

Abschlussbericht zu 3.2 BNBest-BMBF 98

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger:

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU)

Förderkennzeichen:

161B0867F

Vorhabenbezeichnung:

Meeresplastik als Quelle für neue und innovative biotechnologische Strategien (PLASTISEA)

Laufzeit des Vorhabens:

01.02.2020-31.01.2023; Verlängerungszeitraum bis 31.08.2023.

Berichtszeitraum:

01.02.2020-31.08.2023

I. Kurze Darstellung der Ergebnisse

1. Aufgabenstellung

Plastikverschmutzung ist zu einem der größten Umweltprobleme der Welt geworden. Die weltweite Produktion von erdölbasierten Polymeren erreicht jedes Jahr neue Rekorde, während die Recyclingraten immer noch unzureichend sind. Daher wird ein Teil des Plastikmülls in Verbrennungsanlagen entsorgt oder auf Deponien gelagert. Von dort gelangt ein Teil der Polymere als Makro-, Mikro- und Nanoplastik in die Umwelt und schadet den Ökosystemen und ihren Lebewesen. Es wird beispielsweise geschätzt, dass bis zum Jahr 2050 mehr Plastikpartikel in den Ozeanen vorkommen als lebende Tiere. Um das Problem der zunehmenden Verschmutzung der Umwelt und insbesondere der Weltmeere durch Nano- und Mikroplastik (NPs und MPs) anzugehen, vereinte das PLASTISEA-Konsortium daher die Expertise im Metagenom- und Proteinengineering mit den Ressourcen der AWI- und GEOMAR-Forschungszentren.

Das Projekt PLASTISEA wurde in 9 Arbeitspakete (AP) gegliedert, wovon insbesondere AP1 (Erkundung der marinen Biodiversität zur Bereitstellung von plastikabbauenden Enzymen und Mikroorganismen) und AP 2 (Aufbau einer Plastizyme-Werkzeugsammlung funktionaler Enzyme) von der CAU bearbeitet wurden.

Im Rahmen des Projekts lieferte die CAU neuartige und verbesserte Enzyme (Plastizyme) und Mikroorganismen (*plastibugs*) zur beschleunigten Zersetzung synthetischer Polymere (PET, PU, PE und PA). Die potentiell plastik-abbauenden Enzyme wurden mittels *in silico*-Durchmusterung mit Hilfe eines Hidden Markov Model Motivs für PET-Esterasen (PETasen) in Genomen und Metagenomen weltweit gefunden. Um diese Enzyme im Labor im größeren Maßstab verfügbar zu machen, wurden verschiedene bakterielle und archaeelle *in vivo* und *in vitro* Expressionssysteme erfolgreich implementiert, die Proteine aufgereinigt und charakterisiert. Des Weiteren wurden an der CAU diverse Anreicherungskulturen untersucht. Dabei wurden zwei interessante Stämme entdeckt, die auf diversen synthetischen Polymeren haften und sie möglicherweise degradieren können. Die Genome dieser Isolate wurden

sequenziert und ebenfalls mittels *in silico*-Durchmusterung nach PETasen durchsucht. Die Treffer wurden ebenfalls in ein Expressionssystem kloniert. Die vollständige Charakterisierung dieser Kandidaten steht noch aus. Zusammenfassend führte die Erkundung der marinen mikrobiellen Vielfalt in Kooperation mit den Projektpartnern zur Identifizierung und Charakterisierung von über 200 polymerabbauenden Enzymen, wodurch die umfangreichste Sammlung nicht-nativer Polymer-aktiver Biokatalysatoren entstand.

2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Seit Jahrzehnten sammeln sich Nano- und Mikroplastikpartikel (NPs und MPs) in der marinen Umwelt an. Im großen pazifischen Müllstrudel haben sich bisher mehr als 1,8 Billionen Plastikstücke mit einem geschätzten Gewicht von 80.000 Tonnen angesammelt; Tendenz steigend. Durch die große Menge an NPs und MPs sind menschengemachte Polymere mittlerweile in unserer Nahrungskette präsent, was schädlich sein kann. Die Entfernung von (Mikro-) Plastik aus der marinen Umwelt und die Verringerung der Mikroplastikverschmutzung sind daher dringliche Herausforderungen. Marines Plastik ist jedoch sehr stabil und langlebig, sodass PET-Flaschen mehrere Jahre im Ozean verbleiben, bevor sie sich zersetzen. Die abiotische "Verwitterung" durch UV-Licht, Scherkräfte und Temperaturschwankungen ist die Hauptkraft für die anfängliche Zersetzung von Plastik in kleinere Partikel. Bakterien und Pilze sind biotische Faktoren und können möglicherweise einen Teil zum Plastikabbau beitragen. Bisher waren einige Arten bekannt, die PET abbauen können, wobei die enzymatischen Prozesse des PET-Abbaus nur in Ansätzen verstanden wurde. Über den mikrobiellen Abbau anderer synthetischer Polymere wie PU, PE und PA war bisher noch weniger bekannt. Um Konzepte zur Entfernung von marinem Plastik voranzutreiben, sind Enzyme für alle bedeutenden Polymere bei natürlichen marinen Temperaturen erforderlich. Daher ist das Potenzial für den mikrobiellen Plastikabbau sehr vielversprechend.

