1/rP2 (Weisburg *et al.*, 1991) nicht möglich (Wagner, 2004). Mit den Primern fd1 und 796r (Sawada *et al.*, 1993) kam es in der vorliegenden Arbeit zu einer Überschätzung des Anteils von *Dehalococcoides* sp. in t-RFLP Analysen (Daten nicht gezeigt). Erst mit Verwendung der Primer fd1 und Eub534 r (Muyzer *et al.*, 1993) wurden in t-RFLP Analysen Ergebnisse erhalten, die weitgehend mit denen mikroskopischer Analysen übereinstimmten (Bunge *et al.*, 2008). Bei diesem Vergleich offenbarte sich ein weiteres Problem der PCR-basierten Methoden. Denn im Vergleich zur direkten Zellzählung kam es in t-RFLP Analysen zur leichten Unterschätzung des Anteils von *Dehalococcoides*. Dies begründet sich wahrscheinlich damit, dass die Zahl der 16S rRNA Genkopien im Genom eines Organismus seinen scheinbaren Anteil an der Gesamtpopulation beeinflusst (Watts *et al.*, 2001; Richardson *et al.*, 2002; Rahm

et al., 2006 a). Organismen mit einer größeren Zahl an 16S rRNA Kopien im Genom wie z.B. Clostridien (Rainey *et al.*, 1996) werden so überrepräsentiert. Im Gegenzug wird beispielsweise der Anteil von *Dehalococcoides* sp. mit nur einer 16S rRNA Genkopie im Genom (Kube *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005) unterschätzt.

Vergleicht man die verschiedenen PCR-basierten Methoden (RFLP, t-RFLP und DGGE) hinsichtlich der Vor- und Nachteile (Watts *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2004), liegt der Vorteil der RFLP-Analysen darin, dass auch sehr ähnliche 16S rRNA Gensequenzen unterschieden werden können. Es kann jedoch auch zu einer weiteren Verzerrung der Detektionsfrequenz einzelner Organismen durch unterschiedliche Transformationseffizienzen und die zufällige Auswahl der Klone kommen. Ein Nachteil von t-RFLP und DGGE Analysen ist, dass sie nur auswertbare Ergebnisse in weniger komplexen Mischkulturen ergeben (Watts *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2004). Bei der t-RFLP Methode kommt hinzu, dass unspezifische terminale Fragmente durch Bildung von so genannten Pseudopeaks (Egert und Friedrich, 2003) oder konkatemere Primersequenzen (Osborne *et al.*, 2005) auftreten können. Diese Artefakte lassen die Mischkulturen komplexer erscheinen, als sie tatsächlich sind. Ein weiterer Nachteil der t-RFLP Analysen besteht darin, dass es erforderlich ist, Klonbibliotheken der in der Mischkultur enthaltenen 16S rRNA Gene zu erstellen und Sequenzanalysen durchzuführen, um die gebildeten terminalen Fragmente bestimmten Organismen zuordnen zu können (Watts *et al.*, 2001). Bei der Anwendung der DGGE Methode können die erhaltenen Banden direkt ansequenziert werden.

Obwohl Lueders und Friedrich (2003) zeigten, dass es möglich ist, ausgewählte Organismen mittels t-RFLP Analysen über die Peakfläche zu quantifizieren, lassen PCR-basierte Methoden aufgrund der konventionell verwendeten Endpunktbestimmung in der Regel keine quantitative Aussage über die Häufigkeit einzelner Bakterien in Mischkulturen zu (Richardson *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005). Richardson *et al.* (2002) untersuchten die Populationsstruktur von ANAS Anreicherungskulturen mittels t-RFLP und FISH. Dabei ergaben die beiden Methoden voneinander abweichende Häufigkeiten der einzelnen detektierten Organismen. Obwohl es mittels t-RFLP möglich war, Unterschiede in der Populationsstruktur unter wechselnden Bedingungen schnell zu detektieren, kam es mit dieser Methode zu einer Überschätzung von *Dehalococcoides* sp. und grampositiven Bakterien mit niedrigem G+C Gehalt. Die alleinige Nutzung der FISH-Analysen hätte hingegen dazu geführt, wichtige in der ANAS-Kultur enthaltene Bakterien zu übersehen. Um ein möglichst realistisches Bild von der Zusammensetzung einer Mischkultur zu erhalten, ist es deshalb notwendig, mehrere Methoden zu kombinieren (Richardson *et al.*, 2002).

Für die Identifikation der dechlorierenden Bakterien in Mischkulturen kamen sowohl PCR-basierte Methoden (Wu *et al.*, 2002 b; Cupples *et al.*, 2003; Ballerstedt *et al.*, 2004; Duhamel und Edwards, 2006) als auch mikroskopische Techniken (Aulenta *et al.*, 2004; Bunge *et al.*, 2007) zum Einsatz. Dem qualitativen Nachweis von *Dehalococcoides* sp. dienten beispielsweise *nested* PCR Ansätze (Ballerstedt *et al.*, 2004) oder DGGE Analysen (Duhamel und Edwards, 2006). Mit DGGE Untersuchungen gelang es, den Nachweis zu erbringen, dass der PCB-dechlorierende Stamm o-17 auch in Gegenwart von Chlorbenzolen (Wu *et al.*, 2002 b) oder Chlorethenen (Miller *et al.*, 2005) wuchs. Die quantitative Analyse von *Dehalococcoides* sp. wurde mittels kompetitiver PCR (Cupples *et al.*, 2003), MPN-PCR (Fagervold *et al.*, 2005), quantitativer PCR (He *et al.*, 2003 a; Duhamel und Edwards, 2006; Bunge *et al.*, 2008), FISH (Aulenta *et al.*, 2004; Bunge *et al.*, 2007) oder durch mikroskopische Zählung nach Anfärben mit Coomassie (Bunge *et al.*, 2008) durchgeführt. Während man mit der herkömmlichen FISH-Methode unter nicht-limitierenden Bedingungen in Bioreaktoren *Dehalococcoides* problemlos detektieren konnte (Aulenta *et al.*, 2004), war es im Anreicherungsprozess des Stammes VZ effektiver, die sensitivere *catalyzed reporter deposition* (Card)-FISH-Technik für die Quantifizierung von *Dehalococcoides* einzusetzen (Bunge *et al.*, 2007). Bei allen Vor- und Nachteilen der genannten Methoden wird zur Quantifizierung von *Dehalococcoides* aufgrund der hohen Sensitivität und der guten Reproduzierbarkeit wahrscheinlich in Zukunft überwiegend die quantitative PCR ihre Anwendung finden. Nicht nur in Anreicherungskulturen, sondern auch zur Abschätzung des Dechlorierungspotentials an kontaminierten Standorten, kann die Bestimmung der Kopienzahl von 16S rRNA- und/oder funktionellen (*rdhA*) Genen oder Transkripten einen Überblick über die Zahl und Aktivität der dehalorespirierenden Bakterien geben.

4.4 Mögliche Interaktionen zwischen Dechlorierern und Vertretern der Mischkultur

Ein interessanter Aspekt bei der Analyse von dechlorierenden Mischkulturen ist, dass viele identifizierte Organismen bereits in anderen Anreichungskulturen dehalorespirierender Bakterien nachgewiesen wurden (Tab. 21). Speziell SHA- und SJA-16S rRNA Gensequenzen aus 1,2-Dichlorpropan- und Trichlorbenzol-dechlorierenden Mischkulturen (Schlötterburg *et al.*, 2000, von Wintzingerode *et al.*, 1999) sind auch in einer Vielzahl weiterer dechlorierender Populationen zu finden. Das deutet auf spezifische Interaktionen innerhalb der dechlorierenden Ökosysteme hin. Es ist zwar auch möglich, dass diese Koanreicherung mit den physikalisch-chemischen Bedingungen (pH-Wert, Chloridkonzen-

tration, Redoxpotential) zusammenhängt, die für die reduktive Dechlorierung benötigt werden. Andererseits ist es aber auch denkbar, dass sie auf syntrophen oder chemischen Beziehungen der Mitglieder beruht (Gu *et al.*, 2004). Entsprechende Signatur-Organismen könnten in Kombination mit dem Nachweis dechlorierender Bakterien helfen, an kontaminierten Standorten vorauszusagen, ob eine komplette oder partielle Dechlorierung ohne Eingriff des Menschen möglich ist (Gu *et al.*, 2004).

Ein Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Populationsstruktur von Stamm DCMB5-haltigen Anreicherungskulturen mit anderen dechlorierenden Kulturen zeigte, dass die 16S rRNA Gensequenzen von Vertretern der *Spirochaetes*, *Bacteroidetes* und von *Sedimentibacter* sp., *Syntrophus* sp., *Desulfovibrio* sp. und *Dehalococcoides* sp. häufig zu finden sind, unabhängig von den verwendeten Elektronenakzeptoren, Elektronendonatoren und Anreicherungsstrategien (Tab. 21). Die Vermutung, dass die wiederholt in dechlorierenden Kulturen identifizierten Organismen in syntropher oder mutualistischer Beziehung zu den dehalorespirierenden Bakterien stehen, wird dadurch unterstützt, dass z.B. ein *Desulfovibrio* sp. für das Wachstum von Stamm DF-1 essentiell war (May *et al.*, 2008) und eine Kokultivierung mit *Desulfovibrio* sp. die Dechlorierungsaktivität des Stammes 195 förderte (He *et al.*, 2007). Syntrophe Beziehungen wurden auch für Kokulturen, bestehend aus *Dehalobacter* sp. und *Sedimentibacter* sp. (van Doesburg *et al.*, 2005) bzw. aus *Dehalococcoides* sp., *Desulfitobacterium* sp. und *Syntrophus* sp. (Bunge *et al.*, 2007), postuliert. Nur in aktiv Arochlor 1260 dechlorierenden Kulturen waren auch *Bacteroidetes*- und *Spirochaetes*-Vertreter zu finden (Fagervold *et al.*, 2007).

Während für letztere bisher keine Hinweise auf ihre Funktion in dehalorespirierenden Gemeinschaften existieren, gibt es für *Desulfovibrio* sp. und *Syntrophus* sp. Indizien, dass sie über den Wasserstoff-Stoffwechsel mit dem dechlorierenden Partner in Verbindung stehen. So wurde für *Desulfovibrio* sp. beschrieben, dass es in Abwesenheit von Sulfat in der Lage war, Substrate wie Laktat unter Wasserstofffreisetzung zu fermentieren, sofern eine syntrophe Interaktion mit einem Wasserstoff-verwertenden Bakterium bestand (Richardson *et al.*, 2002). *Syntrophus* ssp. sind bei der Verwertung von Benzoat auf einen syntrophen Partner angewiesen (Schink *et al.*, 1997). Die Wasserstoff-verbrauchenden Organismen sind dabei in der Regel methanogene Archaea. Bunge *et al.* (2007) beschrieb eine Benzoat-oxidierende syntrophe Gemeinschaft aus *Syntrophus* sp., *Desulfitobacterium* sp. und *Dehalococcoides* sp., bei der dechlorierende Bakterien die Wasserstoff-verbrauchenden Partner waren. Der Abbau der zugesetzten organischen Säuren durch nicht-dechlorierende Mitglieder der Mischkulturen fördert die dechlorierenden Bakterien vermutlich durch Freisetzung benötigter Elektronen-

Tab. 21. Populationszusammensetzung dechlorierender Mischkulturen. Wiederholt auftretende Organismen sind farbig hervorgehoben.

Kultur	Methode	Dominante Organismen	Referenz
Dioxin-dechlorierendes Konsortium	RFLP	Vertreter der <i>Bacteroidetes</i> , <i>Clostridium</i> sp., <i>Trichococcus</i> sp., <i>Desulfovibrio</i> sp., <i>Geobacter</i> sp., <i>Syntrophus</i> sp., <i>Desulfobacterium</i> sp., <i>Chloroflexi</i>	Hiraishi <i>et al.</i> , 2005 a
DCMB5-Anreicherungskultur (1,2,4-TrCDD-Dechlorierung)	RFLP	<i>Syntrophus</i> sp., <i>Trichococcus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Sedimentibacter</i> sp., <i>Dehalococcoides</i> sp.	Bunge <i>et al.</i> , 2008
DCMB5-Anreicherungskultur (1,2,3-TrCB-Dechlorierung)	RFLP	<i>Syntrophus</i> sp., <i>Trichococcus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Bacteroidetes</i> , <i>Chloroflexi</i> : Klon SHA-300, <i>Dehalococcoides</i> sp.	Bunge <i>et al.</i> , 2008
DCMB5-Anreicherungskultur (1,2,3-TrCB-Dechlorierung)	t-RFLP	<i>Clostridium</i> sp., <i>Sedimentibacter</i> sp., <i>Desulfovibrio</i> sp., Vertreter der <i>Spirochaetes</i> (u.a. Klon SJA-168), <i>Acetobacterium</i> sp., <i>Bacteroidetes</i> , <i>Dehalococcoides</i> sp.	diese Arbeit
PCB-dechlorierendes Konsortium	RFLP	Vertreter der <i>Bacteroidetes</i> , <i>Tauera</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Sedimentibacter</i> sp., Klon SHA-53, <i>Dehalococcoides</i> sp.	Bedard <i>et al.</i> , 2006
Arochlor 1260 dechlorierendes Konsortium	RFLP	<i>Tauera</i> sp., <i>Actinobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., Vertreter der <i>Bacteroidetes</i> , <i>Geobacteraceae</i> sp., <i>Sedimentibacter</i> sp., Klon SHA-53, <i>Clostridium</i> sp., <i>Dehalococcoides</i> sp.	Bedard <i>et al.</i> , 2007
o-17 Anreicherungskultur (PCB-Dechlorierung)	DGGE	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Aminobacterium</i> sp., <i>Spirochaeta</i> sp., <i>Desulfovibrio</i> sp.	Cutter <i>et al.</i> , 2001
o-17 Anreicherungskultur (PCB-Dechlorierung)	DGGE	<i>Thermotoga</i> sp., Vertreter der <i>Bacteroidetes</i> , <i>Desulfothiovibrio</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Syntrophus</i> sp., <i>Desulfuromonas</i> sp.	Pulliam Holoman <i>et al.</i> , 1998
2,3,4,5-Tetrachlorbiphenyl-dechlorierende Mischkultur	DGGE	<i>Clostridium</i> sp., Klon SHA-15, <i>Anaerolinea</i> sp., <i>Pelospira</i> sp., <i>Syntrophomonas</i> sp., <i>Desulfosarcina</i> sp., <i>Dehalococcoides</i> sp.	Yan <i>et al.</i> , 2006
PCB-dechlorierende Mischkultur	RFLP	<i>Desulfuromonas</i> sp., <i>Desulfovibrio</i> sp., <i>Aminobacterium</i> sp., <i>Acetivibrio</i> sp., <i>Thermotoga</i> sp.	Watts <i>et al.</i> , 2001
Anreicherungskultur Stamm VZ (PCE-Dechlorierung)	DGGE	<i>Clostridium</i> sp., <i>Sedimentibacter</i> sp., <i>Desulfovibrio</i> sp., <i>Desulfitobacterium</i> sp., <i>Syntrophus</i> sp., <i>Dehalococcoides</i> sp.	Bunge <i>et al.</i> , 2007
KB-1 Anreicherungskultur: PCE-Dechlorierung	DGGE	Vertreter der <i>Bacteroidetes</i> , <i>Desulfotomaculum</i> sp., <i>Geobacter</i> sp., <i>Spirochaetes</i> , <i>Sulfurospirillum</i> sp., <i>Syrophobacter</i> sp., <i>Syntrophomonas</i> sp., <i>Dehalococcoides</i> sp.	Duhamel und Edwards, 2006
VC-Dechlorierung	DGGE	<i>Acetobacterium</i> sp., Vertreter der <i>Bacteroidetes</i> , <i>Geobacter</i> sp., Vertreter der <i>Spirochaetes</i> , <i>Syntrophus</i> sp., <i>Dehalococcoides</i> sp.	
TCE/cDCE dechlorierendes Konsortium	RFLP	Vertreter der <i>Spirochaetes</i> , <i>Sedimentibacter</i> sp., Vertreter der <i>Chloroflexi</i>	Gu <i>et al.</i> , 2004
PCE-dechlorierendes Konsortium	SIP	Vertreter der <i>Bacteroidetes</i> , Vertreter der <i>Chloroflexi</i> : Lahn-Cluster, DF-1, δ -Proteobakterien (<i>Desulfuromonas</i> sp., <i>Desulfomonile tiedjei</i>), Vertreter der <i>Spirochaetes</i>	Kittelman und Friedrich, 2008 a, b
TCE-dechlorierendes Konsortium	RFLP	<i>Acetobacterium</i> sp., <i>Sphingobacterium</i> sp., Vertreter der <i>Bacteroidetes</i> und <i>Spirochaetes</i> , <i>Trichlorobacter</i> sp., <i>Sulfurospirillum</i> sp.	Macbeth <i>et al.</i> , 2004
ANAS-Anreicherungskultur: TCE-Dechlorierung	t-RFLP/RFLP	<i>Bacteroides</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Desulfovibrio</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., <i>Clostridium</i> sp.	Freeborn <i>et al.</i> , 2005

donatoren, Kohlenstoffquellen und anderer Nährstoffe. Unter den Bakterien, die in der Anreicherungskultur des Stammes DCMB5 nachgewiesen wurden, vergären zum Beispiel *Sedimentibacter* ssp. (Breitenstein *et al.*, 2002), Vertreter der *Clostridia* (Dorn *et al.*, 1978; Cato *et al.*, 1986), *Desulfovibrio acidaminovorans* (Surkov *et al.*, 2001) und *Trichococcus* ssp. (Janssen *et al.*, 1995) Pyruvat zu Acetat und zum Teil zu weiteren Produkten. Die Zugabe vergleichsweise hoher Konzentrationen von Vitamin B₁₂ ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Dechlorierungsaktivität von *Dehalococcoides* sp. in diversen Reinkulturen (Adrian *et al.*, 2000 b; He *et al.*, 2007). Dementsprechend stellen Mitglieder der Mischkultur vermutlich nicht nur Elektronendonatoren oder Kohlenstoffquellen zur Verfügung, sondern auch Vitamine oder Spurenelemente.

Obwohl *Dehalococcoides* ssp. in Reinkultur dechlorieren und wachsen können, sind dehalorespirierende Mischkulturen wesentlich robuster und leichter zu erhalten. Das zeigt, dass syntrophe oder mutualistische Beziehungen und/oder geeignete biochemische Bedingungen, wie Redoxpotential oder pH-Wert, das Umfeld der dechlorierenden Bakterien zu stabilisieren scheinen. Demzufolge können genauere Populationsuntersuchungen helfen zu verstehen, welche Bedingungen einen kritischen Einfluss auf den Weg und das Ausmaß der Dechlorierung sowie auf das Wachstum von Vertretern der *Dehalococcoidetes* haben.

4.5 Methodische Ansätze zur Analyse von *rdhA* Genen und Transkripten

In vorangegangenen Analysen wurden *rdhA* Gene oder Transkripte mit spezifischen Primern (Smidt, 2001; Holmes *et al.*, 2006; Ritalahti *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2006; Daprato *et al.*, 2007) und/oder degenerierten Primern (Smidt, 2001; von Wintzingerode *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2003; Rhee *et al.*, 2003; Regeard *et al.*, 2004) an DNA oder cDNA diverser dehalorespirierender Kulturen amplifiziert und nach Klonierung mittels RFLP Untersuchungen sowie anschließender Sequenzierung analysiert. Die spezifischen Primer fanden ihre Anwendung meist in Transkriptionsanalysen und wurden überwiegend in *nested*-PCR (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004) oder qPCR Ansätzen (Johnson *et al.*, 2005 a, b; Fung *et al.*, 2007) genutzt.

Degenerierte Primer wurden größten Teils bei der Suche nach neuen *rdhA* Gensequenzen verwendet. Die hohe Divergenz der *rdhA* Gensequenzen erschwerte allerdings das Design universeller Primer (Rhee *et al.*, 2003; Regeard *et al.*, 2004; diese Arbeit). So zeigte beispielsweise ein Alignment der Gene *pceA_{D. multivorans}*, *cprC_{D. dehalogenans}* und *tceA_{D. ethenogenes}*, dass im N-Terminus nur sieben von 280 bis 350 bp konserviert waren (Rhee *et al.*, 2003). Im

C-Terminus waren im Bereich der Fe/S-Cluster Bindemotive immerhin 31 konservierte Aminosäuren zu finden, so dass degenerierte Primer oftmals in den Regionen der Fe/S Bindemotive abgeleitet wurden (Smidt, 2001; von Wintzingerode *et al.*, 2001; Rhee *et al.*, 2003). Auch in Analysen zur Transkription von *rdhA* Genen wurden degenerierte Primer verwendet (Smidt, 2001; Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005). Mit Hilfe des bereits erwähnten degenerierten Primerpaars RRF2/B1R war es möglich, eine putative Vinylchlorid-Dehalogenase zu identifizieren (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004), und es wurde gezeigt, dass bei der Dechlorierung verschiedener chlorierter Aliphaten gleichzeitig multiple *rdhA* Gene transkribiert werden (Waller *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals t-RFLP Analysen für den Nachweis von *rdhA* Genen und Transkripten genutzt. Im Vergleich zur Klonierungsstrategie oder zur Analyse aller *rdhA* Gene und Transkripte mit Hilfe spezifischer Primer erlaubt die Anwendung des t-RFLP Ansatzes einen höheren Probendurchsatz bei geringerem Arbeitsaufwand. Dabei kann durch die Analyse der Bandenintensität der RT-PCR-Produkte eine Aussage über die Induktion von *rdhA* Genen getroffen werden. Zudem lässt eine Bestimmung der relativen Peakflächen, wie im Rahmen dieser Arbeit verwendet, einen Schluss über differentielle Unterschiede im Transkriptionsniveau einzelner *rdhA* Transkripte bei Nutzung verschiedener Substrate zu. Bei der Bewertung von differentiellen Unterschieden in den relativen Peakflächen muss allerdings beachtet werden, dass bereits die verwendeten degenerierten Primer einen Effekt auf die Amplifikationseffizienz der einzelnen *rdhA* Gene haben (Lueders und Friedrich, 2003). Hinzu kommt, dass eine quantitative Aussage nur dann möglich ist, wenn die verwendete Zyklenzahl im exponentiellen Bereich der PCR lag. Da in der vorliegenden Arbeit nur RT-PCR-Produkte bei Zyklenzahlen von 36 bis 50 erhalten wurden, ist es wahrscheinlich, dass überwiegend bereits die Plateau-Phase der PCR erreicht wurde. Betont werden muss, dass eine Analyse der relativen Peakflächen keine Auskunft über die absoluten Transkriptmengen der einzelnen *rdhA* Gene gibt.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass der t-RFLP Ansatz hervorragend geeignet ist, um bei Verwendung verschiedener Elektronenakzetoren einen Überblick über die im Versuchsverlauf transkribierten Gene zu erhalten. Neben der Nutzung des t-RFLP Ansatzes in Transkriptionsanalysen wäre ein weiteres Feld der Anwendung die Suche nach *rdhA* Genen und Transkripten an kontaminierten Standorten, um vorhandenes Dechlorierungspotential zu erkennen.

4.6 Identifikation von *rdhA* Genen im Genom des Stammes DCMB5

In Mischkulturen, die den Stamm DCMB5 enthielten, wurden im Rahmen dieser Arbeit 22 *rdhA* Gene identifiziert. Das bestätigt bisherige Erkenntnisse, dass die verschiedenen *Dehalococcoides* Stämme multiple Kopien an *rdhA* Genen besitzen. So ergaben beispielsweise die Genomsequenzen der Stämme CBDB1, 195, BAV1 und VS die Existenz von 32, 17, 14 und 34 *rdhA* Genen (Kube *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005). In Abb. 33 sind die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *rdhA* Gene der Stämme CBDB1, BAV1 und 195 in einem Stammbaum dargestellt. Die in Stamm DCMB5 detektierten *rdhA* Gensequenzen sind dabei entsprechend ihrer höchsten Ähnlichkeit auf DNA Ebene bestimmten Genen der Stämme CBDB1, BAV1 und 195 zugeordnet.

Die sieben mit den Primern RRF2/B1R amplifizierte und klonierte, fast vollständigen *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 wurden sequenziert. Aufgrund einer hohen Sequenzidentität (Tab. 17) liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Genen um Orthologe der entsprechenden Gene der Stämme CBDB1 und 195 handelt. Bei der Untersuchung von *rdhA* Gensequenzen der *Dehalococcoides* Stämme CBDB1, FL2, BAV1 und 195 zeigte sich, dass es in jedem Stamm sowohl Gene gab, die hohe Sequenzähnlichkeiten (>85 %) zu Genen anderer Stämme aufwiesen, als auch Gene, die spezifisch für den entsprechenden Stamm waren (Hölscher *et al.*, 2004). Sowohl die fast vollständigen Sequenzen des *orfA* der Gene DCMB *rdhA6*, *rdhA7*, *rdhA8*, *rdhA9*, *rdhA10*, *rdhA12* und *rdhA13* als auch die Teilsequenzen der anderen identifizierten *rdhA* Gene zeigten auf DNA Ebene Sequenzidentitäten zwischen 80 und 100 % zu den *rdhA* Genen anderer *Dehalococcoides* Stämme. Die hohe Zahl orthologer *rdhA* Gene legt eine engere Verwandtschaft des Stammes DCMB5 zu Stamm CBDB1 als zu den Stämmen 195 bzw. BAV1 nahe. Die Stämme CBDB1 und 195 besitzen 11 orthologe *rdhA* Gene, die Stämme CBDB1 und BAV1 fünf (Abb. 33).

In den nahezu kompletten Sequenzen des *orfA* der Gene DCMB *rdhA6*, *rdhA7*, *rdhA8*, *rdhA9*, *rdhA10* und *rdhA13* wurde nach konservierten Regionen, wie zum Beispiel Fe/S-Cluster Bindemotiven, gesucht. In den abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 waren zwei Fe/S-Bindemotive zu finden (Abb. 34). Das erste Bindemotiv, das charakteristisch für reduktive Dehalogenasen von *Dehalococcoides* ssp. ist (Hölscher *et al.*, 2004), wies die Sequenz CxxCxxCxxxCP auf. Diese Sequenz repräsentiert das Bindemotiv von Fe₄S₄-Clustern des Ferredoxin-Typs (Bruschi und Guerlesquin, 1988). Das zweite Fe/S-Motiv, das in der abgeleiteten Aminosäuresequenz der *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 zu finden war, zeigte Abweichungen von der Konsensussequenz des ersten

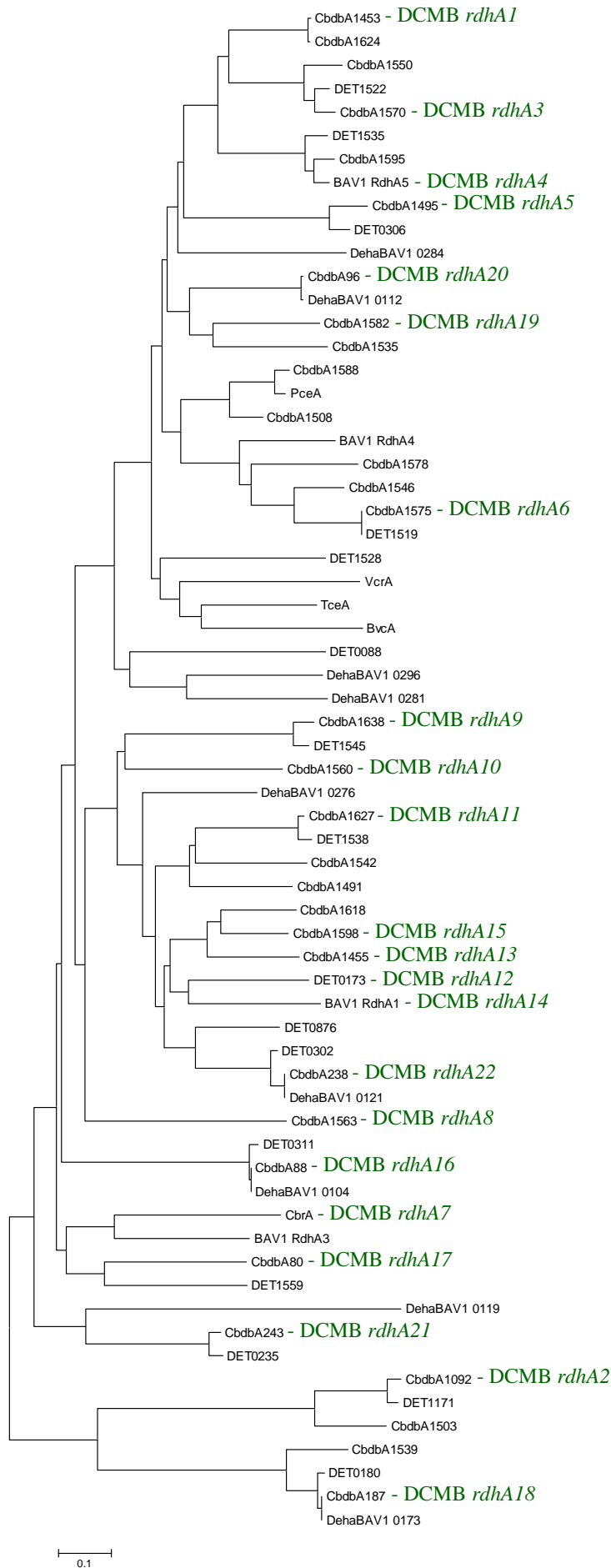


Abb. 33. Stammbaum basierend auf Proteinsequenzen der *Dehalococcoides* sp. Stämme 195, CBDB1 und BAV1. Die VcrA-Aminosäuresequenz wurde ebenfalls eingefügt. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 wurden entsprechend ihrer höchsten Ähnlichkeit auf DNA-Ebene zugeordnet. Die Länge des Balkens stellt einen Sequenzunterschied von 10 % dar.

Bindemotivs. In den sieben untersuchten *rdhA* Genen des Stammes DCMB5 waren das erste und das zweite Cystein durch vier bis 14 Aminosäuren getrennt (Abb. 34) und auch das konservierte Prolin war nur in der Aminosäuresequenz des Gens DCMB *rdhA8* zu finden. In den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Gene DCMB *rdhA8* und *rdhA9* wurde zudem ein fünfter Cysteinrest *upstream* des zweiten Fe/S-Bindemotivs lokalisiert. Ähnliche Sequenzvariationen im zweiten Fe/S-Bindemotiv wurden bereits in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen anderer *rdhA* Gene in *Dehalococcoides* ssp. identifiziert (Hölscher *et al.*, 2004). Es finden sich aber im zweiten Fe/S-Bindemotiv nicht nur vom Ferredoxin-Typ abweichende Sequenzen (Magnuson *et al.*, 2000; Hölscher *et al.*, 2004). In der Aminosäuresequenz von TceA gibt es beispielsweise zwei Bindemotive der Sequenz CxxCxxCxxxCP (Magnuson *et al.*, 2000; Abb. 34). EPR Analysen von gereinigten reduktiven Dehalogenasen zeigten, dass sowohl zwei Fe₄S₄-Cluster als auch ein Fe₄S₄- und ein Fe₃S₄-Cluster gebunden sein können (van de Pas *et al.*, 1999; Maillard *et al.*, 2003). Die Detektion eines Fe₄S₄- und eines Fe₃S₄-Clusters in der *ortho*-Chlorphenol RdhA (CprA) aus *Desulfitobacterium dehalogenans* (van de Pas *et al.*, 1999) korrespondierte mit der Trennung der ersten beiden Cysteinreste im zweiten Fe/S-Bindemotiv durch 12 Aminosäuren. Obwohl das zweite Fe/S Bindemotiv der PCE-RdhA von *Dehalobacter restrictus* ebenfalls einen großen Abstand zwischen den ersten beiden Cysteinresten zeigt, ist hier ein Fe₄S₄-Cluster gebunden (Maillard *et al.*, 2003). Das wird eventuell durch Ausbildung einer Schleife durch strukturaufbrechende flankierende Glycin- und Prolin-Reste ermöglicht.

Die Anwesenheit eines Cobalamin-Kofaktors wurde für einige gereinigte reduktive Dehalogenasen gezeigt (van de Pas *et al.*, 1999; Kräutler *et al.*, 2003; Maillard *et al.*, 2003). So identifizierten beispielsweise Kräutler *et al.* (2003) ein Norpseudovitamin B₁₂ als Kofaktor der PCE-RdhA von *Sulfurospirillum multivorans*. Auch für reduktive Dehalogenasen von *Dehalococcoides* ssp. ist anzunehmen, dass sie einen Cobalamin-Kofaktor besitzen, da die für Corrinoiden typische lichtreversible Hemmung der Dechlorierungsaktivität der Tetrachlor- bzw. Trichlorethen RdhA des Stammes 195 (Magnuson *et al.*, 1998) und der Chlorbenzoldechlorierung in Stamm CBDB1 durch Jodoalkane beobachtet wurde (Hölscher *et al.*, 2003). Ein Cobalaminbindemotiv mit der Konsensussequenz DxHxxGx₄₁SxLx₂₆₋₂₈GG (Ludwig und Matthews, 1997), wie es auch für Methyltransferasen beschrieben wurde (Burke und Krzycki, 1995), wurde jedoch nur sehr selten in den Aminosäuresequenzen reduktiver Dehalogenasen nachgewiesen. Bei einer Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von insgesamt 51 *rdhA* Genen der *Dehalococcoides* Stämme CBDB1, FL2, BAV1 und 195 wurde das DxHxxG-Teilmotiv nur in einem *rdhA* Gen des Stammes 195 identifiziert (Hölscher *et*

DCMB RdhA12	NSNVCISPEYGSVHG-YFDIITDLPMPATHPIDAGIFRFCHTCHKCADECPAKCIDQGSE	390
DCMB RdhA13	NNGFCTSPEYGPILG-VFSLVTDMPLEPTNPIDAGIWRFCQTCTKCADACPVNAIPKDHE	358
DCMB RdhA10	QGNLYCLTPETGPNHI-PFTMLTDFPLVPTKPIDAGLFRFCHSCKKCADACPSQSISHADE	395
DCMB RdhA9	QKLYTLTPEYGAPGR-LYGVLTDLPLEPHTPIDAGIYRFCHSCQKCADSCPPQCSKEKE	298
DCMB RdhA6	LG-QCVFPEYGTMAR-LGSVITDLPLVPDKPIDSGVWNFCCTCKLCASHCPGALNPDDV	361
DCMB RdhA8	MGQIIIGSPEYGGLLRTHAVFYTDLPLPVTNPIDAGFVKFCETCGICAETCPVGAIQERGI	385
DCMB RdhA7	LN-CLVNPWHGALIRKADFMLTDLPLAPTRPIDSGITRFCACTCKKCAEMCPGALSADG	244
TceA ^a	VSSIIIEP-RYGSNTKGLRMLTDLPLAPTKPIDAGIREFCCTCGICAHECPTQAISHEGP	457
PceA ^b	NG-LLITQKFGPRHR-IAKVYTDLELAPDKPRKFGVREFCRLCKKCADACPAQAISHEKD	440
CprA ^c	TGDCAIHPRLGYRHK-VAAVTTDLPLAPDKPIDFGLLDFCRVCKKCADNCPNDAITFDED	350
	* . ** : . * . * . ** * ** . ** . :	
DCMB RdhA12	P-TWDFPASYKPEMPVDYHAPGKRLFWNDPIACQMYSN-SVAGA-CGVCMATCTFNTNG	447
DCMB RdhA13	P-SWELPTVYGKPDIT--HSPGRKQYWTNALDCWLFLT-EYNG--CGACMATCTFNTN-	410
DCMB RdhA10	P-SWDVDPVDGKPRVF---CNPGHKGFWPDMAGCNYYSKGGGTSG-CWVCYANCTFSEDK	450
DCMB RdhA9	P-SWDLPLTEGKETIY---SVKGTKAFYNNLPLCCQYSN-ETSHG-CRICWGECTFTVNR	352
DCMB RdhA6	P-SWDVKYSG-----NHPGKKVYHCDGMNCRGYWY-DLTSLSICIVASCVFAKKN	409
DCMB RdhA8	DRSWDNNCGQSWADDKQAGGSKVMYNI PGYKGWRCNLFSCAFTPC-ASACKSNCFNAIG	444
DCMB RdhA7	P-SWDTLQAQNG-----LGVKNYTNDWHKCRPWA WPPSPNTVGS-CGVCQAVCVFSKLE	296
TceA ^a	R-----YDSPHWDCVSGYEGWHLDYHKCIN---CTICEAVCFPTTMS	496
PceA ^b	PKVLQPEDCEVA-----ENPYTEKWHLDSNRCGSFWAYNGSP--CANCVAVCSWNKVE	491
CprA ^c	P-----IEYNGYLRWNSDFKKCTEFRTTNEEGSSCGTCLKVCVWNSKE	393
	. * * :	
DCMB RdhA12	-ASMIHDVVKATLAKTSLLNGLFWNADKAFGYGLVEGD--EKEKFWEIG--LPAYGFDTT	502
DCMB RdhA13	-IAPIHELVRTTLATTPLLN ^{SFL} WQADKFFGYGLTE----DKEAWWDL--MPVYGFDSA	463
DCMB RdhA10	-AAMMHNIIRGTVSTTSLFNGFFSSMSNTFGYGP-YE---SPEVWWDMS--LPAYGF DST	503
DCMB RdhA9	-GALVHQI IKGTIANIPLFNTRYFYKLGDAFGYGTDPDPE---KAEAWWDL--LPTLGQDST	406
DCMB RdhA6	-KAGIHDIIKATTAVTPAFNSFFRTMDQAFGYKYSNR---DPESWWDING-EPMFGIDSR	464
DCMB RdhA8	DGSFVHSIVKSTVATSPIFNSFFTSMEGVLHYG-KQDK--DPASWWSNPDEWF IYGTHPN	501
DCMB RdhA7	-ESSVHDI IKPVVSQTPLFNRF ^{FKR} MDDMFNYPNEN---PEEWSRDKYKNPYSRVAVP	351
TceA ^a	NNSWVHNLVKSTVATTPVFNNGFFKNMEGAFGYGPRYSP--SRDEWWASEN--PIRGASVD	552
PceA ^b	--TWNHDVAR-IATQIPLLQDAARKFDEWFYNGPVPN ^{DER} LESGYVQNMVKDFWNNPES	548
CprA ^c	-DSWFHKAGVWVGSKGEEAAS ^{TFL} KSIDDI ^F GYGTETI---EKYKWWLEWP--EKYPLKPM	447
	: * . : . : * :	
DCMB <i>rdhA12</i>	VGSTVGGY--	510
DCMB <i>rdhA13</i>	ATSSQGGYNK	473
DCMB <i>rdhA10</i>	IGAAKGGYSK	513
DCMB <i>rdhA9</i>	IVAADAGYGK	416
DCMB <i>rdhA6</i>	Y-----	465
DCMB <i>rdhA8</i>	LLRQ-----	505
DCMB <i>rdhA7</i>	GN-----	353
TceA ^a	IF-----	554
PceA ^b	IKQ-----	551
CprA ^c	-----	

Abb. 34. Teilalignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *rdhA* Gene des Stammes DCMB5, die mit den Primern RRF2/B1R amplifiziert und identifiziert wurden. Dem Alignment wurden partielle Aminosäuresequenzen von TceA aus Stamm 195 (a), PceA aus *Dehalobacter restrictus* (b) und CprA aus *Desulfitobacterium dehalogenans* (c) hinzugefügt. Gelb unterlegt sind konservierte Aminosäuren putativer Fe/S-Bindemotive. Grau markiert sind Aminosäuren eines putativen Cobalaminbindemotivs.

al., 2004). Zwei *rdhA* Gene des Stammes CBDB1, drei des Stammes FL2, und ein Gen des Stammes BAV1 kodierten eine Variante dieses Motivs mit der Sequenz DxxHxxG. In der Aminosäuresequenz dieser sieben *rdhA* Gene wurden zusätzlich auch Varianten des Teilmotivs SxLx₂₆₋₂₈GG identifiziert. Unter den sieben in dieser Arbeit näher untersuchten *rdhA* Genen des Stammes DCMB5 besaß nur das Gen DCMB *rdhA13* (höchste Ähnlichkeit zu *cbdbA1455*) mit der Sequenz DxxHxxGx₅₂SxLx₃₆GG eine Variante des Cobalamin-

bindemotivs (Abb. 34). Die Sequenzbereiche zwischen den einzelnen konservierten Teilen des Bindemotivs sind größer als in der von Ludwig und Matthews (1997) postulierten Konsensussequenz.

Die *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 zeigen also typische konservierte Bereiche reduktiver Dehalogenasen und widerspiegeln ebenfalls die hohe Sequenzvariabilität von *rdhA* Genen. Letzteres deutet auf eine weit zurückliegende evolutionäre Trennung, häufige Rekombinationsereignisse und horizontalen Gentransfer hin (Hölscher *et al.*, 2004; Regnard *et al.*, 2005; McMurdie *et al.*, 2007; West *et al.*, 2008).

4.7 Transkriptionsanalysen des Stammes CBDB1 unter Nutzung verschiedener chlorierter Elektronenakzeptoren

Transkriptionsanalysen des Stammes CBDB1 zeigten in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten die Expression aller 32 *rdhA* Gene als Antwort auf die Zugabe von 1,2,3-TrCB und 1,2,4-TrCB (Abb. 17, Anhang 12). Nach Induktion mit 2,3-DCDD wurden fast ebensoviel Transkripte in t-RFLP Studien identifiziert (Abb. 22). Ein ähnlich breites Spektrum von Transkripten wurde auch bei Expressionsanalysen des Stammes 195 mit verschiedenen Elektronenakzeptoren beobachtet (Fung *et al.*, 2007). In Gegenwart von PCE, TCE und 2,3-DCP wurden 19, 15 und 11 *rdhA* Transkripte des Stammes 195 in der exponentiellen Wachstumsphase detektiert. Die parallele Transkription mehrerer *rdhA* Gene scheint bei *Dehalococcoides* ssp. verbreitet zu sein (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004; Rahm *et al.*, 2006 b), denn auch Waller *et al.* (2005) zeigten, dass es in einer PCE-dechlorierenden Anreicherungskultur mit VC als Elektronenakzeptor zur Transkription von vier *rdhA* Genen kam. Zusätzlich wurde auf Proteinebene festgestellt, dass die Expression mehrerer *rdhA* Gene induziert wurde (Morris *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2007). Nach Kultivierung von Stamm 195 auf PCE wurden die RdhA-Proteine PceA, TceA, DET1559 und DET1545 und nach Wachstum von Stamm CBDB1 mit 2,3-Dichlorphenol die Proteine CbdbA1588, CbdbA88 und CbdbA80 nachgewiesen (Morris *et al.*, 2007).

Betrachtete man die Transkriptionsniveaus ausgewählter *rdhA* Gene nach Zugabe von PCE, 2,3-DCDD, 1,2,3-TrCB und 1,2,4-TrCB, war eine Zunahme der Transkriptzahl pro Zelle zu beobachten, die nach Erreichen eines Maximums im laufenden Dechlorierungsprozess konstant blieb (Abb. 16, 20, 21, 25, 26; Junick, 2007). Nach vollständigem Umsatz der zugegebenen Trichlorbenzole nahm die Menge an Transkript langsam ab und erreichte letztendlich wieder das Ausgangsniveau (Abb. 20). In den Versuchen mit 2,3-DCDD zeigte

sich hingegen ein anderes Bild. Das Transkriptionsniveau der untersuchten *rdhA* Gene blieb nach Erreichen des Maximums bis zum Ende des Versuchs konstant (Abb. 25), obwohl die Dechlorierung bereits nach 48 h abgeschlossen war (Abb. 21). Diese Diskrepanz ist möglicherweise auf die Durchführung der Messung der Dechlorierungsaktivität und der Transkription in unterschiedlichen Kulturgefäßen zurückzuführen (Kap. 3.3.3.3). So ergab eine nachträgliche qualitative Bestimmung der 2,3-DCDD-Konzentration in den 50 ml Kulturen auch am Ende des Versuches noch die Anwesenheit des zugegebenen Substrates (Daten nicht gezeigt). Die Dechlorierungsaktivität gegenüber PCE war zu Beginn des Versuches sehr gering und nahm erst gegen Ende des Versuches zu (Junick, 2007). Entsprechend nahm das Transkriptionsniveau der untersuchten *rdhA* Gene (außer *cbrA*) über den gesamten Versuchsverlauf zu und erreichte die Plateauphase bis zum Ende des Versuches nicht (Abb. 26). Eine vom Dechlorierungsverlauf abhängige Entwicklung des Transkriptionsniveaus von *rdhA* Genen und ihr Verlauf in drei Phasen (anfänglicher Anstieg, Plateau, langsamer Abfall nach beendeter Dechlorierung) wurde auch von Lee *et al.* (2006) und Rahm *et al.* (2006 b) für TCE- bzw. PCE-dechlorierende Kulturen beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass das anfängliche Transkriptionsniveau auch in den Kontrollen ohne halogeniertes Substrat über einen Zeitraum von bis zu 240 h weitgehend konstant blieb (Abb. 20, 25), was mit Beobachtungen von Lee *et al.* (2006) an Kontrollen von ANAS-Mischkulturen übereinstimmt. Um herauszufinden, ob es eventuell zur konstitutiven Expression der *rdhA* Gene in Abwesenheit eines chlorierten Elektronenakzeptors kommt, haben Lee *et al.* (2006) die Kulturen nach einer Hungerphase von bis zu 42 Tagen mit TCE versetzt und dann in Gegenwart von Chloramphenicol, das die *de novo* Proteinbiosynthese unterbindet, die Dechlorierung gemessen. Es zeigte sich, dass TCE selbst nach 42 Tagen ohne *lag* Phase dechloriert wurde. Das deutet entweder darauf hin, dass es tatsächlich zu einer konstitutiven Expression des entsprechenden *rdhA* Gens kommt oder dass die reduktiven Dehalogenasen sehr stabil sind. Eine Hemmung der bakteriellen Transkription durch Rifampicin (Mongkolsuk *et al.*, 2002) könnte Aufschluss darüber geben, inwieweit eine konstitutive Expression des *tceA* Gens am Erhalt der Dechlorierungsaktivität beteiligt war.

Wenn eine Induktion der Transkription von *rdhA* Genen durch chlorierte Verbindungen in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, kam es immer zu einem Anstieg des Transkriptionsniveaus um eine bis drei Größenordnungen (Abb. 20, 25, 26). In vorangegangenen Studien korrelierte das Transkriptionsniveau in der Regel mit der Dechlorierungsaktivität. Beispielsweise wurde das Gen der putativen TCE-Reduktase, *tceA*, durch ihr Substrat TCE stark induziert (drei bis vier Größenordnungen), während VC, welches durch

TceA nicht metabolisch umgesetzt wird (Magnuson *et al.*, 2000), nur zu einer 3,5 fachen-Transkriptionsinduktion von *tceA* führte (Lee *et al.*, 2006). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in der vorliegenden Arbeit für den Umsatz von 1,3-DCDD durch Stamm CBDB1 gemacht. Eine Dechlorierung von 1,3-DCDD war nur möglich, wenn entweder in der Vorkultur geeignete Dehalogenasen induziert wurden (Abb. 21) oder wenn 1,3-DCDD als Intermediat bei der Dechlorierung von 1,2,4-TrCDD auftrat (Bunge *et al.*, 2003), da es selbst nicht zur Induktion befähigt war. So scheint ein Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge und dem spezifischen Umsatz eines Substrates zu bestehen.