Das PLASTISEA-Konsortium hatte bereits wertvolle Beiträge zur Plastikdegradation geleistet und verfügt über Werkzeuge und Technologien für die geplanten Vorhaben. Die CAU konnte die Sammlung der PET-Esterasen durch ihre Expertise im Bereich der Archaeen um einige Enzyme dieser Domäne erweitern und konnte so die erste archaeelle PETase publizieren. Die Partner des Projekts haben umfangreiche Erfahrung in funktioneller Metagenomik und der Bereitstellung aktiver Enzyme. Zudem wurde ein nützliches Hidden-Markov-Modell-Motiv zur Identifizierung von PET-Esterasen in Metagenomen entwickelt. Zusammen verfügte das Konsortium bereits über die größte Sammlung an PET- und PU-aktiven Enzymen.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt PLASTISEA wurde zunächst auf eine Laufzeit von 36 Monaten vom 01.02.20 bis zum 31.01.2023 ausgelegt. Anschließend folgte eine kostenneutrale Verlängerung bis zum 31.08.2023, welche maßgeblich durch Verzögerungen aufgrund der Corona Pandemie zu begründen ist.

Abschlussbericht zu 3.2 BNBest-BMBF 98

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger:

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU)

Förderkennzeichen:

161B0867F

Vorhabenbezeichnung:

Meeresplastik als Quelle für neue und innovative biotechnologische Strategien (PLASTISEA)

Laufzeit des Vorhabens:

01.02.2020-31.01.2023; Verlängerungszeitraum bis 31.08.2023.

Berichtszeitraum:

01.02.2020-31.08.2023

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,

Die Christian-Albrecht-Universität zu Kiel war im Rahmen des PLASTISEA Projekts an der Bearbeitung der Arbeitspakte AP1 und AP2 als beitragender Partner sowie z.T. AP6 involviert, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

AP 1: Erkundung der marinen Biodiversität zur Bereitstellung von plastikabbauenden Enzymen und Mikroorganismen

1.) Zunächst sollte eine *in silico*-Durchmusterung nach neuartigen PET-Esterasen (PETasen) und Polyurethanasen (PURasen) aus der Domäne der Archaea in öffentlich verfügbaren Sequenzdatenbanken durchgeführt werden. Hierfür wurde ein in der AG Streit (Projektpartner UHH) entwickelter Algorithmus eingesetzt, der auf Hidden-Markov-Model (HMM) Suchen basiert. Damit ist es möglich, nach Aminosäuresequenzen zu suchen, die den bereits bekannten polymerabbauenden Enzymen ähneln. Für PET-abbauende Enzyme wurde ein bereits veröffentlichtes HMM (Danco *et al.* 2019, doi:10.1128/AEM.02773-17) benutzt, wodurch bereits erfolgreich bakterielle Enzyme vorhergesagt wurden. Hier wurde spezifisch nach Enzymsequenzen mit archaeeller Herkunft gefiltert, da diese bis jetzt noch nicht beschrieben wurden.

Die Suche in der archaeellen Sektion der NCBI-Datenbank ergab mehr als 500 Kandidaten. Um die große Anzahl an potenziellen Enzymen zu verringern, wurden anschließend weitere phylogenetischen Analysen durchgeführt. So wurde ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen Enzymen ausgewählt. Acht Kandidaten (PET45-PET52) wurden in Kooperation mit dem Projektpartner UHH im Expressionsvektor pET21a(+) synthetisiert und charakterisiert (s. AP 2)

Weiterhin wurde in der hauseigenen archaeellen Stammsammlung nach putativen PETasen gesucht. Diese Stammsammlung beinhaltet hauptsächlich Vertreter der *Methanosarcina* und *Methanoculleus* Genera, aber auch *Methanobrevibacter*, *Methanospaera*, *Thermococcus*, *Methanomassiliicoccus*, *Methanohalobium*, *Haloferax*, *Methanosaeta*, *Methanococcus* und *Archaeoglobus*. Insgesamt wurden alle 16 Stämme durchmustert, von denen ein sequenziertes Genom zur Verfügung stand. Acht potentielle PETasen wurden in den archaeellen Isolaten unserer Stammsammlung von Archaeen identifiziert (KAP1 bis KAP8). Um die besten Kandidaten zu identifizieren, wurden 3D-Modelle auf dem Robetta-Server berechnet und mit den bereits bekannten Enzymen bakteriellen Ursprungs verglichen. Wir suchten nach ähnlichen Aminosäuren an Positionen, die mit der PET-Bindung in Verbindung stehen, und verworfen Proteine mit großen Deckeldomänen, die das aktive Zentrum abdecken. Das Ergebnis waren KAP2, KAP7 und KAP8 als die besten Kandidaten (Abb. 1). Die archaeellen Enzyme stammen von *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanoculleus bourgensis* bzw. *Methanoculleus thermophilus*. Sie alle besitzen die katalytische Triade Asp-His-Ser und ähnliche Aminosäuren, die für die Bildung der aromatischen Klammer und des Oxyanion-Lochs verantwortlich sind, wie bei der IsPETase aus *Ideonella sakaiensis*. Die oben genannten Stämme, die die Gene der potentiellen PETasen enthalten, wurden kultiviert, um ausreichend genomische DNA zu erhalten. Die Gene wurden anschließend aus den Genomen mittels PCR amplifiziert, in einen passenden Vektor kloniert und charakterisiert (s. AP 2)



Abb. 1: Die Modellstrukturen von KAP2 (lila), KAP7 (rosa) und KAP8 (gelb) im Vergleich zur Kristallstruktur von IsPETase aus *Ideonella sakaiensis* (blau). Die konservierte katalytische Triade (Asp-His-Ser, links) ist für alle Proteine dargestellt. KAP2 hat zwar eine Deckelstruktur, aber sie ist deutlich kleiner als die von PET46.