4.8 Korrelation zwischen dem Nachweis bestimmter *rdhA* Gene und Transkripte in verschiedenen *Dehalococcoides* Stämmen und dem Dechlorierungspotential

Ein Vergleich des Dechlorierungspotentials der *Dehalococcoides* Stämme CBDB1 und 195 zeigte, dass Stamm CBDB1 ein breiteres Spektrum an chlorierten Aromaten dechlorieren kann als Stamm 195 (Adrian *et al.*, 2007 a). Im Gegensatz dazu ist Stamm 195 besser an das Wachstum mit chlorierten Ethenen angepasst. Es wird vermutet, dass Gruppen orthologer Gene jeweils eine spezifische Dechlorierungsaktivität kodieren (Hölscher *et al.*, 2004; Kube *et al.*, 2005). So zeigte es sich, dass die mit *Dehalococcoides* Stämmen beobachtete TCE-Dechlorierung mit der Anwesenheit des *tceA* Gens korrelierte. Die Fähigkeit, TCE zu dechlorieren, wurde in den Stämmen FL2 und 195 beobachtet, in deren Genomen das *tceA* Gen nachgewiesen wurde (Magnuson *et al.*, 2000; He *et al.*, 2005). Die Stämme CBDB1 und BAV1 hingegen besitzen das *tceA* Gen nicht und sind auch nicht in der Lage, TCE metabolisch zu dechlorieren (He *et al.*, 2003 b; Junick, 2007). Die Isolierung des Stammes GT machte allerdings auch deutlich, dass TceA nicht die einzige Trichlorethen-dechlorierende RdhA von *Dehalococcoides* Stämmen sein kann (Sung *et al.*, 2006). So ist Stamm GT in der Lage, TCE, verschiedene DCE-Isomere und VC metabolisch zu dechlorieren, das *tceA* Gen war hingegen nicht nachweisbar. Das Auftreten von RdhAs gleicher Funktion bei nur geringer Sequenzidentität wurde bereits für VcrA und BvcA gezeigt. Obwohl beide Proteine nur eine Ähnlichkeit von 36 % auf Aminosäureebene aufwiesen, katalysierten sie die Dechlorierung von VC zu Ethen (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2004). Eine ähnliche Entdeckung machten Tsukagoshi *et al.* (2006). Sie identifizierten in dem *Desulfitobacterium* sp. Stamm KBC1 eine Tetrachlorethen-RdhA, die nur eine 40 % Sequenzähnlichkeit zu bekannten PCE-reduktiven Dehalogenasen anderer *Desulfitobacterium* Stämme besaß.

Die Dechlorierung von PCE durch *Dehalococcoides* korrelierte mit der Anwesenheit eines *pceA* orthologen Gens. Während Stamm 195 PCE dechloriert und das Gen *pceA* besitzt, wurde weder eine PCE-Dechlorierung noch die Existenz des entsprechenden Gens in der ANAS-Mischkultur (West *et al.*, 2008) sowie den Stämmen FL2 (Hölscher *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005) bzw. BAV1 (He *et al.*, 2003 b; Hölscher *et al.*, 2004) beobachtet. Stamm CBDB1 hingegen, für den eine Dechlorierungsaktivität von PCE zu TCE gezeigt wurde, besitzt das *pceA* orthologe Gen *cbdbA1588* (Kube *et al.*, 2005; Junick, 2007). In dieser Arbeit durchgeführte Transkriptionsanalysen bestätigten, dass das *pceA*-orthologe Gen *cbdbA1588* des Stammes CBDB1 in Gegenwart von PCE im Vergleich zu drei anderen untersuchten *rdhA* Genen am stärksten induziert wurde (Abb. 26). Untersuchungen zur Transkription von *rdhA* Genen des Stammes 195 ergaben, dass *pceA* in Gegenwart von PCE das höchste Transkriptionsniveau besaß (Fung *et al.*, 2007). Auch in Proteinanalysen wurde PceA in Zellextrakten nach Wachstum mit PCE als Elektronenakzeptor identifiziert (Fung *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2007). Ein ähnlicher quantitativer Zusammenhang zwischen Transkript- und Proteinmenge wurde für *pceA* in Stamm 195 nach Wachstum auf 2,3-Dichlorphenol beobachtet. Auch hier hatte *pceA* das höchste Transkriptionsniveau, und das entsprechende Genprodukt war das einzige in Proteinanalysen identifizierte (Fung *et al.*, 2007). Aus diesen Beobachtungen wurde gefolgert, dass PceA eine duale Funktion als PCE- und 2,3-DCP reduktive Dehalogenase besitzt.

Kürzlich wurde CbrA in Proteinstudien als Trichlorbenzoldehalogenase des Stammes CBDB1 identifiziert (Adrian *et al.*, 2007 b). Interessant ist, dass ein *cbrA* orthologes Gen bislang nur in den Stämmen CBDB1 und DCMB5 nachgewiesen wurde. Stamm CBDB1 ist in der Lage 1,2,3-TrCB und 1,2,4-TrCB metabolisch zu dechlorieren, während Stamm DCMB5 nur 1,2,3-TrCB als Elektronenakzeptor nutzen kann (Adrian *et al.*, 2000 b; Bunge *et al.*, 2008). Stamm 195, der das *cbrA* Gen nicht besitzt, kann 1,2,3- und 1,2,4-TrCB nur kometabolisch in Gegenwart von PCE dechlorieren (Fennell *et al.*, 2004). In der vorliegenden Studie besaß *cbrA* nach Wachstum mit 1,2,3- oder 1,2,4-TrCB das höchste Transkriptionsniveau der untersuchten *rdhA* Gene (maximal 10 bis 22 Transkripte pro Zelle; Abb. 20, Anhang 9, 12). Gereinigtes CbrA dechlorierte 1,2,3-TrCB zu 1,3-DCB, aber nicht 1,2,4-TrCB (Adrian *et al.*, 2007 b). Eine Beteiligung von CbrA an der 1,2,4-TrCB-Dechlorierung ist deshalb unklar. Eine Induktion von *cbrA* um den Faktor 10 in Gegenwart von 1,2,3- und 1,2,4-TrCB legt jedoch die Vermutung nahe, dass auch 1,2,4-TrCB ein Substrat von CbrA ist. Fraglich wäre folglich nur, warum Stamm DCMB5 1,2,4-TrCB nicht dechlorieren kann, obwohl es ein *cbrA* orthologes Gen besitzt. Als Grund kommt die nur 94%ige Sequenzidentität zwischen CbrA

und DCMB RdhA7 auf Proteinebene in Frage, die Ausdruck unterschiedlicher Funktionen sein könnte.

Interessant ist, dass in Versuchen mit 1,2,3- und 1,2,4-TrCB zwei weitere *rdhA* Gene (*cbdbA1453* und *cbdbA1624*) identifiziert wurden, die ähnliche maximale Transkriptionsniveaus besaßen wie *cbrA* (Abb. 20, Anhang 9). Beide Gene zeigten eine Substrat-abhängige Transkriptionsantwort. Während das Transkriptionsniveau von *cbdbA1453* in Gegenwart von 1,2,4-TrCB niedriger war als das von *cbdbA1624*, ergab sich nach Zugabe von 1,2,3-TrCB genau das entgegengesetzte Bild. In Stamm DCMB5, der 1,2,3-TrCB dechlorieren kann, aber nicht 1,2,4-TrCB (Bunge *et al.*, 2008), wurde ein *cbdbA1453* orthologes Gene identifiziert, wohingegen ein *cbdbA1624* orthologes Gen fehlte. Das könnte darauf hindeuten, dass CbrA zwar 1,2,3-TrCB dechloriert, CbdbA1624 aber möglicherweise für die Dechlorierung von 1,2,4-TrCB verantwortlich ist.

Auch in Gegenwart von 2,3-DCDD besaß *cbrA* das höchste Transkriptionsniveau der analysierten *rdhA* Gene, was darauf hindeutet, dass CbrA auch an der Dechlorierung von halogenierten Dioxinen beteiligt ist. Allerdings war auch das Transkriptionsniveau von *cbdbA1588* nur um den Faktor drei niedriger als das von *cbrA* (Abb. 25 A) und damit wesentlich höher als in den Versuchen mit den Trichlorbenzolen (Abb. 20). Basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten von 2,3-DCDD und 2,3-DCP (zwei benachbarte Chlor-substituenten) ist nicht auszuschließen, dass CbdbA1588 auch bei der Dechlorierung von 2,3-DCDD eine wichtige Rolle spielt.

Ist die Funktion einer bestimmten reduktiven Dehalogenase bekannt, kann das entsprechende Gen oder Transkript als Biomarker für das *in situ* Dechlorierungspotential eines kontaminierten Standorts genutzt werden. Transkripte und Genprodukte von *rdhA* Genen verschiedener *Dehalococcoides* Stämme, die in Transkriptions- und Proteomanalysen nachgewiesen wurden und möglicherweise als Markergene genutzt werden könnten, sind in Tab. 22 zusammengefasst. Lee *et al.* (2008) zeigten eine Korrelation zwischen *vcrA* und *bvcA* Expression und einer aktiven Dechlorierung von cDCE zu Ethen in mit TCE verunreinigtem Grundwasser. Auch Müller *et al.* (2004) sahen einen Zusammenhang zwischen einer aktiven Dechlorierung von VC zu Ethen in kontaminiertem Grundwasser und dem Nachweis von *vcrA*. Allerdings reichen die bisher identifizierten putativen Markergene nicht aus, um das Dechlorierungspotential eines jeden Standortes einzuschätzen. Das zeigte sich beispielsweise in *Dehalococcoides*-haltigen Kulturen (Futamta *et al.*, 2007), die in der Lage waren, PCE zu TCE oder *cis* DCE zu dechlorieren, obwohl *pceA* oder *tceA* nicht nachgewiesen werden konnten. Zudem sind speziell Markergene für die Dechlorierung von Chloraromaten kaum

Tab. 22. In Transkriptions- bzw. Proteomstudien identifizierte *rdhA* Transkripte oder Genprodukte von *Dehalococcoides* ssp. nach Induktion mit verschiedenen chlorierten Aromaten oder Aliphaten.

Identifiziertes Transkript/Protein	Kultur/Stamm	Substrat	Referenz
<i>cbdbA1453</i>	CBDB1	1,2,3-TrCB, 1,2,4-TrCB, 2,3-DCDD, PCE	diese Arbeit
<i>cbdbA1624</i>	CBDB1	1,2,4-TrCB, 1,2,3-TrCB, 2,3-DCDD, PCE	diese Arbeit
<i>cbrA</i>	CBDB1	1,2,3-TrCB, 1,2,4-TrCB, 2,3-DCDD, PCE	diese Arbeit
CbrA	CBDB1	1,2,3-TrCB	Adrian <i>et al.</i> , 2007 b
CbdbA80	CBDB1	1,2,3-TrCB	Adrian <i>et al.</i> , 2007 b
<i>cbdbA1588</i>	CBDB1	PCE, 2,3-DCDD, 1,2,3-TrCB, 1,2,4-TrCB	diese Arbeit
CbdbA1588	CBDB1	2,3-DCP	Morris <i>et al.</i> , 2007
<i>pceA</i>	195	PCE, TCE, 2,3-DCP	Fung <i>et al.</i> , 2007
PceA	195	PCE, 2,3-DCP	Fung <i>et al.</i> , 2007, Morris <i>et al.</i> , 2007
<i>tceA</i>	195	PCE, TCE	Rahm <i>et al.</i> , 2006 b, Fung <i>et al.</i> , 2007
	ANAS	TCE, <i>cis</i> DCE, <i>trans</i> DCE, 1,1-DCE	Johnson <i>et al.</i> , 2005 b
TceA	195	PCE	Morris <i>et al.</i> , 2006, 2007; Fung <i>et al.</i> , 2007
<i>vcrA</i>	VS	VC	Müller <i>et al.</i> , 2004
	KB-1	TCE, VC	Waller <i>et al.</i> , 2005
VcrA	VS	VC, 1,1-DCE	Müller <i>et al.</i> , 2004
<i>bvcA</i>	BAV1	VC	Krajmalnik-Brown <i>et al.</i> , 2004
	KB-1	TCE, <i>cis</i> DCE, VC, 1,2-DCA	Waller <i>et al.</i> , 2005
<i>DET1545</i>	195	PCE	Rahm <i>et al.</i> , 2006 b, Rahm und Richardson, 2008
DET1545		PCE	Morris <i>et al.</i> , 2007
<i>DET1559</i>	195	PCE	Rahm <i>et al.</i> , 2006 b, Rahm und Richardson, 2008
DET1559		PCE	Morris <i>et al.</i> , 2007

TrCB-Trichlorbenzol, DCDD-Dichlordibenzo-*p*-dioxin, PCE-Tetrachlorethen, TCE-Trichlorethen, DCE-Dichlorethen, VC-Vinylchlorid, DCE-Dichlorethan, DCP-Dichlorphenol

vorhanden. So sind CbrA und PceA (Tab. 22) die bislang einzigen identifizierten reduktiven Dehalogenasen, deren Substrate chlorierte Aromaten sind.

4.9 Regulation der Transkription von *rdhA* Genen in *Dehalococcoides* sp.

Trotz der Vielzahl bislang durchgeführter Transkriptionsstudien (Johnson *et al.*, 2005 b; Lee *et al.*, 2006; Rahm *et al.*, 2006 b; Fung *et al.*, 2007) ist bis zum heutigen Tag wenig über die Mechanismen der Regulation der Expression von *rdhA* Genen in *Dehalococcoides* bekannt. Die Analyse der Genomsequenzen der Stämme 195 und CBDB1 zeigte die Anwesenheit regulatorischer Gene in enger Nachbarschaft der meisten *rdhA* Gene (Kube *et al.*, 2005;

Seshadri *et al.*, 2005). Dabei handelte es sich überwiegend um Gene, die für MarR-Typ oder Zweikomponentensystem Regulatoren kodieren. Vor einzelnen *rdhA* Genen der Stämme 195 und VS wurden putative -10 und -35 σ^{70} Promotorsequenzen beschrieben (Magnuson *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2004; Fung *et al.*, 2007). Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu σ^{70} Promotoren wurden außerdem im Rahmen dieser Arbeit vor den Genen *cbdbA1624*, *1453* und *cbrA* des Stammes CBDB1 identifiziert (Abb. 29). Im Genom der *Dehalococcoides* Stämme 195 und CBDB1 sind zudem σ^{70} -Homologe kodiert (Kube *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005). Obwohl dies auf eine stringente Regulation der *rdhA* Genexpression hindeutet, wurde in verschiedenen Studien und der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Zugabe eines Substrates zur Transkription multipler *rdhA* Gene führte (Waller *et al.*, 2005; Rahm *et al.*, 2006 b; Fung *et al.*, 2007; Abb. 17, 22). Diese komplexe transkriptionelle Antwort weist entweder auf eine substratunabhängige Transkriptionsregulation der *rdhA* Gene oder auf überlappende Substratspektren der entsprechenden Genprodukte hin. Gegen eine grundsätzlich Substratunabhängige Regulation spricht, dass in der vorliegenden Arbeit für die Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1453* substratabhängige Expressionsmuster beobachtet wurden (Abb. 15, 18, 20, Anhang 7). Das lässt vermuten, dass es sowohl eine globale, möglicherweise wachstumsabhängige Regulationskontrolle, als auch eine substratabhängige Feinregulation gibt.

In unmittelbarer Nähe der Gene *cbdbA1624* und *cbdbA1453* wurden im Genom des Stammes CBDB1 Gene identifiziert, die für MarR-Typ Regulatoren kodieren (Kube *et al.*, 2005; Abb. 3). MarR-Typ Regulatoren sind unter anderem an der Regulation des Chloraromatenabbaus beteiligt (Providenti und Wyndham, 2001; Galán *et al.*, 2003; Hiromoto *et al.*, 2006). Wie auch für CbdbA1625-Strep nachgewiesen, agieren MarR-Typ Regulatoren überwiegend als Repressoren (Wilkinson und Grove, 2006). Sie besitzen die Fähigkeit, Antibiotika oder anionische (in der Regel phenolische) Substanzen zu binden (Wilkinson und Grove, 2006).

Das DNA-Bindemotiv von MarR-Typ Regulatoren wird von einer konservierten *winged* Helix gebildet (Wilkinson und Grove, 2006). Topologisch besteht sie aus den Strukturelementen H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 (H: α -Helix; S: β -Faltblatt, W: Schleife, Abb. 35). Dabei wird die Flügelstruktur durch zwei β -Faltblätter und die entsprechenden Schleifen gebildet. Die drei β -Faltblätter bilden eine antiparallele β -Faltblattstruktur, wobei es vorkommen kann, dass das 1. β -Faltblatt (S1) durch nur einen hydrophoben Rest gebildet wird (Wilson *et al.*, 1992). Während Schleife 1 in allen MarR-Typ Regulatoren vorkommt, besitzen einige Mitglieder dieser Familie keine zweite Schleifenstruktur (Brennan *et al.*, 1993). Helix 3 ist die Dömane mit den meisten DNA-Kontakten. Konservierte Reste von

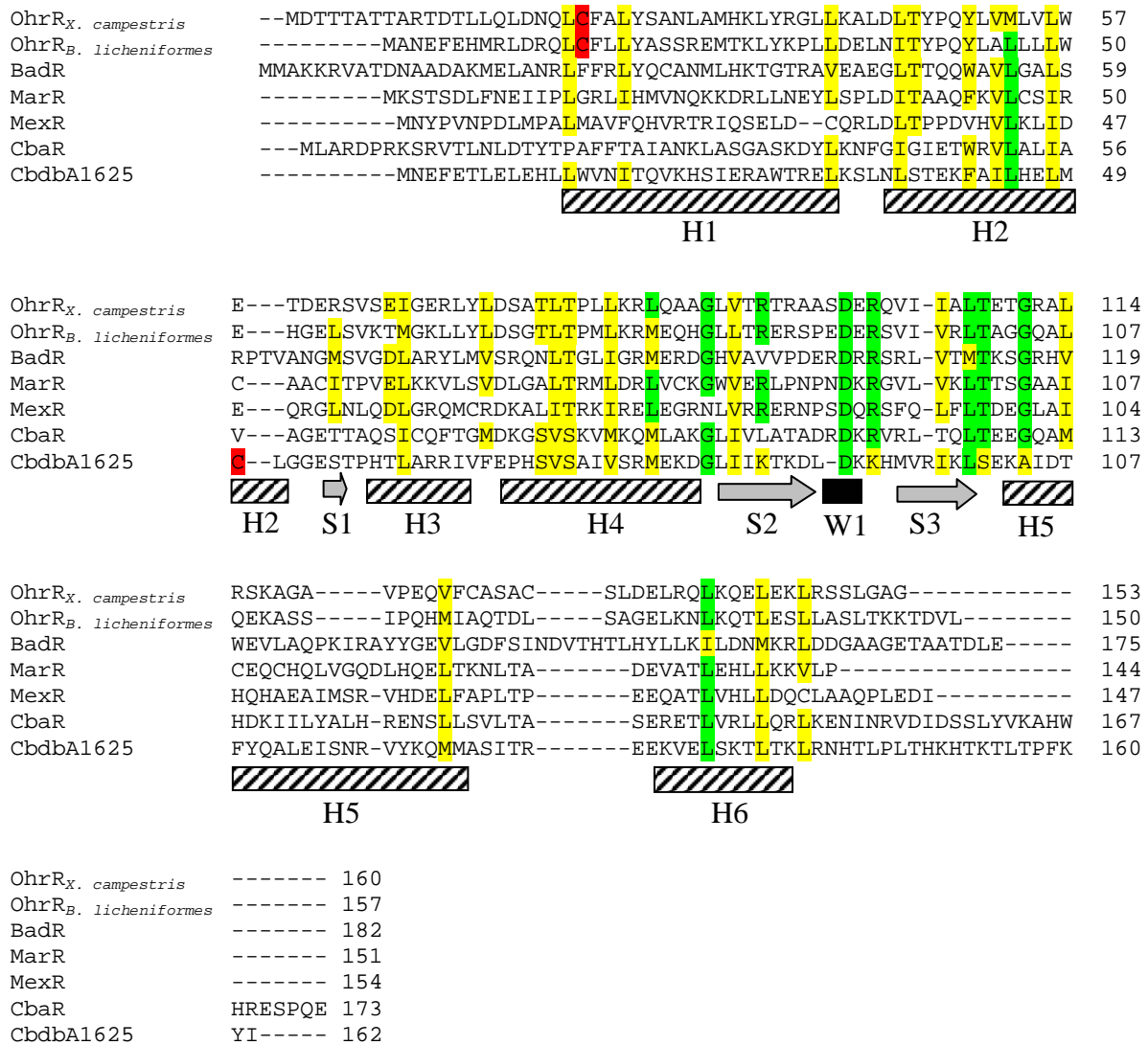


Abb. 35. Vergleich der Aminosäuresequenz von CbdbA1625 des Stammes CBDB1 mit Sequenzen ausgewählter Vertreter an MarR-Typ Regulatoren. Das Alignment wurde mittels ClustalW erzeugt. Grün markiert sind identische Aminosäurereste. Gelb unterlegt sind Reste mit einer Sequenzähnlichkeit gleich oder größer 70 %. Sekundärstrukturelemente, die unter den Sequenzen dargestellt sind, zeigen das konservierte *winged* Helix-Motiv. H: α -Helix; S: β -Faltblatt, W: Schleife; rot: redoxaktive Cysteinreste, OhrR_{X. campestris}: AAK62673^a; OhrR_{B. licheniformes}: YP_078604^a; BadR: *Rhodopseudomonas palustris*, CAE26099^a; MarR: *E. coli*: AAK21292^a; MexR: *Pseudomonas aeruginosa*, ABJ15391^a; CbaR: *Conidiobolus coronatus*, AAG00065^a; CbdbA1625: CAI83645^a. a- accession number

MarR-Typ Regulatoren waren, wie in Abb. 35 verdeutlicht, auch in der Aminosäuresequenz von CbdbA1625 zu finden. Dies weist darauf hin, dass CbdbA1625 alle MarR-typischen Strukturmerkmale besitzt.

Obwohl es in der vorliegenden Studie gelang, eine Bindung von CbdbA1625-Strep an den Promotorbereich von *cbdbA1624* zu zeigen, war es weder mittels Gelretardations-experimenten noch mit Hilfe von ITC-Messungen möglich, eine Interaktion von CbdbA1625-Strep mit verschiedenen Chlorbenzolen eindeutig nachzuweisen. Ein möglicher Grund hierfür könnte der zur Reinigung verwendete Strep-tag sein. So wurde beispielsweise von Pop *et al.*

(2004) für CprK, einen Regulator der Dehalorespiration in *Desulfotobacterium* sp., gezeigt, dass CprK mit N-terminaler His-tag-Fusion weder *in vivo* noch *in vitro* aktiv war. Galán *et al.* (2003) beobachteten für HpaR, welches ohne tag gereinigt wurde, nach Zugabe des Effektors nur eine leichte Schwächung des HpaR-DNA-Komplexes. Begründet wurde der Effekt damit, dass für die Trennung des DNA-Protein-Komplexes zusätzlich die Anwesenheit der RNA-Polymerase notwendig sein könnte oder dass eine *supercoiled* Struktur der DNA vorliegen muss. Gegen einen Einfluss des tag auf die Ligandenbindung spricht auch, dass Liganden- und DNA-Bindestelle überlappen (Wilkinson und Grove, 2006) und die DNA-Bindesteuerungsfähigkeit von CbdbA1625-Strep durch den tag unbeeinflusst blieb.

Die überwiegende Zahl der MarR-Typ Regulatoren besitzt einen spezifischen Liganden oder mehrere Liganden ähnlicher Struktur (Wilkinson und Grove, 2006). Die Transkription von *cbdbA1624* wurde dagegen in der vorliegenden Arbeit nach Zugabe dreier verschiedener Substanzklassen induziert (Chlorbenzole (Abb. 20), chlorierte Dioxine (Abb. 25), Chlorethene (Abb. 26)). Eine direkte Interaktion der verwendeten chlorierten Elektronenakzeptoren mit dem Regulator scheint deshalb unwahrscheinlich. Die Bindung eines Liganden ist allerdings nicht der einzige für MarR-Typ Regulatoren bekannte Mechanismus, um die Transkription der nachgeschalteten Gene zu beeinflussen. So wird beispielsweise über den Redoxstatus eines einzelnen Cysteins im N-Terminus in OhrR von *Bacillus subtilis* oder *Xanthomonas campestris* die Bindung an die entsprechende Operatorregion reguliert (Panmanee *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2005). OhrR reprimiert dabei die Expression des induzierbaren Peroxiredoxins OhrA (Lee *et al.*, 2007). Die reaktiven Cysteinreste in zwei OhrR Regulatoren sind in Abb. 35 rot unterlegt. Neben den Cysteinresten sind auch Tyrosinreste an der Perzeption der organischen Peroxide beteiligt (Soonsanga *et al.*, 2007; Newberry *et al.*, 2007). Intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen dem Cysteinrest und den N-terminalen Tyrosinresten der anderen Untereinheit sind essentiell für die Stabilisierung der DNA-Regulator-Bindung. Durch Oxidation des reaktiven Cysteins kommt es zur Aufhebung der Wasserstoffbrückenbindungen, zur Konformationsänderung, zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den beiden Untereinheiten und in der Folge zur Transkription von OhrA. Bei der Analyse der Aminosäuresequenz von CbdbA1625 zeigte sich, dass sich in Helix 2 ebenfalls ein einzelner Cysteinrest befindet, der als Redoxsensor fungieren könnte (Abb. 35). Weitere Analysen müssen zeigen, ob der Redoxstatus dieses Cysteins für die Interaktion des Regulators mit der DNA bzw. potentiellen Liganden von Bedeutung ist.