Für die Suche nach PURasen wurden ähnlich wie bei den PETasen die Sequenzen der wenigen bekannten PUR-abbauenden Enzymen aligniert und damit ein HMM erstellt. Die Durchmusterung der archaeellen Fraktion der NCBI-Datenbank ergab mehr als 1.000 Kandidaten, wobei die meistens als Amidase annotiert sind. Die Anzahl konnte auf ungefähr 50 Enzymen verringert werden, die über 50 % Sequenzidentität gezeigt haben. Diese müssen noch kloniert werden.

Der Projektpartner Geomar lieferte uns etwa 3.000 MAGs, die aus Metagenomen des atlantischen und pazifischen Ozeans sowie aus dem TARA-Ozeanprojekt zusammengestellt

wurden. Die Suche und Identifizierung von offenen Leserahmen (ORFs) und die Annotation wurden an der CAU durchgeführt. Die Analyse führte zur Entdeckung von 8.725.954 Genen, von denen 8.637.875 proteincodierende DNA-Sequenzen (CDS) waren. Diese wurden bioinformatisch auf das Vorhandensein von potentiellen PET-Esterasen und PUR-Esterasen und -Amidasen untersucht, indem die von AG Streit entwickelten HMMs verwendet wurden. Die Suche ergab 64 putative PET-Esterasen, 7.529 PUR-Amidasen und 96 PUR-Esterasen mit einem Bitscore von mehr als 100. Alle Gen- und Proteinsequenzen wurden an den Partner Geomar übergeben, um die interessanten Treffer zu charakterisieren (s. AP 2).

2.) Als eine weitere Strategie um neue Plastik-abbauende Enzyme zu entdecken wurden diverse Anreicherungsstrategien verwendet. Angereichert wurden dabei Mikroorganismen aus Umweltproben aus der Kieler Förde, der Hamburger Elbe sowie von Plastikpartikeln, die vom Projektpartner GEOMAR während der Sonne-Kreuzfahrt SO279 gesammelt wurden.

Aus den zahlreichen Anreicherungen auf Plastik-ähnlichen Substraten wie Bienenwachs, Paraffin und BHET konnten wir zwei äußerst interessante Mikrobenkonsortien (1872 und 2eJ) identifizieren, die ein großes Potenzial für den Abbau von Kunststoffen aufweisen. Wir haben diese Gemeinschaften mittels Next-Generation-Sequenzierung (NGS) sequenziert und Metagenom-assemblierte Genome (MAGs) höchster Qualität erstellt - 99 % vollständig oder mehr (s. Tab. 1). Die Probe 1872 bestand hauptsächlich aus zwei bakteriellen Arten der Gattung *Alcanivorax* und *Microbacterium*. Die Probe 2eJ enthielt hauptsächlich Bakterien der Gattungen *Alcanivorax*, *Marinobacter* und *Halomonas*. Wir konnten beide *Alcanivorax*-Arten isolieren und führten mehrere Analysen durch. Dazu gehörten Wachstums- und Anhaftungsexperimente auf verschiedenen Arten von Kunststoffen, Beobachtungen mittels konfokaler und Rasterelektronenmikroskopie sowie die Sequenzierung und Analyse des Genoms auf der Suche nach potentiellen Plastizymen.

Tabelle 1: Aus den angereicherten Proben 1872 und 2eJ konstruierte MAGs.

MAG	Genus	Comp. [%]	Cont. [%]	GC [%]	Size [Mbp]	# Contigs	Longest Contig [bp]	N50 [bp]	Mean Length [bp]	# genes
1872.1	<i>Alcanivorax</i> sp.	99.26	0.19	62	4.5	37	627,542	221,880	121,705	4,148
1872.2	<i>Microbacterium</i> sp.	98.99	0.63	68	3.8	67	277,782	94,672	56,132	3,659
2eJ.1	<i>Alcanivorax</i> sp.	100.00	0.56	62	4.7	93	408,285	88,522	50,077	4,328
2eJ.2	<i>Marinobacter</i> sp.	99.57	0.43	57	4.1	52	420,867	187,262	79,516	3,779
2eJ.3	<i>Halomonas</i> sp.	99.57	0.86	58	3.8	16	724,565	294,673	237,683	3,517

Wir untersuchten die erhaltenen MAGs und suchten gezielt nach PETasen und anderen Enzymen, die am Abbau von Polyolefinen (z. B. PE oder PP) beteiligt sein könnten, wie Alkan-1-Monooxygenasen (AlkBs) und Baeyer-Villiger Monooxygenasen (BVMOs). 14 Enzyme wurden ausgewählt und in den Expressionsvektor pET21a(+) kloniert. Die Charakterisierung dieser Enzyme steht noch aus.

Des Weiteren stellten wir fest, dass die Enzyme aus beiden Isolaten von *Alcanivorax* sp. sehr ähnlich waren. Wir verglichen beide Stämme auf genomicscher und Proteinebene und fanden heraus, dass beide Stämme hauptsächlich für die gleiche Anzahl und Art von Proteinen codierten. 1872 hatte dabei 17 und 2eJ 157 einzigartige Gene. Eine Betrachtung auf genomicscher Ebene bestätigte, dass die Isolate sich sehr ähneln, jedoch zwei unterschiedliche Stämme sind (s. Abb. 2).

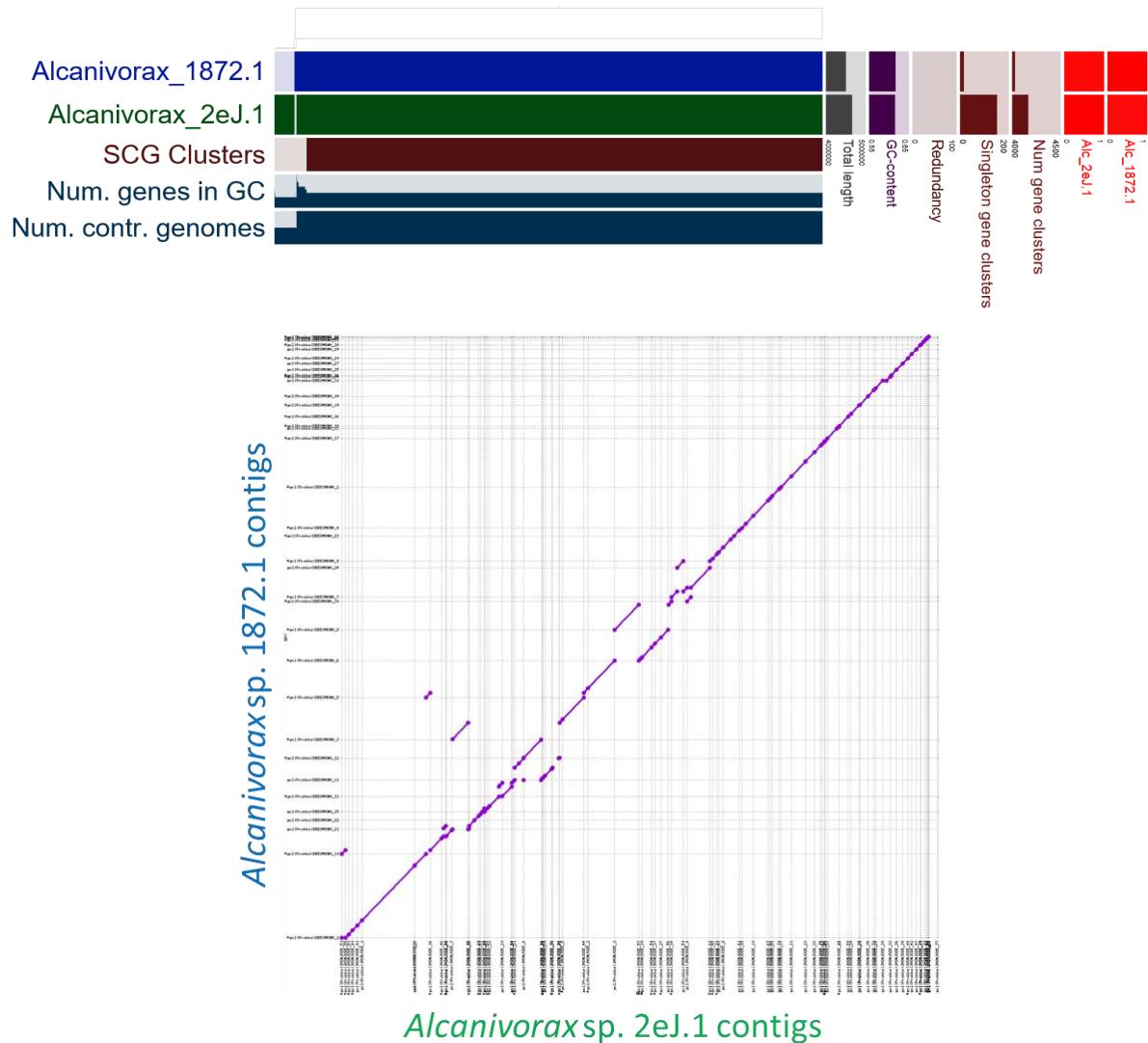


Abb. 2: Pangenomanaalyse auf Proteinebene (oben) und Genomvergleich auf DNA-Ebene (unten) der beiden *Alcanivorax*-Isolate.

Anschließend wurden Anhaftungsexperimente auf verschiedenen Arten von Kunststoffen durchgeführt. Die Inkubationen beider isolierten *Alcanivorax* sp. auf verschiedenen Arten von Kunststoff, einschließlich Epoxy, PA6, PE, PET, PP und PVC zeigten eine gute Fähigkeit beider Stämme, verschiedene Oberflächen zu besiedeln und ihre Vitalität aufrechtzuerhalten.