In der Nähe der *rdhA* Gene von *Dehalococcoides* sp. finden sich neben den MarR-Typ Regulatorgenen auch Gene, die für Zweikomponentensystem Regulatoren und einen CprC-

oder CprK-Typ Regulator kodieren (Kube *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005, Abb. 3). Eine Analyse der Gensequenzen der Zweikomponentensystem Regulatoren, die in der Nachbarschaft von *rdhA* Genen zu finden waren, ergab, dass die entsprechenden Proteine PAS-Domänen besitzen. PAS-Domänen sind wichtige Module, die beispielsweise Änderungen im Redoxpotential oder kleine Liganden detektieren können und damit eine Signalkaskade auslösen (Taylor und Zhulin, 1999). Im Fall von ArcB, der Sensor kinase im Arc-System, erfolgt die Regulation über oxidiertes Chinon (Malpica *et al.*, 2004). Unter aeroben Bedingungen wird ArcB durch Oxidation zweier cytosolischer, redoxaktiver Cysteinreste unter Bildung einer Disulfidbrücke inhibiert. Allerdings ist auch eine Bindung von chlorierten Aromaten über die PAS-Domäne möglich, wie beispielsweise für den Arylhydrocarbon-Rezeptor gezeigt wurde (Taylor und Zhulin, 1999). Es ist also sowohl für MarR-Typ Regulatoren als auch für Zweikomponentensystem-Regulatoren in *Dehalococcoides* nicht auszuschließen, dass sie auf Redoxpotentialänderungen in der Elektronentransportkette während der reduktiven Dechlorierung reagieren. Dafür könnte sprechen, dass eine Transkription der *rdhA* Gene von *Dehalococcoides* sp. nur beobachtet wurde, wenn die Respirationsrate einen gewissen Schwellenwert überschritten hatte (Rahm und Richardson, 2008).

Allerdings wäre es auch möglich, dass die Regulation der *rdhA* Gene von *Dehalococcoides* sp. durch MarR-Typ Regulatoren völlig neuen Mechanismen folgt. So zeigte eine Analyse von Proteinsequenzen, dass die überwiegende Zahl der MarR-ähnlichen Regulatoren der Stämme CBDB1, 195, VS und BAV1, deren Gene *upstream* von *rdhA* Genen liegen, ein eigenes Cluster bilden (Abb. 36). Auch eine Beteiligung übergeordneter Regulatoren (Providenti und Wyndham, 2001; Heroven und Dersch, 2006) oder ein Wachstumsphasen-abhängiges Regulationsmuster (Sánchez *et al.*, 2002; Heroven und Dersch, 2006) lassen sich nicht ausschließen.

Betrachtet man die Struktur der Bindestellen MarR-typischer Regulatoren kann man erkennen, dass es keine Konsensussequenzen gibt, wie beispielsweise für Regulatoren des CRP/FNR-Typs. Zu letzterer Regulatorfamilie gehört unter anderem das Regulatorprotein CprK1, welches in *Desulfitobacterium hafniense* die Expression des Gens der 3-Chlor-4-hydroxyphenylacetat-reduktiven Dehalogenase kontrolliert (Gábor *et al.*, 2006). Die DNA-Bindestellen von CprK1 wurden als Dehaloboxen bezeichnet. Sie stellen einen 14-bp langen *inverted repeat* der Sequenz TTAAT...ATTAA dar und sind in der -41 bp Region des regulierten Gens oder Operons zu finden. Trotz fehlender Konsensussequenz für MarR-Typ Regulatoren finden sich einige charakteristische Motive. Dazu zählen in der Regel

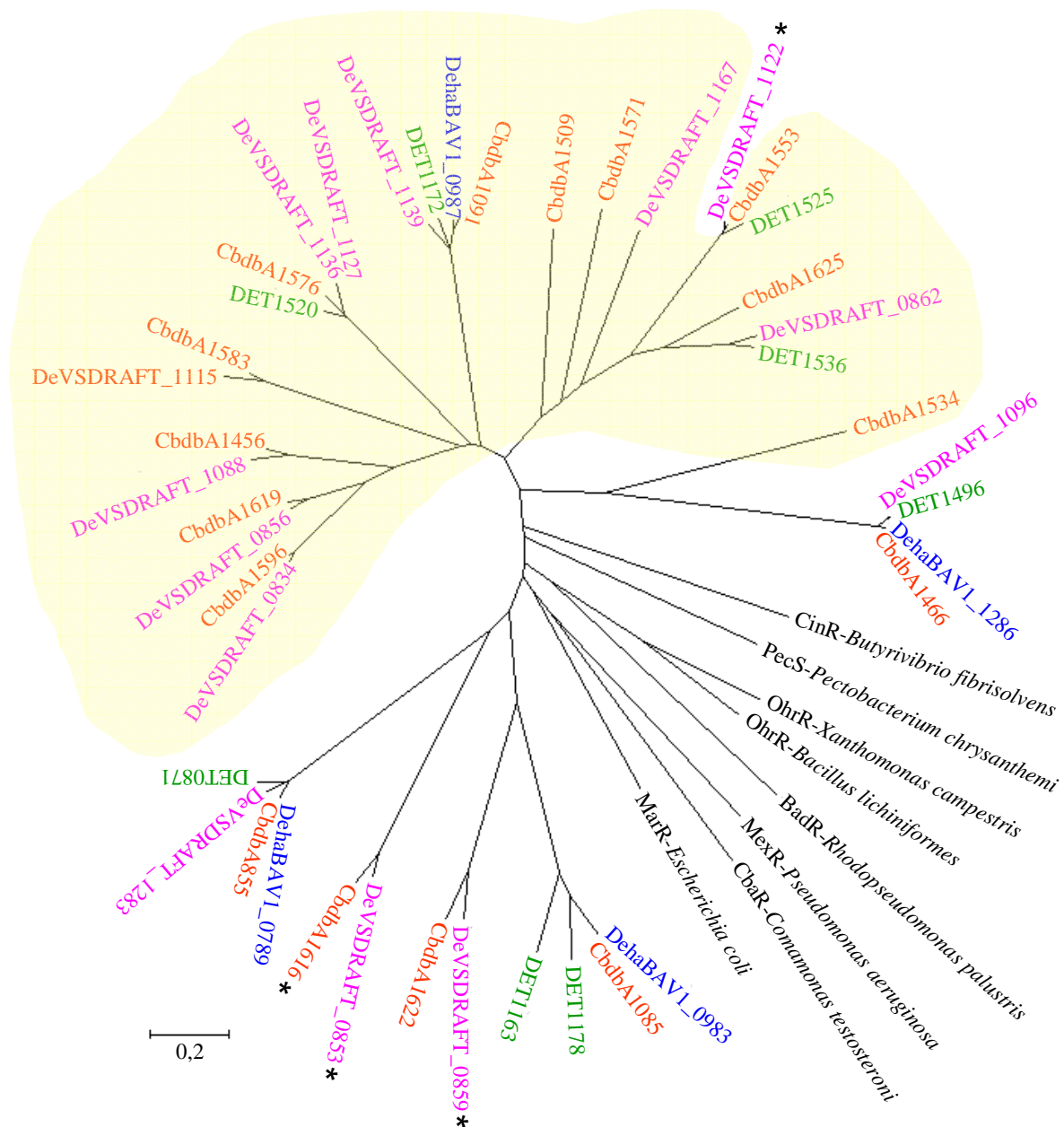


Abb. 36. Radialer phylogenetischer Baum von Proteinsequenzen MarR-typischer Regulatoren der *Dehalococcoides* Stämme CBDB1 (rot), 195 (grün), VS (pink), BAV1 (blau) und anderer ausgewählter Bakterien (schwarz). Die Länge des Balkens stellt einen Sequenzunterschied von 20 % dar. Gelb unterlegt sind die MarR-Typ Regulatoren, deren Gene sich *upstream* von *rdhA* Genen befinden. * MarR-Typ Gen liegt *downstream* des *rdhAB* Operons.

(pseudo)palindromische Sequenzen, die typisch sind für Proteine, welche die DNA als Dimer binden (Wilkinson und Grove, 2006). Für die überwiegende Zahl an MarR-Typ Regulatoren konnte dementsprechend in Gelfiltrationsanalysen oder Kristallisationsstudien die dimere Struktur nachgewiesen werden und dies sowohl in freier als auch DNA-gebundener Form (Brooun *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2005; Hiromoto *et al.*, 2006; Fiorentino *et al.*, 2007). Gelfiltrationsexperimente in dieser Arbeit mit CbdbA1625-Strep zeigten hingegen neben der Monomer- bzw. Dimer-Form auch höhere Multimere (Abb. 28). Höhere Multimere

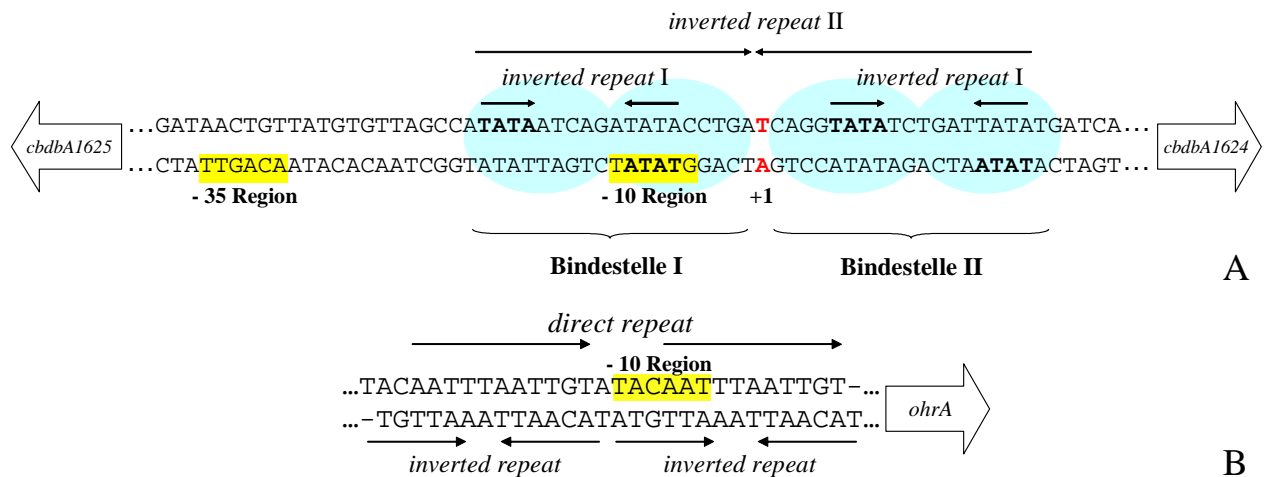


Abb. 37. Putative Bindestellen von MarR-Typ Regulatoren in Promotorbereichen von *cdbA1624* (A, blaue Ovale) aus Stamm CBDB1 und *ohrA* (B) aus *X. campestris*. Die putativen Bindestellen wurden mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten (A) und Kristallisationsstudien (B; Hong *et al.*, 2005) bestimmt. gelb-putative -10 und -35 Regionen, rot-Transkriptionsstart, blaue Ovale-CbdbA1625-Monomere

wurden auch in Studien zu anderen MarR-Typ Regulatoren beobachtet (Martin und Rosner, 1995). Lim *et al.* (2002) beschrieben für MexR die Möglichkeit zur Filamentbildung aufgrund der Struktur des C-Terminus. Eine Erklärung für den relativ hohen Monomeranteil in der CbdbA1625-Strep Präparation könnte der *tag* sein. Für die Dimerisierung der MarR-Typ Regulatoren sind hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen N- und C-Terminus beider Untereinheiten essentiell (Lim *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2005; Wilkinson und Grove, 2006), die eventuell durch die zusätzlichen Aminosäuren des Strep-*tag* beeinträchtigt werden können.

Die Bindestellen von MarR-Typ Dimeren an die DNA sind hinsichtlich der Länge der *inverted* oder *direct repeats* variabel, genau wie der Raum zwischen den beiden Teilen der *repeats* (Wilkinson und Grove, 2006). Es zeigte sich in DNaseI Footprintingassays, dass MarR-Typ Regulatoren in der Regel einen „Fußabdruck“ von 21 bis 28 bp hinterlassen (Wilkinson und Grove, 2006) und sich im Promotorbereich eines Gens mehr als eine Bindestelle für den MarR-Typ Regulator befinden kann (Martin und Rosner, 1995; Evans *et al.*, 2001; Providenti und Wyndham, 2001; Galán *et al.*, 2003; Tropel und van der Meer, 2004). Nach Gelshiftexperimenten und einer Analyse der Promotorsequenzen von *cdbA1624* im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Bindestellen von CbdbA1625-Dimeren postuliert (Abb. 37). In den putativen Bindebereichen beider Dimere wurde jeweils ein *inverted repeat* der Sequenz TATA...TATA identifiziert. Die beiden postulierten Dimer-Bindestellen bilden zudem ein perfektes *inverted repeat* zueinander aus. Die putativen DNA-Bindesequenzen von CbdbA1625 wurden mit Bindestellen anderer MarR-Typ Regulatoren verglichen. Dabei

zeigte sich eine große Ähnlichkeit zwischen den Bindestellen von CbdbA1625 und OhrR aus *X. campestris* (Abb. 37). Für OhrR_{*X. campestris*} wurden genau wie für CbdbA1625 zwei *inverted repeats* identifiziert, die hier allerdings einen *direct repeat* zueinander ausbilden (Hong *et al.*, 2005; Abb. 37 B).

Studien zur Regulation der Expression von *rdhA* Genen in *Dehalococcoides* haben eine unerwartete Komplexität zu Tage gefördert. Alle bisherigen Erkenntnisse sprechen dabei für eine Kombination aus globaler (z.B. abhängig vom Redoxpotential) bzw. spezifischer (z.B. abhängig vom verwendeten halogenierten Substrat) Kontrolle der Expression. Hinzu kommt, dass vier Typen von Regulatoren im Genom von *Dehalococcoides* kodiert werden, deren Gene sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu *rdhA* Genen befinden (CprC-Typ, CprK-Typ, MarR-Typ, Zweikomponentensystem Regulatoren). Auch eine posttranskriptionelle Regulation, wie sie für ein am *para*-Cresolabbau beteiligtes Gencluster aus *Geobacter metallireducens* beobachtet wurde (Peters *et al.*, 2007), lässt sich nach heutigem Kenntnisstand nicht ausschließen. Zukünftig werden genauere Studien zur Funktionsweise der verschiedenen Regulatoren nötig sein, um eine möglicherweise vorhandene Regulationskaskade zu verstehen bzw. um die direkten Effektoren des Regulationsprozesses zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

1. Im Zusammenhang mit der Anreicherung des Dioxine und Chlorbenzole dechlorierenden Bakteriums DCMB5 wurde die Populationsstruktur der Mischkulturen durch RFLP-Analysen der 16S rRNA-Gene untersucht. Zusätzlich zu den bereits aus früheren Arbeiten vorhandenen wurden weitere Klonbibliotheken von 16S rRNA Genen angelegt, die zur Identifikation sieben neuer 16S rRNA Gensequenzen führten.

2. Auf der Grundlage der bekannten 16S rRNA Gensequenzen wurden terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (t-RFLP) Analysen zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Elektronendonatoren und Inhibitoren auf die Anreicherung des *Dehalococcoides* sp. Stammes DCMB5 durchgeführt, die zeigten, dass die Verwendung von Acetat und Wasserstoff eine starke Koanreicherung von Acetogenen nach sich zieht.

Wurden neben Wasserstoff organische Säuren als Elektronendonatoren und Penicillin als Inhibitor verwendet, wurde eine Anreicherung von *Dehalococcoides* sp. Stamm DCMB5 bis zu 47 % beobachtet. Dominante Vertreter der Mischkulturen neben Stamm DCMB5 waren Bakterium DCE29, *Desulfomicrobium* sp. und einige grampositive Bakterien.

Eine Verringerung der Zahl der verwendeten organischen Säuren führte nicht zu einem weiteren Anreicherungs-erfolg.

Mit der erzielten Anreicherung wurde die Grundlage für die Isolierung des Dioxin-dechlorierenden *Dehalococcoides* sp. Stammes DCMB5 geschaffen.

3. Einige Eigenschaften des hoch angereicherten Stammes DCMB5 wurden untersucht. Neben einer identischen 16S rRNA Gensequenz der *Dehalococcoides* sp. Stämme DCMB5 und CBDB1 zeigten auch die flankierenden Bereiche des 16S rRNA Gens eine 100%ige Übereinstimmung.

4. Mit Hilfe einer Vielzahl spezifischer und degenerierter Primer wurden reduktive Dehalogenase homologe (*rdh*) Gensequenzen amplifiziert. RFLP, t-RFLP und gegebenenfalls Sequenzanalysen führten zur Identifikation von 22 *rdhA* Genen im Genom des Stammes DCMB5. Neunzehn *rdhA* Gene wiesen höchste Sequenzähnlichkeiten zu Genen des Stammes CBDB1 auf, drei Gene zeigten höhere Ähnlichkeiten zu *rdhA* Genen der *Dehalococcoides* Stämme 195 und BAV1.

5. Die Expression von *rdhA* Genen wurde im Rahmen der Arbeit durch Transkriptionsanalysen des *Dehalococcoides* sp. Stammes CBDB1 untersucht. Dafür wurde ein auf Reverser Transkriptions (RT)-PCR und t-RFLP basierender Ansatz entwickelt, der die Analyse aller 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 ermöglichte.

Zusätzlich wurde das Transkriptionsniveau von zehn ausgewählten *rdhA* Transkripten mittels quantitativer PCR (qPCR) bestimmt. Es wurde als Quotient aus der Kopienzahl des Transkripts und der Kopienzahl des entsprechenden *rdhA* Gens ausgedrückt.

6. Zur Erzielung hoher Zellzahlen für die Transkriptionsanalysen wurden die Vorkulturen im Zweiflüssigphasensystem mit in Hexadekan gelöstem 1,2,3- oder 1,2,4-Trichlorbenzol (TrCB) angezogen. Der Start der Transkriptionsversuche erfolgte bei Chlorbenzolen und Tetrachlorethen nach einer Hungerphase von 72 h durch Zusatz der chlorierten Elektronenakzeptoren. In den Versuchen mit 2,3- und 1,3-Dichlordibenzo-*p*-dioxin (DCDD) wurden die Transkriptionsversuche experimentell bedingt ohne Hungerphase mit dem Inoculieren der Kulturen gestartet.

7. Der Umsatz der chlorierten Elektronenakzeptoren wurde gaschromatographisch gemessen und entsprach den bekannten Dechlorierungsreaktionen des Stammes CBDB1. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Umsetzung von 1,3-DCDD zu 2-Monochlordibenzo-*p*-dioxin nur kometabolisch in Gegenwart von Trichlorbenzolen erfolgte.

8. Der RT-PCR t-RFLP und qPCR basierte Ansatz zeigte die Induktion aller 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 in Gegenwart von 1,2,3- und 1,2,4-TrCB.

Das höchste Transkriptionsniveau aller untersuchten *rdhA* Gene besaß das für eine Chlorbenzol-Dehalogenase kodierende Gen *cbrA* nach Induktion mit beiden Trichlorbenzolen. Während die überwiegende Zahl der *rdhA* Gene in ähnlicher Weise auf die Induktion mit 1,2,3- und 1,2,4-TrCB reagierte, zeigten drei *rdhA* Transkripte differentielle Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Elektronenakzeptor. Die Gene *cbdbA1453* und *cbdbA187* besaßen ein höheres Transkriptionsniveau in Gegenwart von 1,2,3-TrCB, während *cbdbA1624* stärker nach Zugabe von 1,2,4-TrCB transkribiert wurde.

9. Nach Inkubation mit 2,3-DCDD ergaben RT-PCR t-RFLP Analysen eine Induktion von 29 der 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1.

In qPCR Analysen zeigte *cbrA* das höchste Transkriptionsniveau der vier analysierten *rdhA* Gene. Eine verstärkte Transkription gegenüber Kontrollkulturen ohne chloriertes Substrat oder Kulturen mit 1,2,3- bzw. 1,2,4-TrCB war für das Gen *cbdbA1588* zu beobachten.

10. T-RFLP und qPCR Analysen ergaben, dass die Zugabe von 1,3-DCDD zu keiner Induktion der Transkription der 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1 führte.

11. Nach Induktion mit PCE besaß *cbdbA1588* das höchste Transkriptionsniveau unter den untersuchten Genen, während *cbrA* nicht induziert wurde.

12. Nach Identifikation des Transkriptionsstartpunktes der Gene *cbrA* und *cbdbA1624* mittels *primer extension* wurden die Promotorbereiche analysiert, die in jedem Fall σ^{70} ähnliche Promotorstrukturen zeigten.

13. Zur Untersuchung der Interaktion des putativen MarR-Typ Regulators CbdbA1625 mit dem Promotorbereich des differentiell transkribierten Gens *cbdbA1624* wurde CbdbA1625 als *Strep-tag* II-Fusionsprotein in *E. coli* produziert. In Gelshift-Experimenten wurde eine spezifische Bindung an den Promotorbereich des Gens *cbdbA1624* nachgewiesen. Es wurden zwei Bindestellen für den Regulator an die DNA postuliert. Obwohl eine Interaktion zwischen CbdbA1625-Strep und chlorierten Benzolen bisher nicht gezeigt werden konnte, weisen die Ergebnisse erstmals auf eine Funktion von CbdbA1625 als Regulator eines reduktiven Dehalogenasegens hin.

6. Literaturverzeichnis

Adrian, L., and H. Görisch. 2002. Microbial transformation of chlorinated benzenes under anaerobic conditions. *Res. Microbiol.* **153**:131-137.

Adrian, L., S. K. Hansen, J. M. Fung, H. Görisch, and S. H. Zinder. 2007 a. Growth of *Dehalococcoides* strains with chlorophenols as electron acceptors. *Environ. Sci. Technol.* **41**: 2318-2323.

Adrian, L., and U. Lechner. 2004. Reductive dehalogenation of polychlorinated benzenes and dioxins. In: *Strict and Facultative Anaerobes: Medical and Environmental Aspects.* (M.M. Nakano, P. Zuber, Hrsg.) Horizon Bioscience. Kapitel 16:303-316.

Adrian, L., W. Manz, U. Szewzyk, and 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.

Adrian, L., J. Rahnenführer, J. Gobom, and T. Hölscher. 2007 b. Identification of a chlorobenzene reductive dehalogenase in *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7717-7724.

Adrian, L., U. Szewzyk, and H. Görisch. 2000 a. Bacterial growth based on reductive dechlorination of trichlorobenzenes. *Biodegradation* **11**:73-81.

Adrian, L., U. Szewzyk, J. Wecke, and H. Görisch. 2000 b. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* **408**: 580-583.

Ahn, Y.-B., M. M. Häggblom, and D. E. Fennell. 2005. Co-amendment with halogenated compounds enhances anaerobic microbial dechlorination of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 1,2,3,4-tetrachlorodibenzofuran in estuarine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**:2775-2784.

Ahn, Y.-B., M. M. Häggblom, and L. J. Kerkhof. 2007. Comparison of anaerobic communities from estuarine sediments with halogenated compounds to enhance dechlorination of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *FEMS Microbiol. Ecol.* **61**:362-371.

Ahn, Y.-B., S.-K. Rhee, D. E. Fennell, L. E. Kerkhof, U. Hentschel, and M. M. Häggblom. 2003. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4159-4166.

Altschul, S., T. L. Madden, A. A. Scaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.

Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.

Aulenta, F., A. Bianchi, M. Majone, M. Petrangeli Papini, M. Potalivo, and V. Tandoi. 2005. Assessment of natural or enhanced in situ bioremediation at a chlorinated solvent-contaminated aquifer in Italy: a microcosm study. *Environ. Int.* **31**:185-190.

Aulenta, F., M. Potalivo, M. Majone, M. P. Papini, and V. Tandoi. 2006. Anaerobic bioremediation of groundwater containing a mixture of 1,1,2,2-tetrachloroethane and chloroethenes. *Biodegradation.* **17**:193-206.