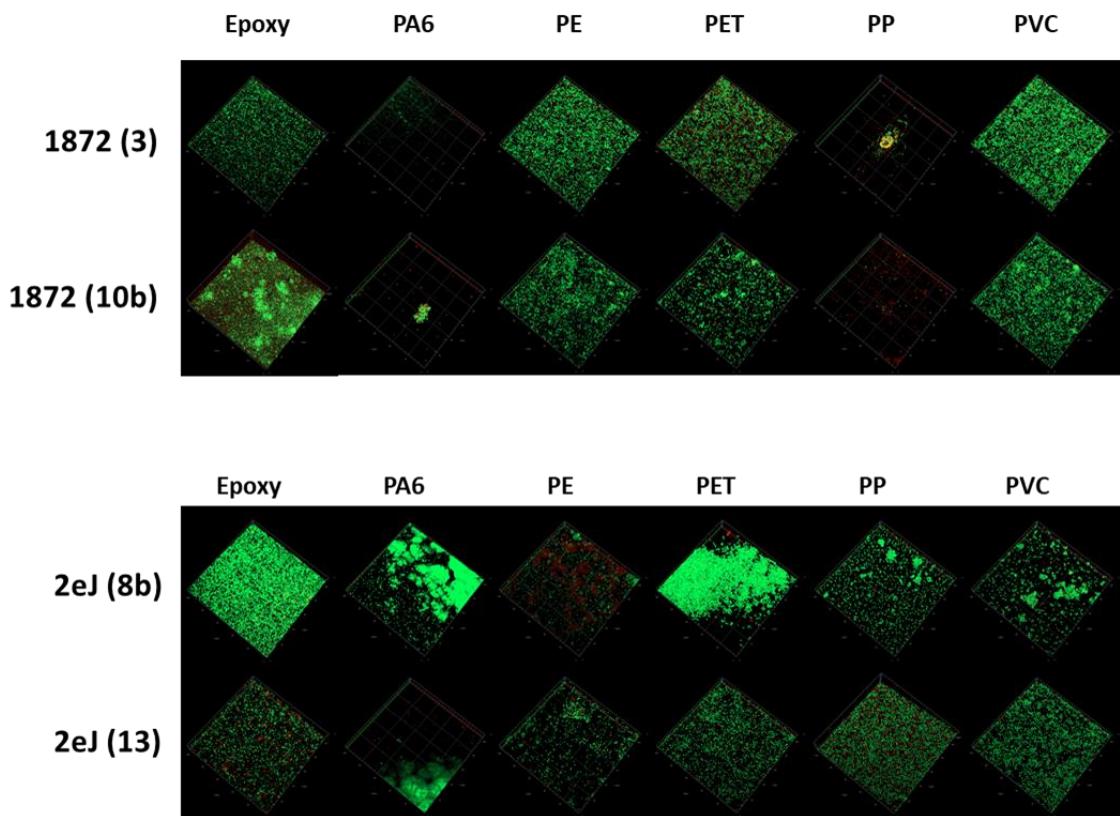


Abb. 3: Konfokalmikroskopische Analyse von *Alcanivorax*-Isolaten, die auf verschiedenen Polymeren gewachsen sind. LIVE/DEAD-Färbung.

In weiteren Untersuchungen haben wir *Alcanivorax* auf den zuvor verwendeten Kunststoffen unter Verwendung des Rasterelektronenmikroskops (REM) beobachtet. Die Ergebnisse waren ähnlich wie zuvor, jedoch bot das REM eine wesentlich bessere Auflösung. Während unserer Beobachtungen konnten wir Pili-Strukturen identifizieren, die von den Bakterien genutzt werden, um an der Oberfläche zu haften. Es ist anzunehmen, dass diese Strukturen eine wichtige Rolle bei der Kommunikation und dem Austausch von Nährstoffen zwischen den Bakterien spielen könnten. Dies stellt einen aufregenden Schritt in unseren Forschungen dar und eröffnet neue Einblicke in das Verständnis des Verhaltens von *Alcanivorax* auf verschiedenen Kunststoffoberflächen.

Des Weiteren wurden Langzeitinkubationen mit Polypen der Ohrenqualle (*Aurelia aurita*) durchgeführt. Bei den Polypen handelt es sich um das sessile Stadium im Lebenszyklus von *A. aurita*, welche im Laboralltag über viele Jahre in Tanks gehalten werden können, ohne dass sie ihren natürlichen Generationswechsel zum freischwimmenden Medusenstadium fortführen. Die Polypen wurden so für ein Jahr in Wassertanks zusammen mit PET oder BHET (Baustein von PET) inkubiert. Dabei wurde der Einfluss dieser Partikel auf den Habitus der Polypen beschrieben, die Zusammensetzung des Mikrobioms mittels 16S rDNA Sequenzierung analysiert und der Abbau der Substrate mittels UHPLC gemessen. Ein Tank mit unbehandelten nativen Polypen diente als Kontrolle. Hierfür wurden alle Parameter der Inkubationen optimiert und die Lebensfähigkeit der Polypen von *A. aurita* bei verschiedenen Plastik-/Substratkonzentrationen bestimmt. Anschließend wurde das Mikrobiom der Polypen isoliert und eine weitere Anreicherungskultur inkokuliert. Nach nur weniger Tagen war ein deutliches Wachstum erkennbar, woraufhin ein weiterer Stamm isoliert wurde. Dieser *Pseudomonas* Stamm zeigte ebenfalls interessante Eigenschaften in Wachstums- und Anhaftungsexperimente auf verschiedenen Arten von Kunststoffen und in Beobachtungen mittels konfokaler und Rasterelektronenmikroskopie. Daher soll auch hier eine Genomsequenzierung durchgeführt und nach potentiellen Plastizymen gesucht werden.