- Aulenta, F., S. Rossetti, M. Majone, and V. Tandoi.** 2004. Detection and quantitative estimation of *Dehalococcoides* spp. in a dechlorinating bioreactor by a combination of fluorescent in situ hybridisation (FISH) and kinetic analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**:206-212.
- Ballerstedt, H., J. Hantke, M. Bunge, B. Werner, J. Gerritse, J. R. Andreesen, and U. Lechner.** 2004. Properties of a trichlorodibenzo-*p*-dioxin-dechlorinating mixed culture with a *Dehalococcoides* as putative dechlorinating species. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**:223-234.
- Banerjee, R., and S. W. Ragsdale.** 2003. The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**:209-247.
- Bedard, D. L., J. J. Baily, B. L. Reiss, and G. V. Jerzak.** 2006. Development of stable sediment-free anaerobic bacterial enrichment cultures that dechlorinate Aroclor 1260. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2460-2470.
- Bedard, D. L., K. M. Ritalahti, and F. E. Löffler.** 2007. The *Dehalococcoides* population in sediment-free mixed cultures metabolically dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1260. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2513-2521.
- Berks, B. C., F. Sargent, E. de Leeuw, A. P. Hinsley, N. R. Stanley, R. L. Jack, G. Buchanan, and T. Palmer.** 2000. A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**:325-330.
- Bouwer, E. J., and P. L. McCarty.** 1983. Transformations of 1- and 2-carbon halogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1286-1294.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Breitenstein, A., A. Saano, M. Salkinoja-Salonen, J. R. Andreesen, and U. Lechner.** 2001. Analysis of a 2,4,6-trichlorophenol-dehalogenating enrichment culture and isolation of the dehalogenating member *Desulfitobacterium frapperi* strain TCP-A. *Arch. Microbiol.* **175**:133-142.
- Breitenstein, A., J. Wiegel, C. Haertig, N. Weiss, J. R. Andreesen, and U. Lechner.** 2002. Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:801-807.
- Brennan, R. G.** 1993. The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell* **71**:773-776.
- Brooun A., J. J. Tomashek, and K. Lewis.** 1999. Purification and ligand binding of EmrR, a regulator of a multidrug transporter. *J Bacteriol.* **181**:5131-5133.
- Brosius, J., T. J. Dull, D. Sleeter, and H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**:107-127.
- Bruschi, M., and F. Guerlesquin.** 1988. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**:155-174.
- Bunge, M.** 2004. Dioxin-dechlorierende Bakterien in anaeroben Kulturen aus kontaminierten Flusssedimenten. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle.
- Bunge M., L. Adrian, A. Kraus, M. Opel, W. G. Lorenz, J. R. Andreesen, H. Görisch and U. Lechner.** 2003. Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature* **421**: 357-360.

- Bunge, M., H. Ballerstedt, and U. Lechner.** 2001. Regiospecific dechlorination of spiked tetra- and trichlorodibenzo-*p*-dioxins by anaerobic bacteria from PCDD/F-contaminated Spittelwasser sediments. *Chemosphere* **43**: 675-681.
- Bunge, M., J. Kleikemper, C. Miniaci, L. Duc, M. G. Muusse, G. Hause, and J. Zeyer.** 2007. Benzoate-driven dehalogenation of chlorinated ethenes in microbial cultures from a contaminated aquifer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**:1447-1456
- Bunge, M., and U. Lechner.** 2001. Anaerobic transformation of dioxins by bacteria from contaminated sediments: diversity of the dehalogenating community, p. 69-81. In Schriftenreihe des Sonderforschungsbereiches 193 der Technischen Universität Berlin „Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer“, Vol. 15: Anaerobic dehalogenation.
- Bunge, M., A. Wagner, M. Fischer, J. R. Andreesen, and U. Lechner.** 2008. Enrichment of a dioxin-dehalogenating *Dehalococcoides* species in two-liquid phase cultures. *Environ. Microbiol.* **10**:2670-2683.
- Burke, S. A., and J. A. Krzycki.** 1995. Involvement of the "A" isozyme of methyltransferase II and the 29-kilodalton corrinoid protein in methanogenesis from monomethylamine. *J. Bacteriol.* **177**:4410-4416.
- Cato, E. P., W. L. George, and S. M. Finegold.** 1986. Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23^{AL}. In Sneath, P. H. A., N. S. Mair, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 1141-1200.
- Cupples, A. M., A. M. Spormann, and 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.
- Cupples, A. M., A. M. Spormann, and P. L. McCarty.** 2004 a. Vinyl chloride and *cis*-dichloroethene dechlorination kinetics and microorganism growth under substrate limiting conditions. *Environ. Sci. Technol.* **38**:1102-1107.
- Cupples, A. M., A. M. Spormann, and P. L. McCarty.** 2004 b. Comparative evaluation of chloroethene dechlorination to ethene by *Dehalococcoides*-like microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **38**:4768-4774.
- Cutter, L., K. R. Sowers, and H. D. May.** 1998. Microbial dechlorination of 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl under anaerobic conditions in the absence of soil or sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2966-2969.
- Cutter, L. A., J. E. M. Watts, K. R. Sowers, and H. D. May.** 2001. Identification of a microorganism that links its growth to reductive dechlorination of 2,3,5,6-chloro-biphenyl. *Environ. Microbiol.* **3**:699-709.
- Daprato, R. C., F. E. Löffler, and J. B. Hughes.** 2007. Comparative analysis of three tetrachloroethene to ethene halo-respiring consortia suggests functional redundancy. *Environ. Sci. Technol.* **41**:2261-2269.
- De Wildeman, S., G. Diekert, H. Van Langenhowe, and W. Verstraete.** 2003. Stereoselektive microbial dehalorespiration with vicinal dichlorinated alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5643-5647.
- Deweerd, K. A., and J. M. Suflita.** 1990. Anaerobic Aryl Reductive Dehalogenation of Halobenzoates by Cell Extracts of "*Desulfomonile tiedjei*". *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2999-3005.

- DiStefano, T. D., J. M. Gossett, and S. H. Zinder.** 1991. Reductive dechlorination of high concentrations of tetrachloroethene to ethene by an anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2287-2292.
- Dolfing, J., and B. K. Harrison.** 1992. The 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.
- Dolfing, J., and D. B. Janssen.** 1994. Estimates of Gibbs free energies of formation of chlorinated aliphatic compounds. *Biodegradation.* **5**:21-28.
- Dorn, M., J. R. Andreasen, and G. Gottschalk.** 1978. Fermentation of fumarate and *L*-malate by *Clostridium formicoaceticum*. *J. Bacteriol.* **133**:26-32.
- Duhamel, M., and E. A. Edwards.** 2006. Microbial composition of chlorinated ethene-degrading cultures dominated by *Dehalococcoides*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**:538-549.
- Duhamel, M., K. Mo, and E. A. Edwards.** 2004. Characterization of a highly enriched *Dehalococcoides*-containing culture that grows on vinyl chloride and trichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5538-5545.
- Egert, M., and M. W. Friedrich.** 2003. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2555-2562.
- Evans, K., L. Adewoye, and K. Poole.** 2001. MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J. Bacteriol.* **183**:807-812.
- Ewald, E. M., A. Wagner, I. Nijenhuis, H.-H. Richnow, and U. Lechner.** 2007. Microbial dehalogenation of trichlorinated dibenzo-*p*-dioxins by a *Dehalococcoides*-containing mixed culture is coupled to carbon isotope fractionation. *Environ. Sci. Technol.* **41**: 7744-7751.
- Fagervold, S.K., H. D. May, and K. R. Sowers.** 2007. Microbial reductive dechlorination of Aroclor 1260 in Baltimore harbor sediment microcosms is catalyzed by three phylotypes within the phylum *Chloroflexi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:3009-3018.
- Fagervold, S. K., J. E. Watts, H. D. May, and K. R. Sowers.** 2005. Sequential reductive dechlorination of *meta*-chlorinated polychlorinated biphenyl congeners in sediment microcosms by two different *Chloroflexi* phylotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8085-8090.
- Fathepure, B. Z., J. P. Nengu, and S. A. Boyd.** 1987. Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2671-2674.
- Fathepure, B. Z., J. M. Tiedje, and S. A. Boyd.** 1988. Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzenes in anaerobic sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:327-330.
- Fennell, D. E., J. M. Gossett, and S. H. Zinder.** 1997. Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene. *Environ. Sci. Technol.* **31**:918-926.
- Fennell, D. E., I. Nijenhuis, S. F. Wilson, S. H. Zinder, and M. M. Häggblom.** 2004. *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **38**:2075-2081.

- Fiorentino, G., R. Ronca, R. Cannio, M. Rossi, and S. Bartolucci.** 2007. MarR-like transcriptional regulator involved in detoxification of aromatic compounds in *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* **189**:7351-7360.
- Fischer, M.** 2007. Anreicherung von *Dehalococcoides* sp. Stamm DCMB5 unter Einbeziehung eines Dichtegradienten. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle.
- Freeborn, R. A., K. A. West, V. K. Bhupathiraju, S. Chauhan, B. G. Rahm, R. E. Richardson, and L. Alvarez-Cohen.** 2005. Phylogenetic analysis of TCE-dechlorinating consortia enriched on a variety of electron donors. *Environ. Sci. Technol.* **39**:8358-8368.
- Freedman, D. L., and J. M. Gossett.** 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2144-2151.
- Fung, J., R. M. Morris, L. Adrian, and S. H. Zinder.** 2007. Expression of reductive dehalogenase genes in *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 growing on tetrachloroethene, trichloroethene, or 2,3-dichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4439-4445.
- Futamata, H., N. Yoshida, T. Kurogi, S. Kaiya, and A. Hiraishi.** 2007. Reductive dechlorination of chloroethenes by *Dehalococcoides*-containing cultures enriched from a polychlorinated-dioxin-contaminated microcosm. *ISME J.* **1**:471-479.
- Gábor, K., C. S. Veríssimo, B. C. Cyran, P. Ter Horst, N. P. Meijer, H. Smidt, W. M. de Vos, and J. van der Oost.** 2006. Characterization of CprK1, a CRP/FNR-type transcriptional regulator of halorespiration from *Desulfitobacterium hafniense*. *J. Bacteriol.* **188**:2604-2613.
- Galán B., A. Kolb, J. M. Sanz, J. L. García, and M. A. Prieto.** 2003. Molecular determinants of the *hpa* regulatory system of *Escherichia coli*: the HpaR repressor. *Nucleic Acids Res.* **31**:6598-6609.
- Gerritse J., V. Renard, T. M. Pedro Gommers, P. A. Lawson, M. D. Collins, and J. C. Gottschal.** 1996. *Desulfitobacterium* sp. PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. *Arch. Microbiol.* **165**:132-140.
- Gieseler, S.** 2001. *Dehalococcoides*-spezifische Kultivierung von Chlorbenzol- und Dioxin-dechlorierenden Mischkulturen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle.
- Griffin, B. M., J. M. Tiedje, and F. E. Löffler.** 2004. Anaerobic microbial reductive dechlorination of tetrachloroethene to predominately *trans*-1,2-dichloroethene. *Environ. Sci. Technol.* **38**:4300-4303.
- Gu, A. Z., B. P. Hedlund, J. T. Staley, S. E. Strand, and H. D. Stensel.** 2004. Analysis and comparison of the microbial community structures of two enrichment cultures capable of reductively dechlorinating TCE and *cis*-DCE. *Environ. Microbiol.* **6**:45-54.
- Gu, A. Z., H. D. Stensel, J. M. Pietari, and S. E. Strand.** 2003. Vinyl bromide as a surrogate for determining vinyl chloride reductive dechlorination potential. *Environ. Sci. Technol.* **37**:4410-4416.
- He, J., V. F. Holmes, P. K. H. Lee, and Lisa Alvarez-Cohen.** 2007. Influence of vitamin B12 and cocultures on the growth of *Dehalococcoides* isolates in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2847-2853.
- He, J., K. M. Ritalahti, M. R. Aiello, and F. E. Löffler.** 2003 a. 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.

- He, J., K. M. Ritalahti, K.-L. Yang, S. S. Koenigsberg, and F. E. Löffler.** 2003 b. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature* **424**:62-65.
- He, J., Y. Sung, R. Krajmalnik-Brown, K. M. Ritalahti, and F. E. Löffler.** 2005. Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerob. *Environ. Microbiol.* **7**:1442-1450.
- Hendrickson, E. R., J. A. Payne, R. M. Young, M. G. Starr, M. P. Perry, S. Fahnenstock, D. Ellis, and R. Ebersole.** 2002. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout north america and europe. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:485-495.
- Heroven, A. K., and P. Dersch.** 2006. RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **62**:1469-1483.
- Hiraishi, A., S. Kaiya, H. Miyakoda, and H. Futamata.** 2005 a. Biotransformation of polychlorinated dioxins and microbial community dynamics in sediment microcosms at different contamination levels. *Microb. Environ.* **20**:227-242.
- Hiraishi A., N. Sakamaki, H. Miyakoda, T. Maruyama, K. Kato, and H. Futamata.** 2005 b. Estimation of "*Dehalococcoides*" populations in lake sediment contaminated with low levels of polychlorinated dioxins. *Microb. Environ.* **20**:216-226.
- Hiromoto, T., H. Matsue, M. Yoshida, T. Tanaka, H. Higashibata, K. Hosokawa, H. Yamaguchi, and S. Fujiwara.** 2006. Characterization of MobR, the 3-hydroxybenzoate-responsive transcriptional regulator for the 3-hydroxybenzoate hydroxylase gene of *Comamonas testosteroni* KH122-3s. *J. Mol. Biol.* **364**:863-877.
- Holliger, C., D. Hahn, H. Harmsen, W. Ludwig, W. Schumacher, B. Tindall, F. Vasquez, N. Weiss, and A. J. B. Zehnder.** 1998. *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch. Microbiol.* **169**:313-321.
- Holliger, C., G. Schraa, A. J. Stams, and A. J. 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.
- Holliger, C., G. Schraa, A. J. M. Stams, and A. J. B. Zehnder.** 1993. A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2991-2997.
- Holliger, C., G. Wohlfarth, and G. Diekert.** 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:383-398.
- Holmes, V. F., J. He, P. K. Lee, and L. Alvarez-Cohen.** 2006. Discrimination of multiple *Dehalococcoides* strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5877-5883.
- Hölscher, T., H. Görisch, and L. Adrian.** 2003. Reductive dehalogenation of chlorobenzene congeners in cell free extracts of *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2999-3001.
- Hölscher, T., R. Krajmalnik-Brown, K. M. Ritalahti, F. von Winzigerode, H. Görisch, F. E. Löffler and L. Adrian.** 2004. Multiple nonidentical reductive-dehalogenase-homologous genes are common in *Dehalococcoides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5290-5297.

- Hong, M., M. Fuangthong, J. D. Helmann, and R. G. Brennan.** 2005. Structure of an OhrR-*ohrA* operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR Family. *Mol. Cell.* **20**:131-141.
- Hugenholtz, P., and E. Stackebrandt.** 2004. Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass *Sphaerobacteridae* in the phylum *Actinobacteria* to the class *Thermomicrobia* (emended description) in the phylum *Chloroflexi* (emended description). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:2049-2051.
- Huws, S. A., J. E. Edwards, E. J. Kim, and N. D. Scollan.** 2007. Specificity and sensitivity of eubacterial primers utilized for molecular profiling of bacteria within complex microbial ecosystems. *J. Microbiol. Methods.* **70**:565-569.
- Jackson, B. E., V. K. Bhupathiraju, R. S. Tanner, C. R. Woese, and M. J. McInerney.** 1999. *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Arch. Microbiol.* **171**:107-114.
- Janssen, P. H., S. Evers, F. A. Rainey, N. Weiss, W. Ludwig, C. G. Harfoot, and B. Schink.** 1995. *Lactosphaera* gen. nov., a new genus of lactic acid bacteria, and transfer of *Ruminococcus pasteurii* Schink 1984 to *Lactosphaera pasteurii* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:565-471.
- Jayachandran, G., H. Görisch, and L. Adrian.** 2003. Dehalorespiration with hexachlorobenzene and pentachlorobenzene by *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Arch. Microbiol.* **180**:411-416.
- Jayachandran, G., H. Görisch, and L. Adrian.** 2004. Studies on hydrogenase activity and chlorobenzene respiration in *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Arch. Microbiol.* **182**:498-504.
- Johnson, D. R., P. K. Lee, V. F. Holmes, and L. Alvarez-Cohen.** 2005 a. An internal reference technique for accurately quantifying specific mRNAs by real-time PCR with application to the *tceA* reductive dehalogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3866-3871.
- Johnson, D. R., P. K. Lee, V. F. Holmes, A. C. Fortin, and L. Alvarez-Cohen.** 2005 b. Transcriptional expression of the *tceA* gene in a *Dehalococcoides*-containing microbial enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7145-7151.
- Junick, J.** 2007. Transkriptionsanalyse der Dehalogenasene gene von *Dehalococcoides* species Stamm CBDB1. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle.
- Kanagawa, T.** 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J. Biosci. Bioeng.* **96**:317-323.
- Kirk, J. L., L. A. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J. N. Klironomos, H. Lee, and J. T. Trevors.** 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods.* **58**:169-188.
- Kittelmann, S, and M. W. Friedrich.** 2008 a. Identification of novel perchloroethene-respiring microorganisms in anoxic river sediment by RNA-based stable isotope probing. *Environ. Microbiol.* **10**:31-46.
- Kittelmann, S, and M. W. Friedrich.** 2008 b. Novel uncultured *Chloroflexi* dechlorinate perchloroethene to *trans*-dichloroethene in tidal flat sediments. *Environ. Microbiol.* **10**:1557-1570.
- Krajmalnik-Brown, R., T. Hölscher, I. N. Thomson, F. M. Saunders, K. M. Ritalahti, and F. E. Löffler.** 2004. Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6347-6351.

- Kräutler, B., W. Fieber, S. Ostermann, M. Fasching, K.-H. Ongania, K. Gruber, C. Kratky, C. Mikl, A. Siebert, and 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.
- Kube, M., A. Beck, S. H. Zinder, H. Kuhl, R. Reinhardt, and L. Adrian.** 2005. Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nat. Biotechnol.* **23**:1269-1273.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Laub, M. T., and M. Goulian.** 2007. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu. Rev. Genet.* **41**:121-145.
- Lee, P. K., D. R. Johnson, V. F. Holmes, J. He, and L. Alvarez-Cohen.** 2006. Reductive dehalogenase gene expression as a biomarker for physiological activity of *Dehalococcoides* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:6161-6168.
- Lee, P. K., T. W. Macbeth, K. S. Sorenson Jr., R. A. Deeb, and L. Alvarez-Cohen.** 2008. Quantifying genes and transcripts to assess the in situ physiology of "*Dehalococcoides*" ssp. in a trichloroethene-contaminated groundwater site. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2728-2739.
- Lee, J. W., S. Soonsanga, and J. D. Helmann.** 2007. A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**:8743-8748.
- Lim, D., K. Poole, and N. C. Strynadka.** 2002. Crystal structure of the MexR repressor of the *mexRAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **277**:29253-29259.
- Liu, F., and D. E. Fennell.** 2008. Dechlorination and detoxification of 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran by a mixed culture containing *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *Environ. Sci. Technol.* **42**:602-607.
- Löffler, F. E., J. R. Cole, K. M. Ritalahti, and J. M. Tiedje.** 2003. Diversity of dechlorinating bacteria. In Häggblom, M. M., and I. D. Bossert (eds.), *Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications*, Kluwer Academic Publishers, Boston, p. 53-87.
- Löffler, F. E., K. M. Ritalahti, and J. M. Tiedje.** 1997. Dechlorination of chloroethenes is inhibited by 2-bromoethanesulfonate in the absence of Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4982-4985.
- Löffler, F. E., R. A. Sanford, and K. M. Ritalahti.** 2005. Enrichment, Cultivation, and Detection of reductively dechlorinating bacteria. *Methods Enzymol.* **397**:77-111.
- Löffler, F. E.; R. A. Sanford, and J. M. Tiedje.** 1996. Initial Characterization of a Reductive Dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3809-3813.
- Löffler, F. E., J. M. Tiedje, and R. A. Sanford.** 1999. Fraction of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halo-respiratory physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4049-4056.
- Ludwig, M. L., and R. G. Matthews.** 1997. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:269-313.

- Lueders, T., and M. W. Friedrich.** 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:320-326.
- Macbeth, T. W., D. E. Cummings, S. Spring, and L. M. Petzke, K. S. Sorenson Jr.** 2004. Molecular characterization of a dechlorinating community resulting from *in situ* biostimulation in a trichloroethene-contaminated deep, fractured basalt aquifer and comparison to a derivative laboratory culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:7329-7341.
- Magnuson, J. K., M. F. Romine, D. R. Burris, and M. T. Kingsley.** 2000. Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: Sequence of *tceA* and substrate range characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5141-5147.
- Magnuson, J. K., R. V. Stern, J. M. Gossett, S. H. Zinder, and D. R. Burris.** 1998. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1270-1275.
- Maillard, J., W. Schumacher, F. Vazquez, C. Regard, W. R. Hagen, and C. Holliger.** 2003. Characterization of the corrinoid iron-sulfur protein tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4628-4638.
- Major, D. W., M. L. McMaster, E. E. Cox, E. A. Edwards, S. M. Dworatzek, E. R. Hendrickson, M. G. Starr, J. A. Payne, and L. W. Buonamici.** 2002. Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environ. Sci. Technol.* **36**:5106-5116.
- Malpica, R., B. Franco, C. Rodriguez, O. Kwon, and D. Georgellis.** 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**:13318-13323.
- Martin, R. G., and J. L. Rosner.** 1995. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:5456-5460.
- May, H. D., L. A. Cutter, G. S. Miller, C. E. Milliken, J. E. Watts, and K. R. Sowers.** 2006. Stimulatory and inhibitory effects of organohalides on the dehalogenating activities of PCB-dechlorinating bacterium o-17. *Environ. Sci. Technol.* **40**:5704-5709.
- May, H. D., G. S. Miller, B. V. Kjellerup, and K. R. Sowers.** 2008. Dehalorespiration with polychlorinated biphenyls by an anaerobic ultramicrobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2089-2094.
- Maymó-Gatell, X., T. Anguish, and S. H. Zinder.** 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1, 2-dichloroethane by "*Dehalococcoides ethenogenes*" 195. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3108-3113.
- Maymó-Gatell, X., Y. Chien, J. M. Gossett, and S. H. Zinder.** 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* **276**:1568-1571.
- Maymó-Gatell, X., V. Tandoi, J. M. Gossett and S. H. Zinder.** 1995. Characterization of an H₂-utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3928-3933.
- Mc Cue, J. J., W. K. Gauger, T. H. Holsen, R. L. Kelly, and D. K. Cha.** 1996. Effects of selected reducing agents on microbiologically mediated reductive dechlorination of Aroclor 1242. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**:1071-1082.

- McMurdie, P. J., S. F. Behrens, S. Holmes, and A. M. Spormann.** 2007. Unusual codon bias in vinyl chloride reductase genes of *Dehalococcoides* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2744-2747.
- Middeldorp, P., J. De Wolf, A. Zehnder, and G. Schraa.** 1997. Enrichment and Properties of a 1,2,4-Trichlorobenzene-Dechlorinating Methanogenic Microbial Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1225-1229.
- Miller, G. S., C. E. Milliken, K. R. Sowers, and H. D. May.** 2005. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to *trans*-dichloroethene and *cis*-dichloroethene by PCB-dechlorinating bacterium DF-1. *Environ. Sci. Technol.* **39**:2631-2635.
- Miller, E., G. Wohlfarth, and G. Diekert.** 1996. Studies on tetrachloroethene respiration in *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* **166**:379-387.
- Miller, E., G. Wohlfarth, and G. Diekert.** 1997. Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfotobacterium* sp. strain PCE-S. *Arch. Microbiol.* **168**:513-519.
- Miller, E., G. Wohlfarth, and G. Diekert.** 1998. Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S. *Arch. Microbiol.* **169**:497-502.
- Mongkolsuk, S., W. Panmanee, S. Atichartpongkul, P. Vattanaviboon, W. Whangsuk, M. Fuangthong, W. Eiamphungporn, R. Sukchawalit, and S. Utamapongchai.** 2002. The repressor for an organic peroxide-inducible operon is uniquely regulated at multiple levels. *Mol. Microbiol.* **44**:793-802.
- Morris, R. M., J. M. Fung, B. G. Rahm, S. Zhang, D. L. Freedman, S. H. Zinder, and R. E. Richardson.** 2007. Comparative proteomics of *Dehalococcoides* spp. reveals strain-specific peptides associated with activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:320-326.
- Morris, R. M., S. Sowell, D. Barofsky, S. Zinder, and R. Richardson.** 2006. Transcription and mass-spectroscopic proteomic studies of electron transport oxidoreductases in *Dehalococcoides ethenogenes*. *Environ. Microbiol.* **8**:1499-1509.
- Müller, J. A., B. M. Rosner, G. von Abendroth, G. Meshulam-Simon, P. L. McCarty, and A. M. 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.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
- Neumann, A., H. Scholz-Muramatsu, and G. Diekert.** 1994. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* **162**:295-301.
- Neumann, A., G. Wohlfarth, and G. Diekert.** 1996. Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *J. Biol. Chem.* **271**:16515-16519.
- Newberry, K. J., M. Fuangthong, W. Panmanee, S. Mongkolsuk, and R. G. Brennan.** 2007. Structural mechanism of organic hydroperoxide induction of the transcription regulator OhrR. *Mol. Cell.* **28**:652-664.
- Ni, S., J. K. Fredrickson, and 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.