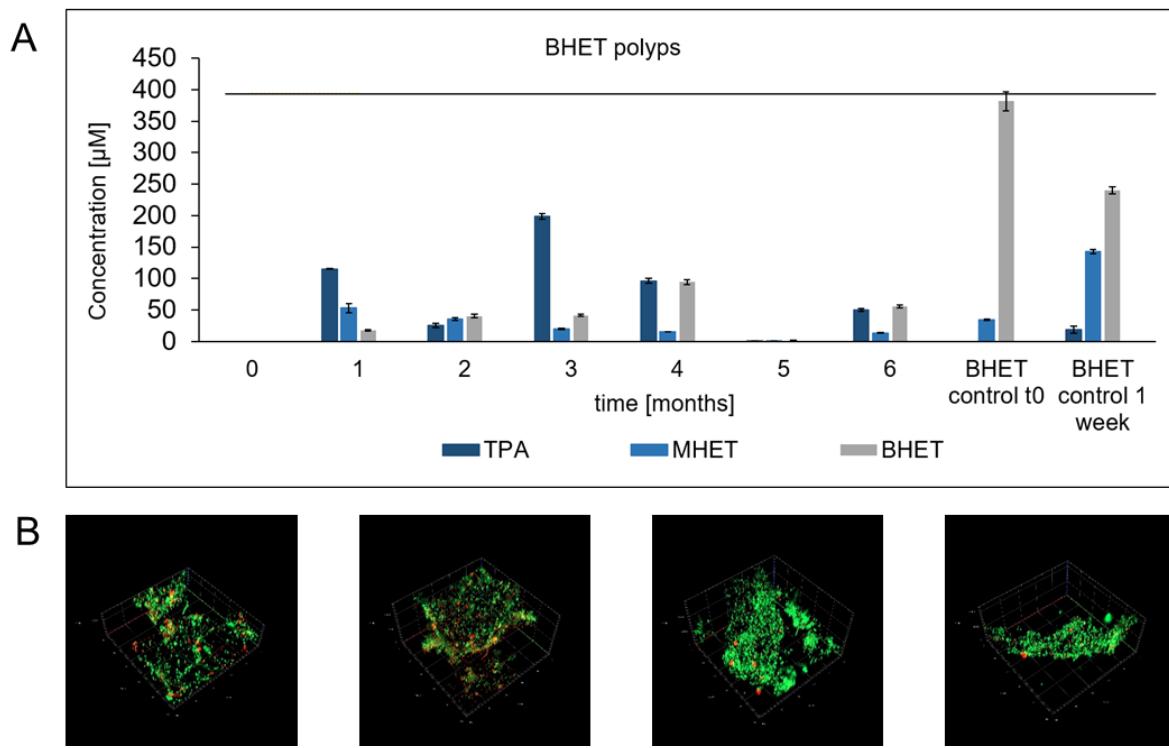


Abb. 4: Konzentration von TPA, MHET und BHET in dem mit BHET gefütterten Polypentank über einen Zeitraum von sechs Monaten (A). Die LIVE/DEAD-Färbung von PET-Partikeln aus dem PET-gefütterten Polypentank zeigt die Besiedlung aller Oberflächen durch lebensfähige Zellen (B).

AP 2: Aufbau einer Plastizyme-Werkzeugsammlung funktionaler Enzyme

In diesem Arbeitspaket wird der Schwerpunkt unserer Arbeit innerhalb des Projekts deutlich, denn unsere Expertise ermöglichte es uns, entscheidende Fortschritte im Bereich der PETasen aus Archaeen zu erzielen. Unser Hauptbeitrag konzentrierte sich darauf, nicht nur archaeale Enzyme zu liefern, sondern auch eine speziell auf diese Enzyme zugeschnittene Expressionsplattform für Archaeen zu etablieren. Dies war von entscheidender Bedeutung, da es uns gelungen ist, nicht nur das erste Enzym mit archaealem Ursprung zu liefern, sondern auch die Grundlage für weiterführende archaeale Forschung und Anwendungen zu schaffen. Die biochemische Charakterisierung der ersten archaealen PETase PET46 aus einem cand. Bathyarchaeota Archaeon wurde im Rahmen der Forschungsarbeit umfassend untersucht (Perez-Garcia *et al.*, 2023). Hinsichtlich der Temperatur zeigte sich, dass PET46 bei einer breiten Temperaturspanne aktiv war. Die höchste Aktivität wurde bei 70°C erreicht, während die Aktivität bei 90°C stark abnahm, wobei noch 10% der Aktivität nachweisbar waren. Die Thermostabilität des Enzyms wurde ebenfalls untersucht, wobei festgestellt wurde, dass PET46 bei 60°C über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen mehr als 60% seiner Aktivität beibehielt. Bei 70°C ging die Aktivität jedoch schneller verloren, wobei nach 2 Tagen bereits 80% der Aktivität abnahm. NanoDSF-Experimente ergaben eine Schmelztemperatur (Tm) von 84,55°C. Die pH-Abhängigkeit der Aktivität zeigte, dass PET46 in einem breiten pH-Bereich von 5 bis 8 aktiv war, wobei die optimale Aktivität bei pH 7 bis 8 erreicht wurde. Diese Ergebnisse legen nahe, dass PET46 gut an die Bedingungen im Guaymas-Becken, wo es isoliert wurde, angepasst ist. Darüber hinaus reagierte das Enzym positiv auf die Anwesenheit bestimmter Metallionen und zeigte eine bemerkenswerte Stabilität gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln und Detergenzien, was auf ein vielseitig einsetzbares Enzym hinweist. Diese umfassende Charakterisierung liefert wertvolle Einblicke in die Eigenschaften der ersten archaealen PETase PET46 und seine Eignung für verschiedene industrielle Anwendungen.