- Nijenhuis, I., and S. H. Zinder.** 2005. Characterization of hydrogenase and reductive dehalogenase activities of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1664-1667.
- Novak, J., N.-H. Kirsch, W. Hegemann, and H.-J. Stan.** 1996. Total reductive dechlorination of chlorobenzenes to benzene by a methanogenic mixed culture isolated from Saale river sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**:700-709.
- Osborn, A. M., E. R. B. Moore, and K. Timmis.** 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**:39-50.
- Osborne, C. A., M. Galic, P. Sangwan, and P. H. Janssen.** 2005. PCR-generated artefacts from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS microbiology letters.* **248**:183-187.
- Panmanee, W., P. Vattanaviboon, W. Eiamphungporn, W. Whangsuk, R. Sallabhan, and S. Mongkolsuk.** 2002. OhrR, a transcription repressor that senses and responds to changes in organic peroxide levels in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Mol. Microbiol.* **45**:1647-1654.
- Peters, F., D. Heintz, J. Johannes, A. van Dorselaer, and M. Boll.** 2007. Genes, enzymes, and regulation of *para*-Cresol metabolism in *Geobacter metallireducens*. *J. Bacteriol.* **189**: 4729-4738.
- Pop, S. M., N. Gupta, A. S. Raza, and S. W. Ragsdale.** 2006. Transcriptional activation of dehalorespiration. Identification of redox-active cysteines regulating dimerization and DNA binding. *J. Biol. Chem.* **281**:26382-26390.
- Pop, S. M., R. J. Kolarik, and S. W. Ragsdale.** 2004. Regulation of anaerobic dehalorespiration by the transcriptional activator CprK. *J. Biol. Chem.* **279**:49910-49918.
- Providenti, M. A., and R. C. Wyndham.** 2001. Identification and functional characterization of CbaR, a MarR-like modulator of the *cbaABC*-encoded chlorobenzoate catabolism pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3530-3541.
- Pulliam Holoman, T. R., M. A. Elberson, L. A. Cutter, H. D. May, and K. R. Sowers.** 1998. Characterization of a defined 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl-*ortho*-dechlorinating microbial community by comparative sequence analysis of genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3359-3367.
- Rahm, B. G., S. Chauhan, V. F. Holmes, T. W. Macbeth, K. S. Jr. Sorenson, and L. Alvarez-Cohen.** 2006 a. Molecular characterization of microbial populations at two sites with differing reductive dechlorination abilities. *Biodegradation.* **17**:523-534.
- Rahm, B. G., R. M. Morris, and R. E. Richardson.** 2006 b. Temporal expression of respiratory genes in an enrichment culture containing *Dehalococcoides ethenogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5486-5491.
- Rahm, B. G., and R. E. Richardson.** 2008. Correlation of respiratory gene expression levels and pseudo-steady-state PCE respiration rates in *Dehalococcoides ethenogenes*. *Environ. Sci. Technol.* **42**:416-421.
- Rainey, F. A., N. L. Ward-Rainey, P. H. Janssen, H. Hippe, and E. Stackebrandt.** 1996. *Clostridium paradoxum* DSM 7308^T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology-UK* **142**:2087-2095.
- Regeard, C., J. Maillard, C. Dufraigne, P. Deschavanne, and C. Holliger.** 2005. Indications for acquisition of reductive dehalogenase genes through horizontal gene transfer by *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2955-2961.

- Regeard, C., J. Maillard, and 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.
- Rhee, S., D. Fennell, M. Häggblom, and L. 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.
- Richardson, R. E., V. K. Bhupathiraju, D. L. Song, T. A. Goulet, and L. Alvarez-Cohen.** 2002. Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. *Environ. Sci. Technol.* **35**:4449-4456.
- Ritalahti, K. M., B. K. Amos, Y. Sung, Q. Wu, S. S. Koenigsberg, and F. E. Löffler.** 2006. Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2765-2774.
- Ritalahti, K. M., and 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.
- Rosenthal, H., L. Adrian, and M. Steiof.** 2003. Dechlorination of PCE in the presence of Fe⁰ enhanced by a mixed culture containing two *Dehalococcoides* strains. *Chemosphere.* **55**:661-669.
- Rysavy, J. P., T. Yan, and P. J. Novak.** 2005. Enrichment of anaerobic polychlorinated biphenyl dechlorinators from sediment with iron as a hydrogen source. *Water Res.* **39**:569-578.
- Sánchez, P., F. Rojo, and J. L. Martínez.** 2002. Transcriptional regulation of *mexR*, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol. Lett.* **207**(1):63-68.
- Sargent F.** 2007. The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem. Soc. Trans.* **35**:835-847.
- Sawada, H., H. Ieki, H. Oyaizu, and S. Matsumoto.** 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:694-702.
- Schink, B.** 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:262-280.
- Schlötelburg, C., F. von Wintzingerode, R. Hauck, W. Hegemann, and U. B. Göbel.** 2000. Bacteria of an anaerobic 1,2-dichloropropane-dechlorinating mixed culture are phylogenetically related to those of other anaerobic dechlorinating consortia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* **50**:1505-1511.
- Scholz-Muramatsu, H., A. Neumann, M. Messmer, E. Moore, and G. Diekert.** 1995. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* **163**:48-56.
- Schumacher, W., and C. Holliger.** 1996. The proton/electron ratios of the menaquinone-dependent electron transport from dihydrogen to tetrachloroethene in "*Dehalobacter restrictus*". *J. Bacteriol.* **178**:2328-2333.
- Schumacher, W., C. Holliger, A. J. Zehnder, and W. R. Hagen.** 1997. Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*. *FEBS Lett.* **409**:421-425.

- Seshadri, R., L. Adrian, D. E. Fouts, J. A. Eisen, A. M. Phillipy, B. A. Methe, N. L. Ward, W. C. Nelson, R. T. Deboy, H. M. Khouri, J. F. Kolonay, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, L. M. Brinkac, S. A. Sullivan, R. Madupu, K. E. Nelson, K. H. Kang, M. Impraim, K. Tran, J. M. Robinson, H. A. Forberger, C. M. Fraser, S. H. Zinder, and J. F. Heidelberg.** 2005. Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science*. **307**:105-108.
- Sharma P. K., and P. L. McCarty.** 1996. Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to *cis*-1,2-dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:761-765.
- Shiu, W. Y., W. Doucette, F. A. P. C. Gobas, A. Andren, and D. Mackay.** 1988. Physical-chemical properties of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ. Sci. Technol.* **22**:651-658.
- Smidt, H.** 2001. Molecular characterization of anaerobic dehalogenation by *Desulfitobacterium dehalogenans*. Dissertation. Universität Wageningen, Wageningen/Niederlande.
- Smidt, H., and W. M. de Vos.** 2004. Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:43-73.
- Smidt, H., M. van Leest, J. van der Oost, and W. M. de Vos.** 2000. Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in ortho-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J. Bacteriol.* **182**:5683-5691.
- Smith J. J., and G. A. McFeters.** 1997. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *J. Microbiol. Methods.* **29**:161-175.
- Soonsanga, S., M. Fuangthong, and J. D. Helmann.** 2007. Mutational analysis of active site residues essential for sensing of organic hydroperoxides by *Bacillus subtilis* OhrR. *J. Bacteriol.* **189**:7069-7076.
- Sung, Y., K. M. Ritalahti, R. P. Apkarian, and F. E. Löffler.** 2006. Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene-to-ethene-respiring *Dehalococcoides* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1980-1987.
- Surkov, A. V., G. A. Dubinina, A. M. Lysenko, F. O. Glöckner, and J. Kuever.** 2001. *Dethiosulfovibrio russensis* sp. nov., *Dethiosulfovibrio marinus* sp. nov. and *Dethiosulfovibrio acidaminovorans* sp. nov., novel anaerobic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacteria isolated from 'Thiodendron' sulfur mats in different saline environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:327-337.
- Takeshita, T., Y. Nakano, and Y. Yamashita.** 2007. Improved accuracy in terminal restriction fragment length polymorphism phylogenetic analysis using a novel internal size standard definition. *Oral Microbiol. Immunol.* **22**: 419-428.
- Taylor, B. L., and I. B. Zhulin.** 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:479-506.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Tropel, D., and J. R. van der Meer.** 2004. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:474-500.

- Tsukagoshi, N., S. Ezaki, T. Uenaka, N. Suzuki, and R. Kurane.** 2006. Isolation and transcriptional analysis of novel tetrachloroethene reductive dehalogenase gene from *Desulfitobacterium* sp. strain KBC1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**:543-553.
- Utkin, I., C. Woese, and J. Wiegel.** 1994. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:612-619.
- van de Pas, B. A., H. Smidt, W. R. Hagen, J. van der Oost, G. Schraa, A. J. M. Stams, and 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.
- van Doesburg, W., M. H. van Eekert, P. J. Middeldorp, M. Balk, G. Schraa, and A. J. Stams.** 2005. Reductive dechlorination of β -hexachlorocyclohexane (β -HCH) by a *Dehalobacter* species in coculture with a *Sedimentibacter* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**:87-95.
- von Wintzingerode, F., C. Schlötelburg, R. Hauck, W. Hegemann, and 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.
- von Wintzingerode, F., B. Selent, W. Hegemann, and U. B. Göbel.** 1999. Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:283-286.
- Voskuil, M. I., and G. H. Chambliss.** 2002. The TRTGn motif stabilizes the transcription initiation open complex. *J. Mol. Biol.* **322**:521-532.
- Wagner, A.** 2004. Untersuchung der Struktur dioxindechlorierender Mischkulturen durch terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (t-RFLP) und Real-Time-PCR. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle.
- Waller, A. S., R. Krajmalnik-Brown, F. E. Löffler, and E. A. Edwards.** 2005. Multiple reductive-dehalogenase-homologous genes are simultaneously transcribed during dechlorination by *Dehalococcoides*-containing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8257-8264.
- Watts, J. E., Q. Wu, S. B. Schreier, H. D. May, and K. R. Sowers.** 2001. Comparative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. *Environ. Microbiol.* **3**:710-719.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- West, K. A., D. R. Johnson, P. Hu, T. Z. Desantis, E. L. Brodie, P. K. Lee, H. Feil, G. L. Andersen, S. H. Zinder, and L. Alvarez-Cohen.** 2008. Comparative genomics of "*Dehalococcoides ethenogenes*" 195 and an enrichment culture containing unsequenced "*Dehalococcoides*" strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3533-3540.
- White, D. C., R. Geyer, A. D. Peacock, D. B. Hedrick, S. S. Koenigsberg, Y. Sung, J. He, and F. E. Löffler.** 2005. Phospholipid furan fatty acids and ubiquinone-8: lipid biomarkers that may protect *Dehalococcoides* strains from free radicals. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8426-8433.
- Widdel, F., G. W. Kohring, and F. Mayer.** 1983. Studies on dissimilatory sulfate reducing bacteria that decompose fatty acids. III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **134**:286-294.

Wilkinson, S. P., and A. Grove. 2006. Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**:51-62.

Wilson, K. P., L. M. Shewchuk, R. G. Brennan, A. J. Otsuka, and B. W. Matthews. 1992. *Escherichia coli* biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:9257-9261.

Wu, Q., D. L. Bedard, and J. Wiegel. 1999. 2,6-Dibromobiphenyl primes extensive dechlorination of Aroclor 1260 in contaminated sediment at 8-30°C by stimulating growth of PCB-dehalogenating microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **33**:595-602.

Wu, Q., C. E. Milliken, G. P. Meier, J. E. Watts, K. R. Sowers, and H. D. May. 2002 a. Dechlorination of chlorobenzenes by a culture containing bacterium DF-1, a PCB dechlorinating microorganism. *Environ. Sci. Technol.* **36**:3290-3294.

Wu, Q., K. R. Sowers, and H. D. May. 1998. Microbial Reductive Dechlorination of Aroclor 1260 in Anaerobic Slurries of Estuarine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1052-1058.

Wu, Q., K. R. Sowers, and H. D. May. 2000. Establishment of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating microbial consortium, specific for doubly flanked chlorines, in defined, sediment-free medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:49-55.

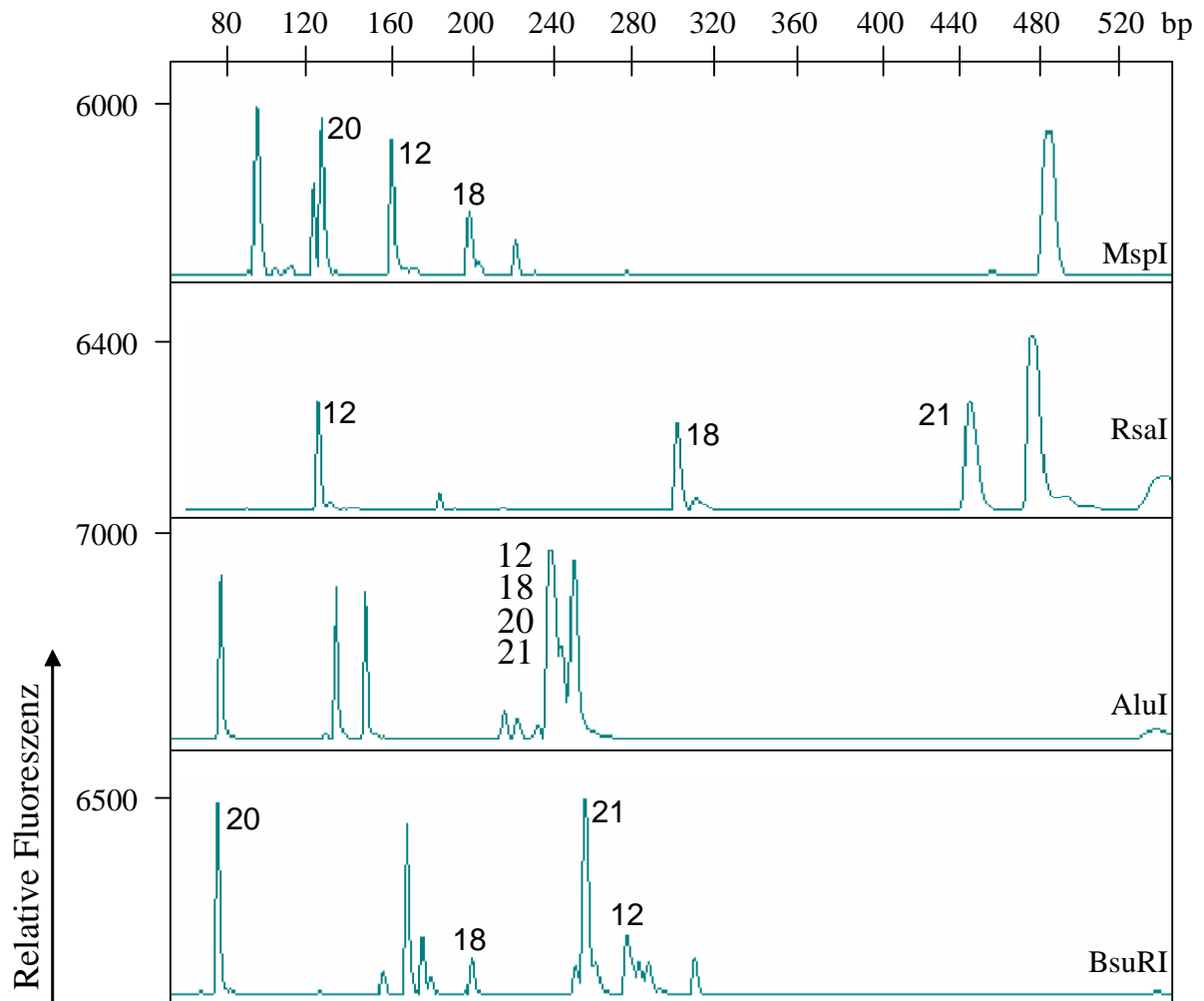
Wu, Q., J. E. Watts, K. R. Sowers, and H. D. May. 2002 b. Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:807-812.

Yan, T., T. M. LaPara, and P. J. Novak. 2005. The reductive dechlorination of 2,3,4,5-tetrachlorobiphenyl in three different sediment cultures: evidence for the involvement of phylogenetically similar *Dehalococcoides*-like bacterial populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**:248-261.

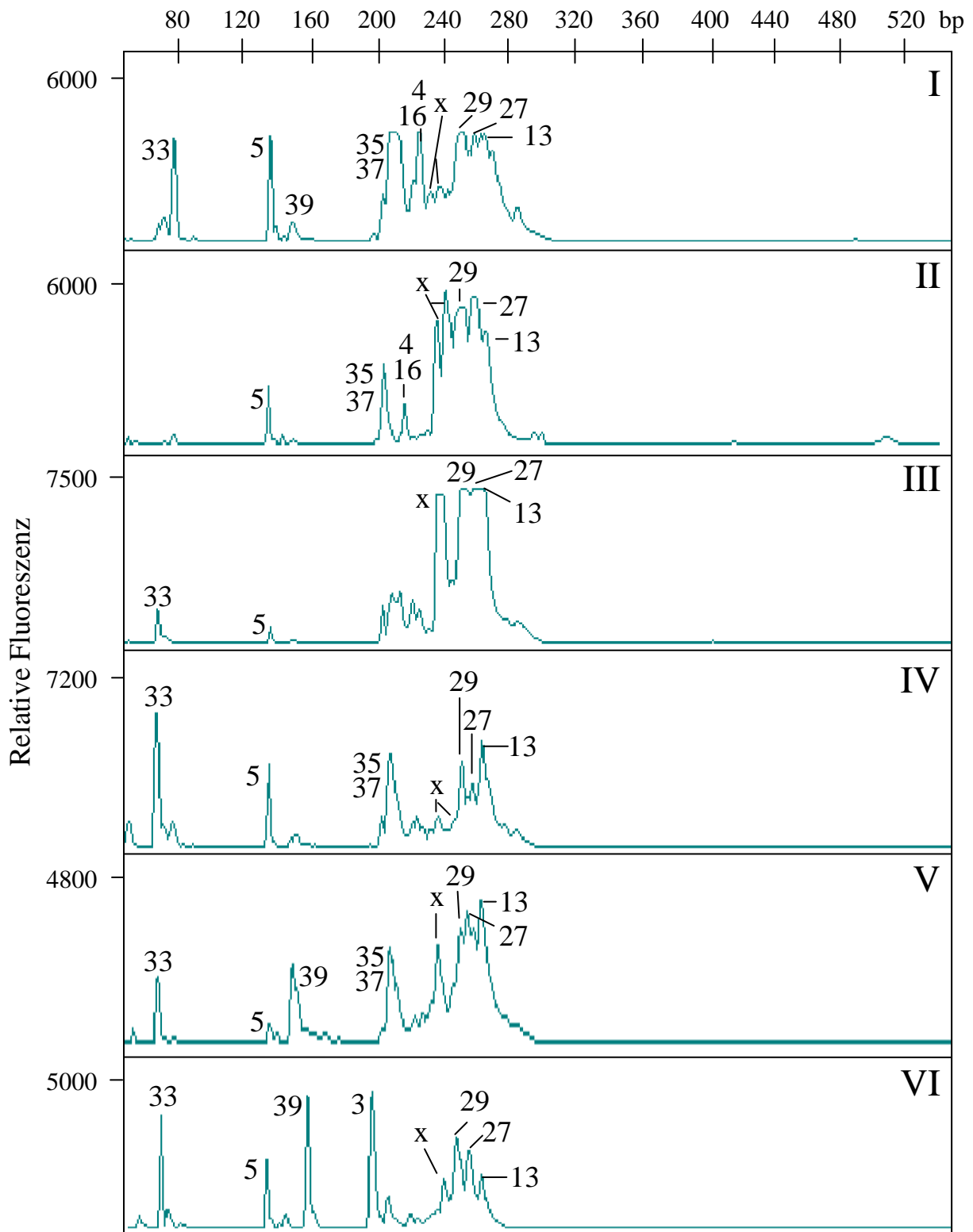
Yan, T., T. M. LaPara, and P. J. Novak. 2006. The reductive dechlorination of 2,3,4,5-tetrachlorobiphenyl in three different sediment cultures: evidence for the involvement of phylogenetically similar *Dehalococcoides*-like bacterial populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**:248-261.

Yang, Y., M. Pesaro, W. Sigler, and J. Zeyer. 2005. Identification of microorganisms involved in reductive dehalogenation of chlorinated ethenes in an anaerobic microbial community. *Water Res.* **39**:3954-3966.