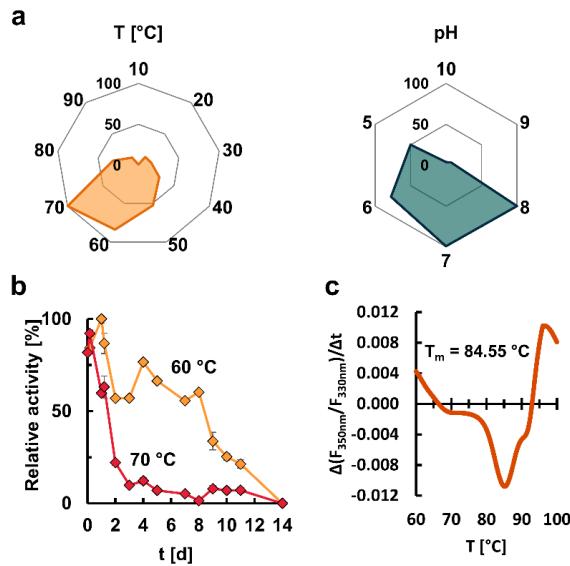


Abb. 5: PET46 ist eine thermostabile Hydrolase, die an die Bedingungen des Guaymas-Beckens angepasst ist. Die optimale Temperatur und der optimale pH-Wert des Enzyms wurden durch Inkubation mit pNP-Ester-Substraten (Decanoat, C10, a) bestimmt. Das Enzym behielt den größten Teil seiner Aktivität nach 8-tägiger Inkubation bei 60 °C, verlor aber nach zwei Tagen bei 70 °C fast 80 % seiner Aktivität (b). NanoDSF-Experimente zeigen, dass PET46 eine Schmelztemperatur (T_m) von 84,55 °C hat (c).

PET46 zeigte eine starke Hydrolyse-Aktivität von MHET und BHET, wobei die Aktivität auf diesen Substraten sogar leicht höher war als bei den Vergleichsenzymen IsPETase und der aus Kompost isolierten Cutinase LCC. Im Vergleich zu IsPETase und LCC erreichte PET46 ähnliche Aktivitäten bei der Degradation von kristallinem PET-Polymer.

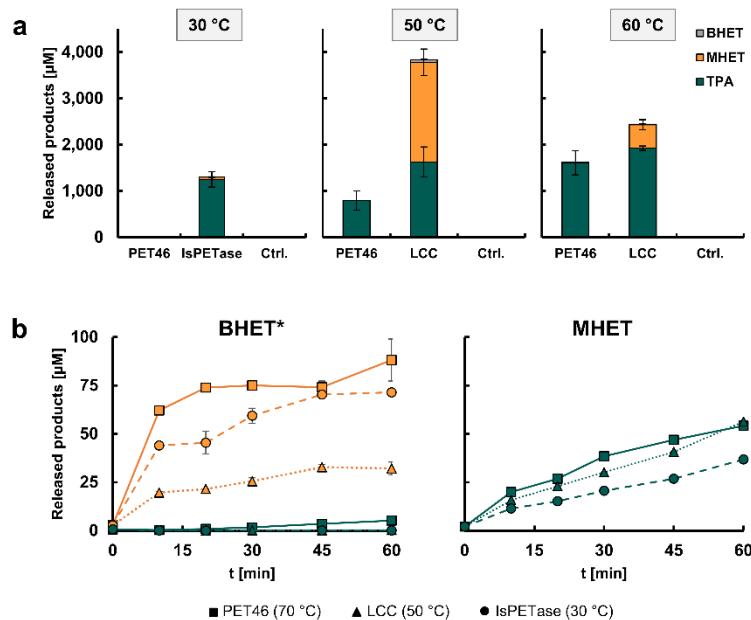
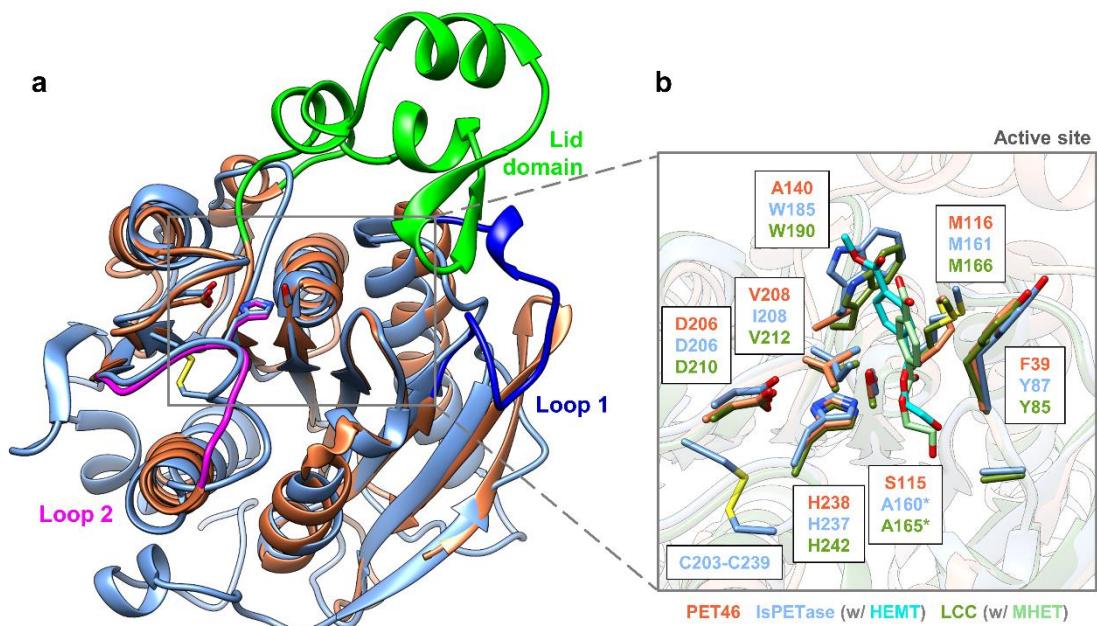