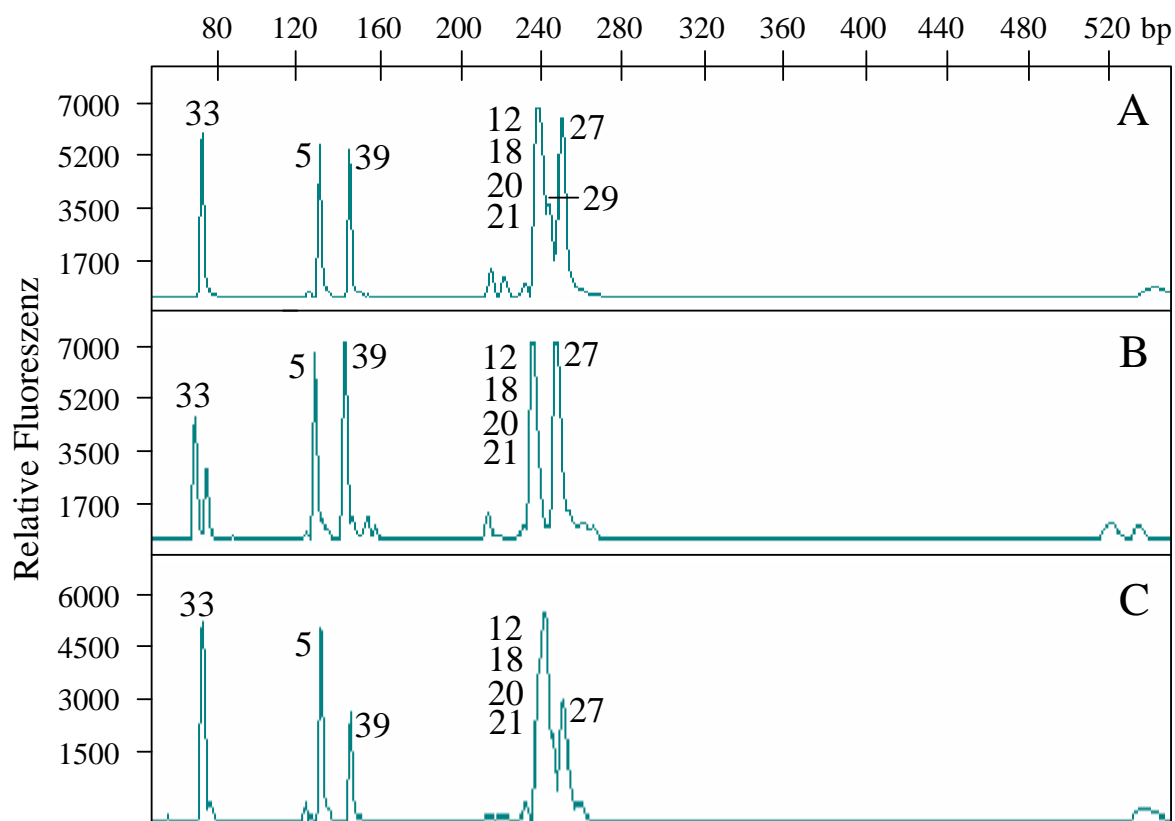
7. Anhang



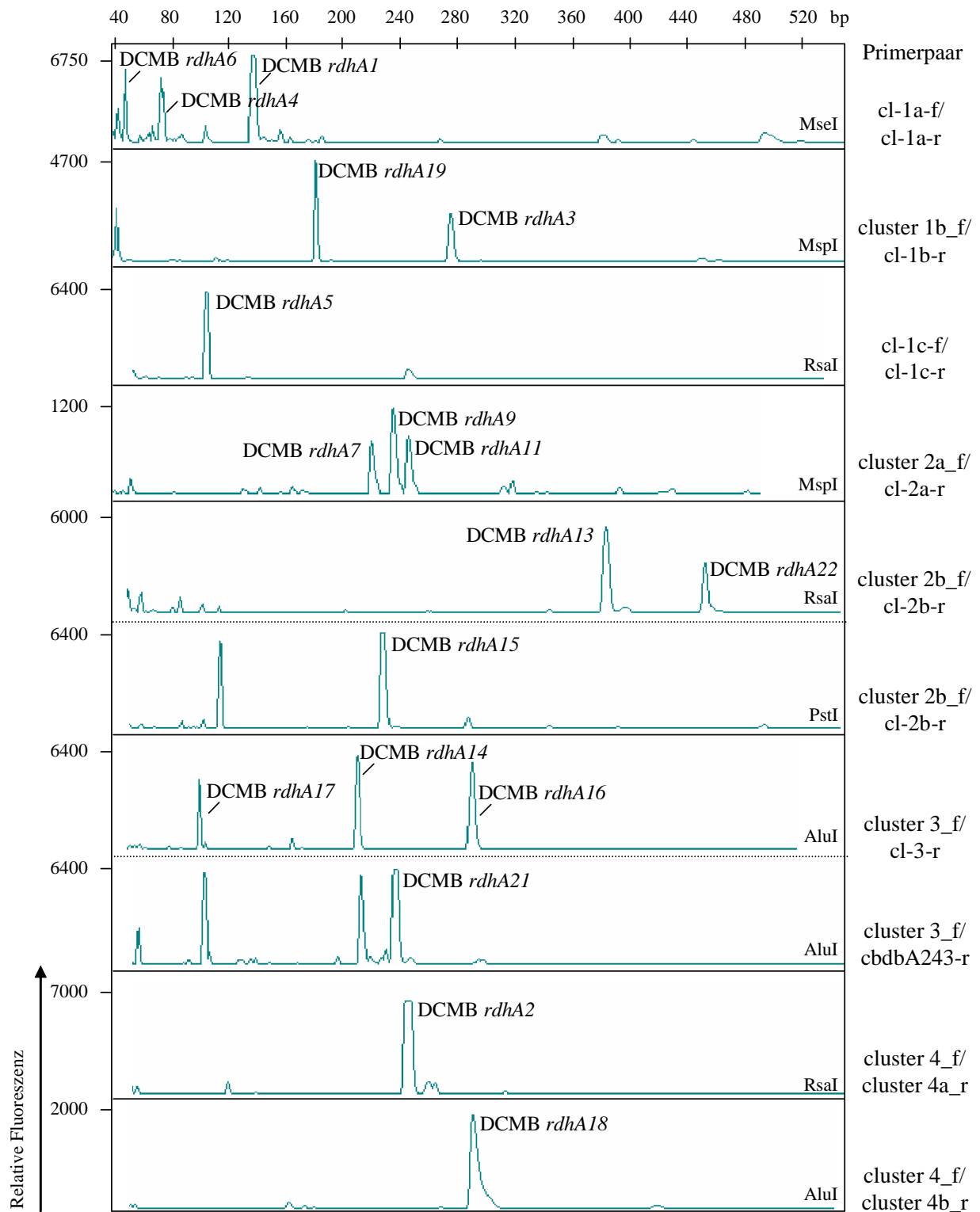
Anhang 1. T-RFLP Profile nach MspI-, RsaI-, AluI- und BsuRI-Verdau der amplifizierten 16S rRNA Gene aus der Kontrollkultur ohne 1,2,3-TrCB mit Wasserstoff als Elektronendonator und BES bzw. Vancomycin als Inhibitoren nach 98-tägiger Kultivierung. Mit Hilfe dieser Chromatogramme konnte der nach AluI-Verdau erhaltene Peak um 240 bp (Abb. 8, 10, Anhang 2, 3) in die Muster 12, 18, 20 und 21 aufgelöst werden. Die Zuordnung der t-RFs zu den Mustern erfolgte nach theoretischem Verdau der 16S rRNA Gensequenzen (Tab. 11).



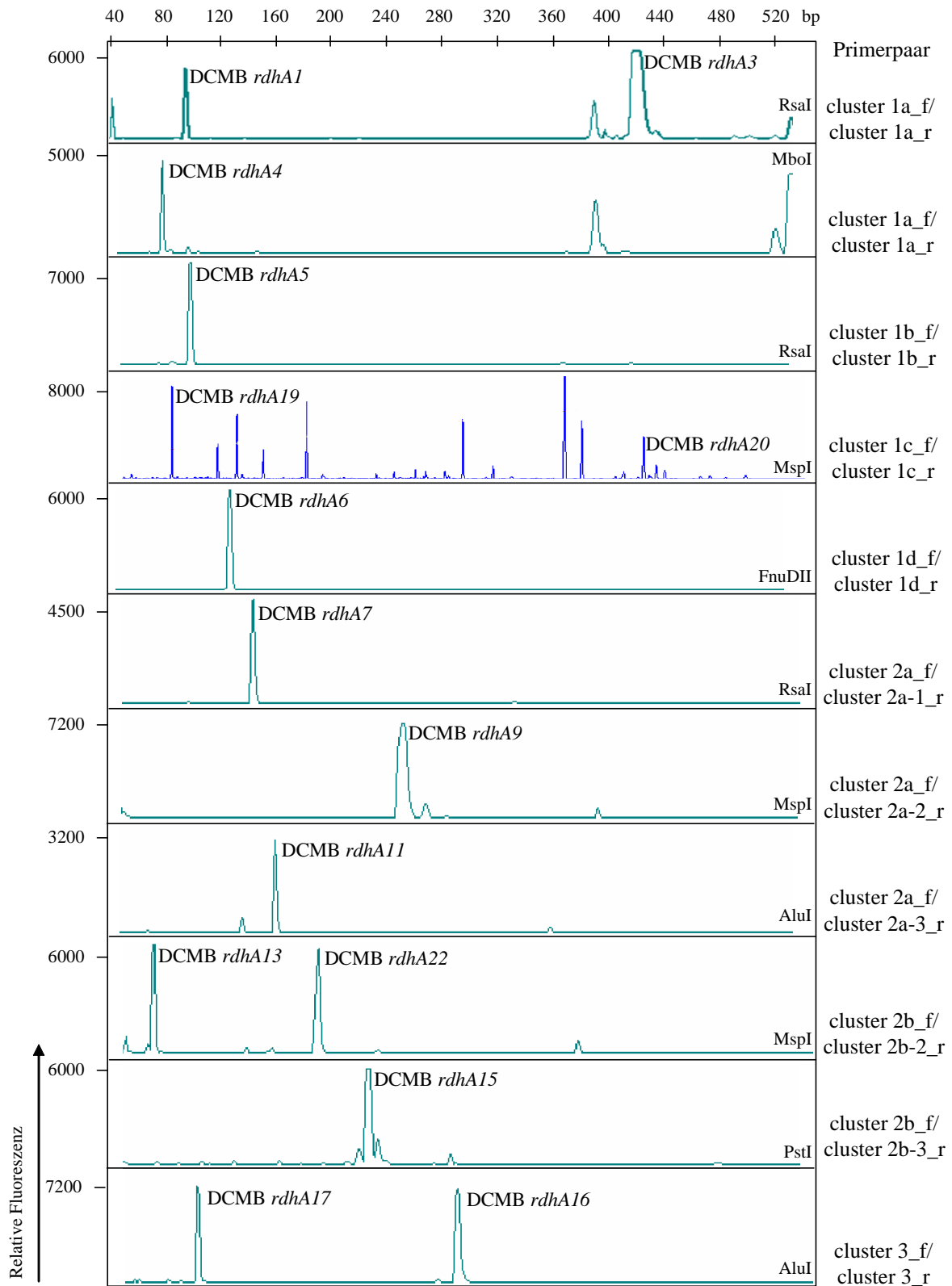
Anhang 2. T-RFLP Profile nach AluI-Verdau der amplifizierten 16S rRNA Gene aus Kontrollkulturen ohne 1,2,3-TrCB, mit BES, Acetat und verschiedenen Elektronendonatoren. Die DNA wurde nach 98-tägiger Kultivierung isoliert. Die Zuordnung der t-RFs zu bestimmten Mustern erfolgte nach dem theoretischen Verdau der 16S rRNA-Gensequenzen (Tab. 11, 13, 14). Durch den Vergleich mit t-RFLP Profilen nach MspI-, RsaI- und BsuRI-Verdau (Anhang 1) konnte der Peak um 240 bp (x) näher aufgelöst und den Mustern 12, 18, 20 und 21 zugeordnet werden. Elektronendonatoren: Formiat (I), Formiat, H₂ (II), Fumarat (III), Pyruvat (IV), Pyruvat, Fumarat (V), Pyruvat, Fumarat, Formiat (VI).



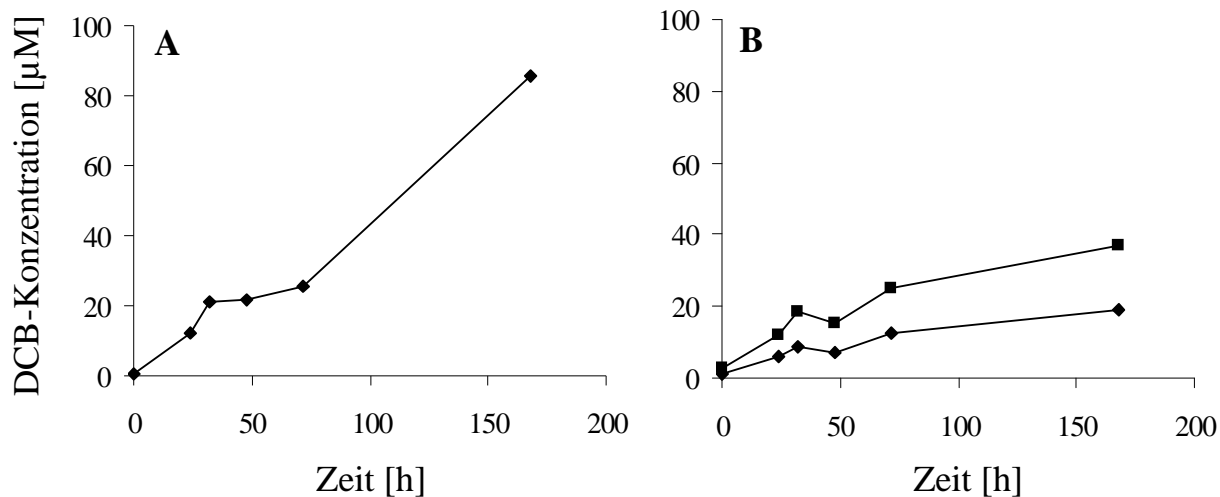
Anhang 3. T-RFLP Profile nach AluI-Verdau der amplifizierten 16S rRNA Gene aus Kontrollkulturen ohne 1,2,3-TrCB, mit BES, Acetat, verschiedenen Elektronendonatoren und Inhibitoren. Die DNA wurde nach 98-tägiger Kultivierung isoliert. Die Zuordnung der t-RFs zu bestimmten Mustern erfolgte durch den Vergleich mit den theoretischen terminalen Fragmentlängen der klonierten 16S rRNA Gene (Tab. 11, 13, 14). Durch den Vergleich mit t-RFLP Profilen nach MspI, RsaI und BsuRI Verdau (Anhang 1) konnte der Peak um 240 bp näher aufgelöst und den angegebenen Mustern zugeordnet werden. A: Elektronendonatoren: Pyruvat, Fumarat, Formiat, H₂, Inhibitor: 5 mg/l Vancomycin; B: Elektronendonatoren: Pyruvat, Fumarat, Formiat, H₂, Inhibitor: 5 mg/l Penicillin; C: Elektronendonator: H₂, Inhibitor: 5 mg/l Vancomycin.



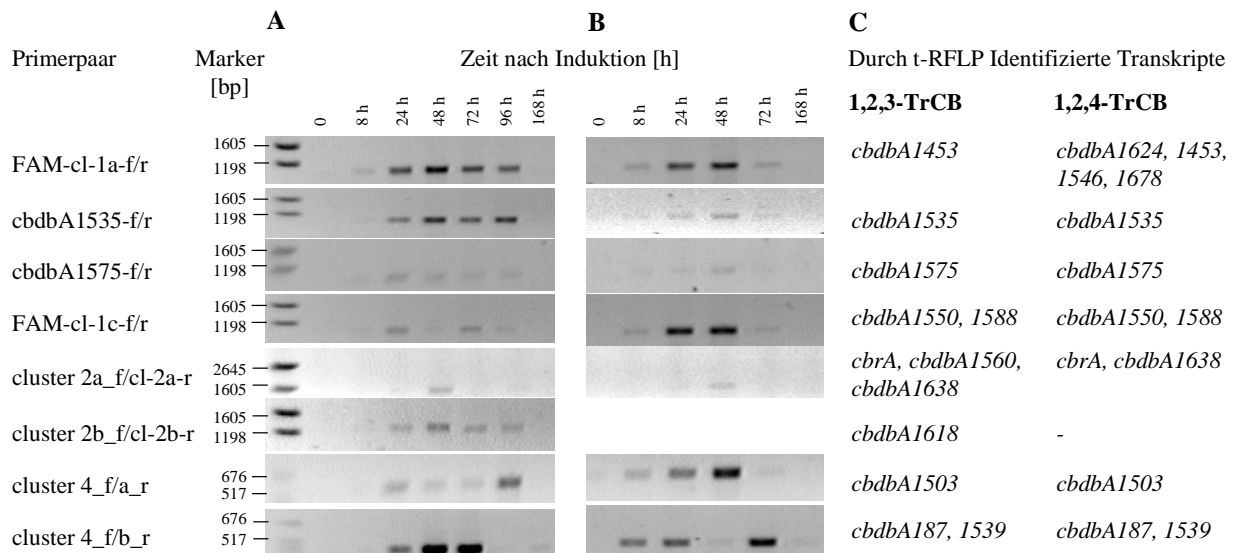
Anhang 4. T-RFLP Profile nach Restriktion von Amplifikaten von *rdhA* Genen, die mit DNA der Stamm DCMB5-haltigen Mischkultur als *template* und den verwendeten Primerpaaren (rechts) PCR-Produkte bis zu einer Größe von 1650 bp ergaben. Die identifizierten *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 sind neben den entsprechenden terminalen Fragmenten dargestellt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind angegeben.



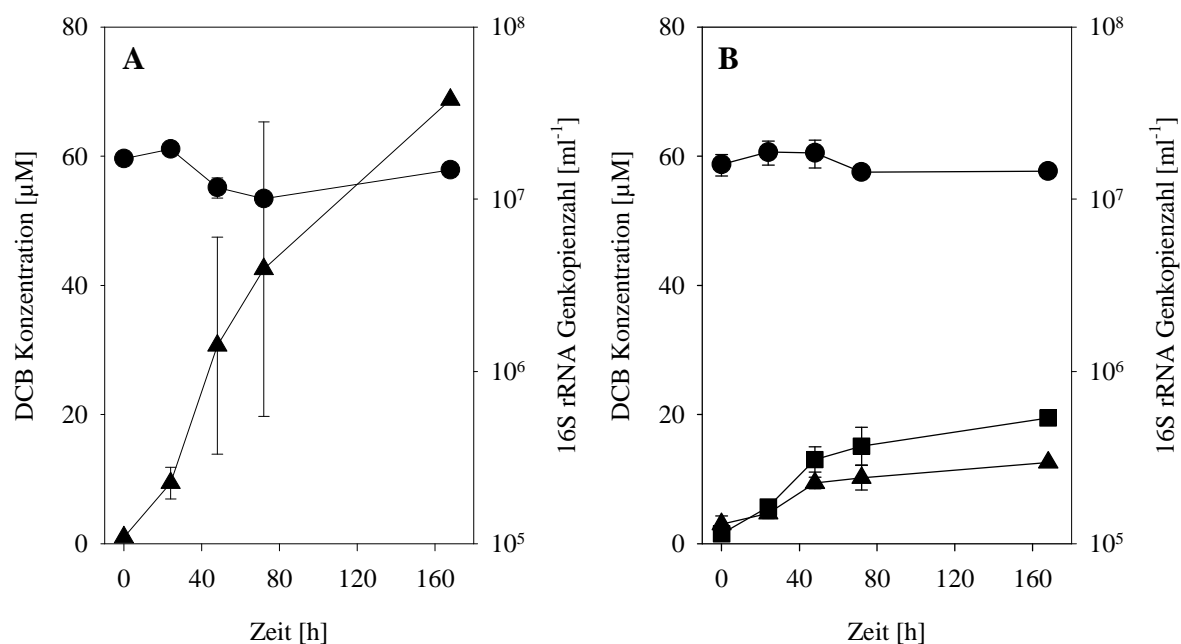
Anhang 5. T-RFLP Profile nach Restriktion von Amplifikaten von *rdhA* Genen, die mit DNA aus den Stamm DCMB5-haltigen Mischkulturen und den angegebenen Primerpaaren (rechts), die PCR-Produkte bis einer Größe von maximal 650 bp ergaben. Die identifizierten *rdhA* Gene des Stammes DCMB5 sind neben den entsprechenden terminalen Fragmenten dargestellt. Die Ergebnisse, die mit den Primerpaaren cluster 4_f/a_r und cluster 4_f/b_r erzielt wurden, finden sich in Anhang 4. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind angegeben.



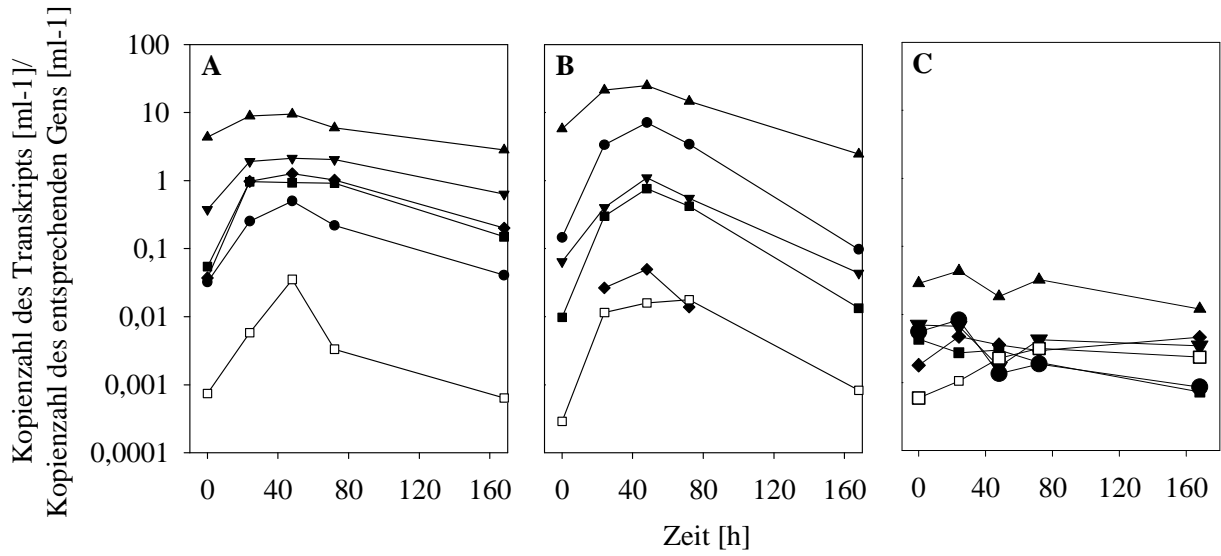
Anhang 6. Reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TrCB (A) und 1,2,4-TrCB (B) durch Stamm CBDB1. Die Dechlorierungsaktivität ist anhand der Produktbildung (1,3-DCB [\blacktriangle], 1,4-DCB [\blacksquare]) dargestellt. Die Kulturen wurden 10%ig mit Zellen beimpft, die in Zweiflüssigphasenkulturen mit 1,2,3-TrCB kultiviert wurden. Die Amplifikation der *rdhA* Transkripte erfolgte in diesem Versuch mit den Primerpaaren, die PCR-Produkte bis zu einer Länge von 1650 bp ergaben.



Anhang 7. Die zusammengefügte Abbildung zeigt Teile von 1%igen Agarose-Gelen beladen mit RT-PCR-Produkten, die mit den Primerpaaren amplifiziert wurden, die PCR-Produkte bis zu einer Länge von 1650 bp ergaben. Als *template* für die PCR dienten cDNAs aus Kulturen, die zum Zeitpunkt 0 mit 1,2,3-TrCB (A) oder 1,2,4-TrCB (B) versetzt wurden. Die Größe der PCR-Produkte wurde anhand eines DNA-Markers bestimmt und ist links neben den Gelausschnitten dargestellt. T-RFLP Analysen von PCR-Produkten, die zum Zeitpunkt 48 h nach Induktion amplifiziert wurden, ergaben die Transkription von 12 bzw. 13 *rdhA* Genen des Stammes CBDB1 in den Kulturvarianten mit 1,2,3- oder 1,2,4-TrCB (C).



Anhang 8. Reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TrCB (A) und 1,2,4-TrCB (B) durch Stamm CBDB1 und die Kopienzahl des 16S rRNA Gens (●). Die Dechlorierungsaktivität ist anhand der Produktbildung (1,3-DCB [▲], 1,4-DCB [■]) dargestellt. Die Kulturen wurden 10%ig mit Zellen beimpft, die in Zweiflüssigphasenkulturen mit 1,2,3-TrCB kultiviert wurden. Die Amplifikation der *rdhA* Transkripte erfolgte nach Präparation der RNA in einem RT-PCR Ansatz mit Primerpaaren, die Produkte bis zu einer Länge von 650 bp ergaben.



Anhang 9. Transkriptionsanalyse der *rdhA* Gene *cbrA* (▲), *cbdbA1624* (●), *cbdbA1453* (▼), *cbdbA1618* (■), *cbdbA187* (◆) und *cbdbA1588* (□) des Stammes CBDB1 in Gegenwart von 1,2,3-TrCB (A), 1,2,4-TrCB (B) und in der Acetonkontrolle (C). Die Kultur wurde 10%ig mit Zellen aus einer Zweiflüssigphasenkultur mit 1,2,3-TrCB beimpft.

Anhang 10. Absolute Peakflächen der t-RFs der *rdhA* Transkripte des Stammes CBDB1, die in RT-PCR t-RFLP Analysen detektiert wurden. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die 48 h mit 1,2,3-TrCB (A) oder 1,2,4-TrCB (B) inkubiert wurden (siehe Abb. 17). Die Vorkultivierung erfolgte mit 1,2,4-TrCB in Zweiflüssigphasenkulturen.

A

Cluster	<i>rdhA</i> Gen	MspI	RsaI	AluI	MboI	FnuDII	PstI
1a	<i>cbdbA1624</i>	73853	30307				
	<i>cbdbA1550</i>	40269	75756		82536		
	<i>cbdbA1453</i>	86262	86249				
	<i>cbdbA1570</i>	68111	36213				
	<i>cbdbA15595</i>				91005		
1b	<i>cbdbA1495</i>		543075				
	<i>cbdbA1508</i>		645651				
1c	<i>cbdbA1588</i>	74297					
	<i>cbdbA1582</i>	83794					
	<i>cbdbA96</i>	211944					
	<i>cbdbA1535</i>				228834		
1d	<i>cbdbA1546</i>		59524			94224	
	<i>cbdbA1578</i>		127036				
	<i>cbdbA1575</i>					420067	
2a_1	<i>cbrA</i>	146926		47725			
	<i>cbdbA1563</i>			24787	122589		
2a_2	<i>cbdbA1638</i>	428410	192501				
2a_3	<i>cbdbA1560</i>		109864				
	<i>cbdbA1627</i>			14671			
2b_1	<i>cbdbA1542</i>	331239	583179				
	<i>cbdbA1491</i>	101664	141039				
2b_2	<i>cbdbA1455</i>	68072	98071				
	<i>cbdbA238</i>	39073	79222				
2b_3	<i>cbdbA1618</i>		188160				
	<i>cbdbA1598</i>						733383
4a	<i>cbdbA1503</i>		240165				
	<i>cbdbA1092</i>		13223				
4b	<i>cbdbA1539</i>			365127			
	<i>cbdbA187</i>			405171			

B

Cluster	<i>rdhA</i> Gen	MspI	RsaI	AluI	MboI	FnuDII	PstI
1a	<i>cbdbA1624</i>	47778	16007				
	<i>cbdbA1550</i>	133510	115855		298319		
	<i>cbdbA1453</i>	135115	9964				
	<i>cbdbA1570</i>	143514	182304				
	<i>cbdbA15595</i>				243437		
1b	<i>cbdbA1495</i>		216392				
	<i>cbdbA1508</i>		80507				
1c	<i>cbdbA1588</i>	66161					
	<i>cbdbA1582</i>	97024					
	<i>cbdbA96</i>	184331					
	<i>cbdbA1535</i>				255332		
1d	<i>cbdbA1546</i>		2685			497	
	<i>cbdbA1578</i>		5785				
	<i>cbdbA1575</i>						13332
2a_1	<i>cbrA</i>	162639		23702			
	<i>cbdbA1563</i>			6638	84307		
2a_2	<i>cbdbA1638</i>	591416	212331				
2a_3	<i>cbdbA1560</i>		56840				
	<i>cbdbA1627</i>			6815			
2b_1	<i>cbdbA1542</i>	265443	197284				
	<i>cbdbA1491</i>	30635	15527				
2b_2	<i>cbdbA1455</i>	198826	36282				
	<i>cbdbA238</i>	18377	16203				
2b_3	<i>cbdbA1618</i>	118899					
	<i>cbdbA1598</i>						251923
4a	<i>cbdbA1503</i>		141224				
	<i>cbdbA1092</i>		2830				
4b	<i>cbdbA1539</i>			260785			
	<i>cbdbA187</i>			17687			

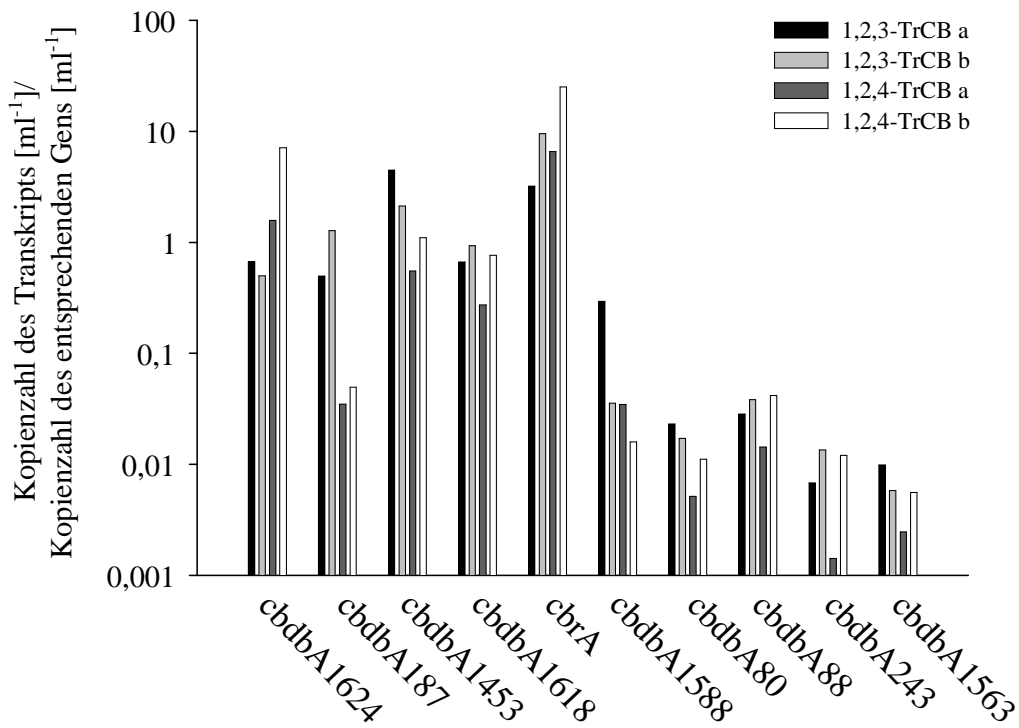
Anhang 11. Absolute Peakflächen der t-RFs der *rdhA* Transkripte des Stammes CBDB1, die in RT-PCR t-RFLP Analysen detektiert wurden. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die 48 h mit 1,2,3-TrCB (A) oder 1,2,4-TrCB (B) inkubiert wurden. Die Vorkultivierung erfolgte mit 1,2,3-TrCB in Zweiflüssigphasenkulturen.

A

Cluster	<i>rdhA</i> Gen	MspI	RsaI	AluI	MboI	FnuDII	PstI
1a	<i>cbdbA1624</i>		7213				
	<i>cbdbA1550</i>		35802		425224		
	<i>cbdbA1453</i>		20432				
	<i>cbdbA1570</i>		26321				
	<i>cbdbA15595</i>				17311		
1b	<i>cbdbA1495</i>		60429				
	<i>cbdbA1508</i>		9588				
1c	<i>cbdbA1588</i>	90672					
	<i>cbdbA1582</i>	62182					
	<i>cbdbA96</i>	367502					
	<i>cbdbA1535</i>				473994		
1d	<i>cbdbA1546</i>		1876			2250	
	<i>cbdbA1578</i>		3675				
	<i>cbdbA1575</i>					37360	
2a_1	<i>cbrA</i>		82131	30135			
	<i>cbdbA1563</i>			8019	61842		
2a_2	<i>cbdbA1638</i>	598199	630205				
2a_3	<i>cbdbA1560</i>		109905				
	<i>cbdbA1627</i>			34430			
2b_1	<i>cbdbA1542</i>	325915	439680				
	<i>cbdbA1491</i>	106824	115289				
2b_2	<i>cbdbA1455</i>	29520	106196				
	<i>cbdbA238</i>	19544	80834				
2b_3	<i>cbdbA1618</i>		136218				
	<i>cbdbA1598</i>						428482
4a	<i>cbdbA1503</i>		89208				
	<i>cbdbA1092</i>		n.d.				
4b	<i>cbdbA1539</i>		125735				
	<i>cbdbA187</i>		112988				

B

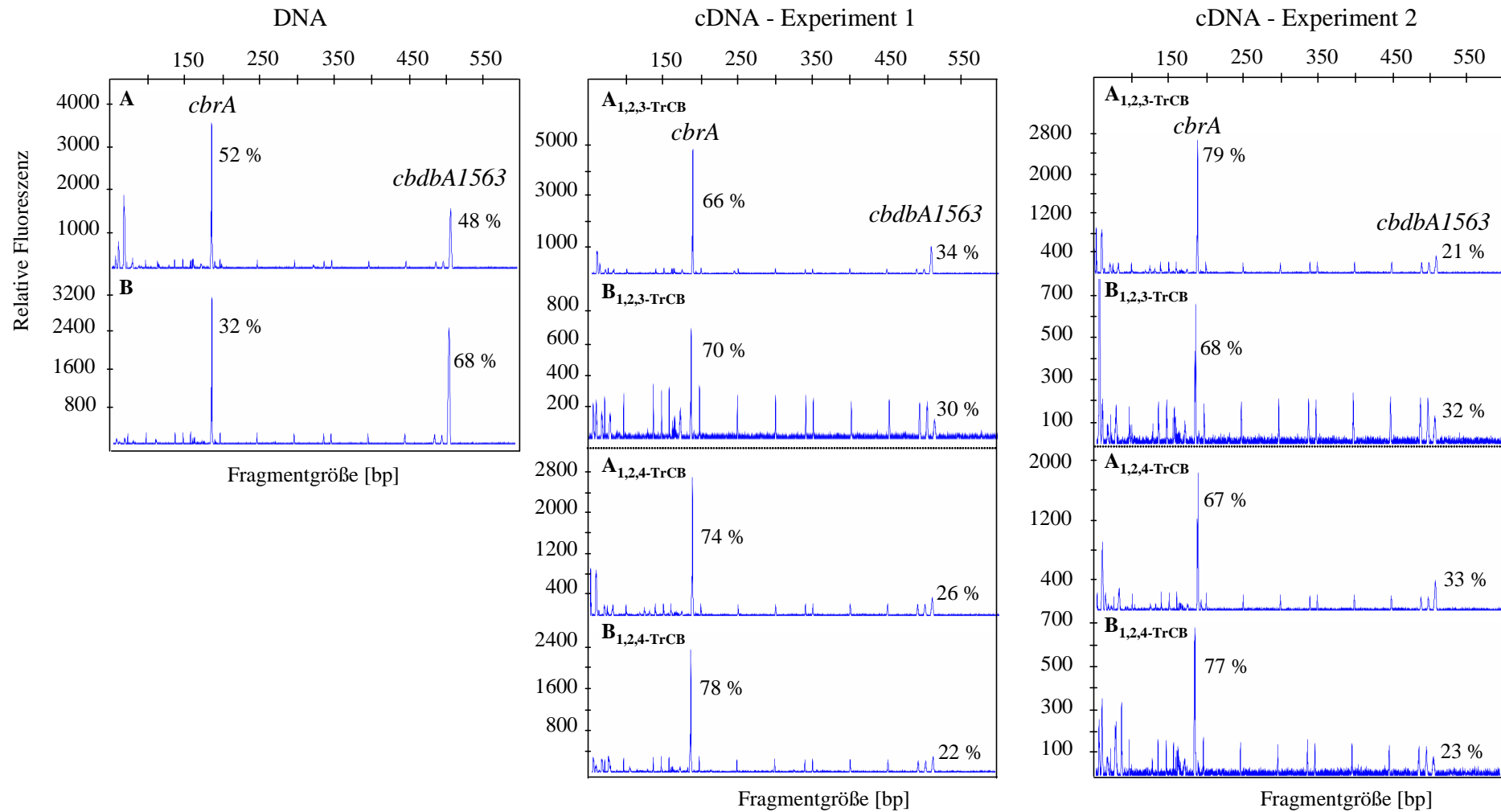
Cluster	<i>rdhA</i> Gen	MspI	RsaI	AluI	MboI	FnuDII	PstI
1a	<i>cbdbA1624</i>		30153				
	<i>cbdbA1550</i>		40234		316935		
	<i>cbdbA1453</i>		2686				
	<i>cbdbA1570</i>		17341				
	<i>cbdbA15595</i>				10602		
1b	<i>cbdbA1495</i>		60160				
	<i>cbdbA1508</i>		17107				
1c	<i>cbdbA1588</i>	92801					
	<i>cbdbA1582</i>	152795					
	<i>cbdbA96</i>	695735					
	<i>cbdbA1535</i>				455950		
1d	<i>cbdbA1546</i>		6560			6884	
	<i>cbdbA1578</i>		12443				
	<i>cbdbA1575</i>					89220	
2a_1	<i>cbrA</i>		23279	7453			
	<i>cbdbA1563</i>			2255	13115		
2a_2	<i>cbdbA1638</i>	386355	615918				
2a_3	<i>cbdbA1560</i>		50994				
	<i>cbdbA1627</i>			27513			
2b_1	<i>cbdbA1542</i>	30315	50761				
	<i>cbdbA1491</i>	4201	28315				
2b_2	<i>cbdbA1455</i>	7368	8013				
	<i>cbdbA238</i>	3365	648				
2b_3	<i>cbdbA1618</i>		38215				
	<i>cbdbA1598</i>						58745
4a	<i>cbdbA1503</i>		57399				
	<i>cbdbA1092</i>		n.d.				
4b	<i>cbdbA1539</i>		61251				
	<i>cbdbA187</i>		53814				



Anhang 12. Transkriptionsniveaus der 10 untersuchten *rdhA* Gene von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 48 h nach Induktion mit 1,2,3- oder 1,2,4-TrCB. Es sind die Daten zweier unabhängiger Versuche gezeigt. Die Vorkulturen wurden mit 1,2,4-TrCB (a) oder 1,2,3-TrCB (b) inkubiert.

Anhang 13. Absolute Peakflächen der t-RFs der 32 *rdhA* Gene des Stammes CBDB1, die in t-RFLP Analysen bestimmt wurden. Die Amplifikation der *rdhA* Gene erfolgte an genomischer DNA.

Cluster	<i>rdhA</i> Gen	MspI	RsaI	AluI	MboI	FnuDII	PstI
1a	<i>cbdbA1624</i>	64468					
	<i>cbdbA1550</i>	454484			352911		
	<i>cbdbA1453</i>	40347					
	<i>cbdbA1570</i>	806998					
	<i>cbdbA15595</i>				35509		
1b	<i>cbdbA1495</i>		135175				
	<i>cbdbA1508</i>		349328				
1c	<i>cbdbA1588</i>		94471				
	<i>cbdbA1582</i>		106546				
	<i>cbdbA96</i>		183660				
	<i>cbdbA1535</i>				26587		
1d	<i>cbdbA1546</i>		29084			27416	
	<i>cbdbA1578</i>		28636				
	<i>cbdbA1575</i>					163533	
2a_1	<i>cbrA</i>		190580	36808			
	<i>cbdbA1563</i>			33604	169095		
2a_2	<i>cbdbA1638</i>	460582	336368				
2a_3	<i>cbdbA1560</i>		238563				
	<i>cbdbA1627</i>			146616			
2b_1	<i>cbdbA1542</i>	631213	407613				
	<i>cbdbA1491</i>	348858	258351				
2b_2	<i>cbdbA1455</i>	133495					
	<i>cbdbA238</i>	204892					
2b_3	<i>cbdbA1618</i>		101134				
	<i>cbdbA1598</i>						296276
3	<i>cbdbA88</i>			158486			
	<i>cbdbA80</i>			32037			
	<i>cbdbA243</i>			226175			
4a	<i>cbdbA1503</i>		148692				
	<i>cbdbA1092</i>		25367				
4b	<i>cbdbA1539</i>			90902			
	<i>cbdbA187</i>			20178			



Anhang 14. T-RFLP Profile nach AluI-Verdau von PCR-Produkten, die mit dem Primerpaar cluster 2a_f/a-1r an Gesamt-DNA oder cDNA des Stammes CBDB1 amplifiziert wurden. Gezeigt sind die Ergebnisse von parallelen PCR-Reaktionen (A und B) an ein und derselben cDNA oder DNA und anschließendem Verdau. Die cDNA wurde an RNA synthetisiert, die aus Zellen isoliert wurde, die entweder mit 1,2,3-TrCB oder 1,2,4-TrCB kultiviert wurden. Die Vorkultivierung erfolgte auf 1,2,4-TrCB (Experiment 1) oder 1,2,3-TrCB (Experiment 2) in Zweiflüssigphasenkulturen. Die relativen Peakflächen der t-RFs der Gene *cbrA* und *cbdbA1563* sind angegeben.

Anhang 15. Absolute Peakflächen der t-RFs der *rdhA* Transkripte des Stammes CBDB1, die in RT-PCR t-RFLP Analysen detektiert wurden. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die entweder in zwei parallelen Kulturen 48 h mit 2,3-DCDD (A, B) oder ohne chlorierten Elektronenakzeptor (C) inkubiert wurden (Abb. 22 A, C). Die Vorkultivierung erfolgte mit 1,2,3-TrCB in Zweiflüssigphasenkulturen. n.D. nicht detektiert

Cluster	<i>rdhA</i> Gen	A						B						C						
		MspI	RsaI	AhI	MboI	FnuDII	PstI	MspI	RsaI	AhI	MboI	FnuDII	PstI	MspI	RsaI	AhI	MboI	FnuDII	PstI	
1a	<i>cbdbA1624</i>	29808						58083												17612
	<i>cbdbA1550</i>	222644			294536			42912			296040								56226	31105
	<i>cbdbA1453</i>	222847						253207											138138	
	<i>cbdbA1570</i>	237937						266939											161203	
	<i>cbdbA15595</i>				144071						162193									15819
1b	<i>cbdbA1495</i>		72038						60166										n.D.	
	<i>cbdbA1508</i>		52568						55868										n.D.	
1c	<i>cbdbA1588</i>	265562						266825											87950	
	<i>cbdbA1582</i>	217524						226440											30438	
	<i>cbdbA96</i>	206946						227216											3910	
	<i>cbdbA1535</i>				219426					215385										26587
1d	<i>cbdbA1546</i>		18767			13705		19594				30063							n.D.	n.D.
	<i>cbdbA1578</i>		36754					39888											n.D.	
	<i>cbdbA1575</i>					146097						111231								n.D.
2a_1	<i>cbvA</i>		155110						118581										n.D.	
	<i>cbdbA1563</i>				118215						128722									n.D.
2a_2	<i>cbdbA1638</i>	248590	125108					169637	155669										183048	148113
2a_3	<i>cbdbA1560</i>		157889						16852										1824	
	<i>cbdbA1627</i>				12563						6400									n.D.
2b_1	<i>cbdbA1542</i>	14785	125146					14602	213649										3457	12559
	<i>cbdbA1491</i>	10225	164486					10113	108927										n.D.	1683
2b_2	<i>cbdbA1455</i>	68072	98071					198826	36282										n.D.	n.D.
	<i>cbdbA238</i>	39073	79222					18377	16203										n.D.	n.D.
2b_3	<i>cbdbA1618</i>		26296						12720											n.D.
	<i>cbdbA1598</i>					191989						210119								16855
4a	<i>cbdbA1503</i>		76932						84719											n.D.
	<i>cbdbA1092</i>		3345						9587											n.D.
4b	<i>cbdbA1539</i>				75230						16327									n.D.
	<i>cbdbA187</i>				7186						8080									n.D.

Anhang 16. Absolute Peakflächen der t-RFs der *rdhA* Transkripte des Stammes CBDB1, die in RT-PCR t-RFLP Analysen detektiert wurden. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die entweder in zwei parallelen Kulturen mit 1,3-DCDD (A, B) oder ohne chlorierten Elektronenakzeptor (C) inkubiert wurden (Abb. 22 B, C). Die Vorkultivierung erfolgte mit 1,2,3-TrCB in Zweiflüssigphasenkulturen. n.d. nicht detektiert

Cluster	<i>rdhA</i> Gen	A						B						C						
		MspI	RsaI	Abl	MboI	FnuDII	PstI	MspI	RsaI	Abl	MboI	FnuDII	PstI	MspI	RsaI	Abl	MboI	FnuDII	PstI	
1a	<i>obdbA1624</i>	19950						27652												11869
	<i>obdbA1550</i>	211155			557428			294967			507428									190678
	<i>obdbA1453</i>	126988						112615												102733
	<i>obdbA1570</i>	40176						128234												93347
	<i>obdbA15595</i>				56919						77055									77594
1b	<i>obdbA1495</i>		31173					41639							4700					
	<i>obdbA1508</i>		37290					17630							2037					
1c	<i>obdbA1588</i>	8134						25860							85218					
	<i>obdbA1582</i>	254033						199341							380980					
	<i>obdbA96</i>	98615						41079							69451					
	<i>obdbA1535</i>				463936						379033						411470			
1d	<i>obdbA1546</i>		n.d.			n.d.			n.d.			n.d.			n.d.				n.d.	
	<i>obdbA1578</i>		13198						n.d.						n.d.					
	<i>obdbA1575</i>					11158					1403								4758	
2a_1	<i>obrA</i>		160437						136361						138150					
	<i>obdbA1563</i>				50791						32296								38272	
2a_2	<i>obdbA1638</i>	209003	237125					84551	148930					286064	314531					
2a_3	<i>obdbA1560</i>		95534						39631						73821					
	<i>obdbA1627</i>			n.d.						n.d.									n.d.	
2b_1	<i>obdbA1542</i>	n.d.	n.d.					n.d.	n.d.					n.d.	n.d.					
	<i>obdbA1491</i>	n.d.	n.d.					n.d.	n.d.					n.d.	n.d.					
2b_2	<i>obdbA1455</i>	4031	33220					3627	n.d.					8801	80216					
	<i>obdbA238</i>	n.d.						n.d.						6714						
2b_3	<i>obdbA1618</i>		114748						119854						93303					
	<i>obdbA1598</i>						511840					875641							709066	
4a	<i>obdbA1503</i>		20249						10478						12281					
	<i>obdbA1092</i>		n.d.						n.d.						n.d.					
4b	<i>obdbA1539</i>			n.d.						16539						32007				
	<i>obdbA187</i>			n.d.						6405						n.d.				

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen für die Vergabe des interessanten Themas, die stets vorhandene Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Dr. Ute Lechner danke ich für die beste Betreuung, die man sich nur vorstellen kann. Danke für ihre Hilfe, ihre Motivation, ihren unerschütterlichen Glauben an das Gelingen dieser Arbeit und dafür, dass sie es mir ermöglicht hat, einen weiteren Teil unserer großen weiten Welt zu sehen.

Bei Prof. Dr. Adrian bedanke ich mich für die Einladung in sein Labor, die Hilfe und Unterstützung vor Ort und die stets vorhandene Bereitschaft zur Diskussion. Dein Ideenreichtum ist wirklich beeindruckend.

Dr. Hauke Smidt gilt mein Dank für die Einladung nach Wageningen und die Hilfe bei der Durchführung der Gelretardationsexperimente.

Prof. Sawers danke ich für die guten Tipps im Zusammenhang mit den Arbeiten an meinem Regulator-Protein.

Dr. Basem Soboh gilt mein Dank für seine Unterstützung während der Gelfiltrationsexperimente.

Ich danke Dr. Sabine Kleinstauber für die Durchführung von t-RFLP Analysen.

Ute Lindenstrauß danke ich für die Einführung in die Arbeit mit Sequenziergelen.

Dr. Walter Durka danke ich für die Möglichkeit, t-RFLP Chromatogramme mit der GeneMapper Software am UFZ Halle nachzubearbeiten.

Dr. Conny Große danke ich für die guten Ideen im Zusammenhang mit den qPCR Analysen.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie für die Hilfe, die Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt dabei Claudia. Du hast mich nicht nur in fachlichen Fragen unterstützt, Du hattest stets auch ein offenes Ohr für meine Sorgen und Probleme und hast mich tröstend in den Arm genommen, wenn es nötig war.

Meinen Berliner Kollegen danke ich für die Unterstützung im Labor und das Drängen, meine Arbeit so schnell wie möglich fertig zu schreiben. Bernd danke ich dafür, dass er ist wie er ist, und dafür, dass er mir so oft neue CBDB1-Kulturen geschickt hat.

Ich danke dem Graduiertenkolleg 416 der DFG und der FEMS für die Finanzierung der Promotion durch Stipendien.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden. Ohne Euch wäre das Leben nur halb so schön. Besonders bedanken möchte ich mich hier bei Anja, Jana, Katja und Wenke. Ich bin sehr froh, Euch getroffen zu haben.

Am meisten danke ich aber meiner Familie. Ihr seid wirklich die allerbeste Familie der Welt. Ohne Eure Hilfe wäre ich nie so weit gekommen. Ihr habt mich in allen Lebenslagen gefördert, geliebt und unterstützt. Danke.

Lebenslauf

02.08.1980 Geburt in Bernburg

Schulbildung:

09/1987-07/1991 Grundschule „Humboldt“ in Bernburg

09/1991-07/1999 Gymnasium „Carolinum“ in Bernburg

07/1999 Abitur

Studium:

10/1999-10/2004 Studium der Biologie an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

02/2004-10/2004 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg mit dem Titel „Untersuchung der Struktur dioxindechlorierender Mischkulturen durch terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (t-RFLP) und Real-Time-PCR“ unter der Betreuung von Prof. Dr. J. R. Andreesen und Dr. PD U. Lechner

10/2004 Abschluss des Diploms im Fach Biologie

10/2004-07/2008 Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg unter der Betreuung von Prof. Dr. J. R. Andreesen und Dr. PD U. Lechner

10/2004-09/2007 Stipendium des Graduiertenkollegs 416 der DFG

12/2005-04/2006 Forschungsaufenthalt an der TU Berlin, Institut für Biotechnologie, bei Prof. Dr. Lorenz Adrian

10/2007-02/2008 Stipendium der FEMS; Forschungsaufenthalt an der Universität Wageningen (Niederlande), Institut für Mikrobiologie, bei Prof. Dr. Hauke Smidt

ab 08/2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TU Berlin, Insitut für Biotechnologie, bei Prof. Dr. Lorenz Adrian

Biendorf, den 03.01. 2009

Anke Wagner

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich anderen Werken entnommen sind, als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit wurde keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Biendorf, den 03.01.2009

Anke Wagner