Abb. 6: PET46 baut PET-Polymer ab. Die Fähigkeit von PET46, PET abzubauen, wurde bei 60 °C getestet und mit der IsPETase und der LCC bei ihren jeweiligen Temperatuoptima (30 °C und 50 °C; a) verglichen. 3 μM PET46 (etwa 0,1 mg mL⁻¹) setzen nach 72 Stunden bei 60 °C bis zu 1,6 mM TPA aus 48 mM kristallinem PET-Pulver frei. PET46 ist beim Abbau der Zwischenprodukte BHET und MHET (150 mM) bei ihren jeweiligen optimalen Temperaturen effektiver als IsPETase und LCC (b). Die Farbpalette wird von "a" und "b" geteilt. Die Produktfreisetzung im Zusammenhang mit der Autohydrolyse bei den verschiedenen Temperaturen wurde zu

jedem Zeitpunkt subtrahiert. Die Enzymkonzentrationen wurden für alle untersuchten Enzyme in jedem Experiment gleich gehalten.

Die Kristallisation des Proteins PET46 spielte eine wichtige Rolle in der Erforschung seiner Struktur und seiner Aktivitäten. Die Struktur des PET46-Proteins gehört zur α/β -Hydrolase-Superfamilie und besteht aus acht β -Strängen, die über sieben α -Helices verbunden sind. Eine weitere Domäne, die als Deckel fungiert und aus drei α -Helices und zwei antiparallelen β -Strängen besteht, wurde ebenfalls identifiziert. Das aktive Zentrum von PET46 setzt sich aus den katalytischen Aminosäuren Asp206, His238 und Ser115 zusammen. Diese Struktur weist Ähnlichkeiten mit den Enzymen IsPETase und LCC auf. Allerdings wurde festgestellt, dass PET46 in einigen Bereichen, wie dem Bereich um das aktive Zentrum und der Deckel-Domäne, Unterschiede aufweist. Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass PET46 wahrscheinlich ein anderes Substratbindungsmuster aufweist. Es wurde auch eine Variante von PET46 erstellt, bei der ein Abschnitt aus IsPETase in PET46 eingefügt wurde. Dadurch konnte gezeigt werden, dass dieser Abschnitt, der in der Bildung einer aromatischen Klemme involviert ist, in PET46 fehlt und daher eine andere Substratbindung ermöglicht.



Die Vergleichsanalyse von PET46 mit anderen Enzymen, insbesondere Feruloyl-Esterasen (FAEs) und PETasen, hat wichtige Erkenntnisse geliefert. PET46 zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu FAEs, die normalerweise Esterverbindungen von aromatischen Säuren, wie sie in Lignin vorkommen, spalten. Dies ist interessant, da es auf eine neuartige Enzymfamilie hinweist, die in der Lage ist, PET aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu natürlichen Substraten wie Lignin zu hydrolysieren. Vor dieser Forschungsarbeit war nicht bekannt, dass

es Enzyme mit der Fähigkeit zur PET-Hydrolyse in der Natur gibt. Im Vergleich mit anderen PETasen, die hauptsächlich in Bakterien vorkommen, zeigt PET46 sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede. Die strukturellen Gemeinsamkeiten zu FAEs legen nahe, dass PET46 in der Lage ist, PET aufgrund seiner Ähnlichkeit Lignin zu hydrolysieren. Dies eröffnet neue Perspektiven für das Verständnis des Abbaus von PET in der Umwelt und könnte zur Entwicklung von Enzymen beitragen, die bei der Bewältigung des PET-Abfallproblems eine Rolle spielen. Die strukturellen Unterschiede von PET46 zu eukaryotischen PETasen weisen darauf hin, dass es sich um eine einzigartige Enzymklasse handelt. Diese Erkenntnis trägt dazu bei, das Verständnis des PET-Abbaus in der Natur zu erweitern und eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung umweltfreundlicher Abbaulösungen für PET-Abfälle. Dies ist ein wichtiger Schritt in Richtung nachhaltiger Umweltlösungen und trägt dazu bei, die Umweltauswirkungen von PET-Abfällen zu minimieren.

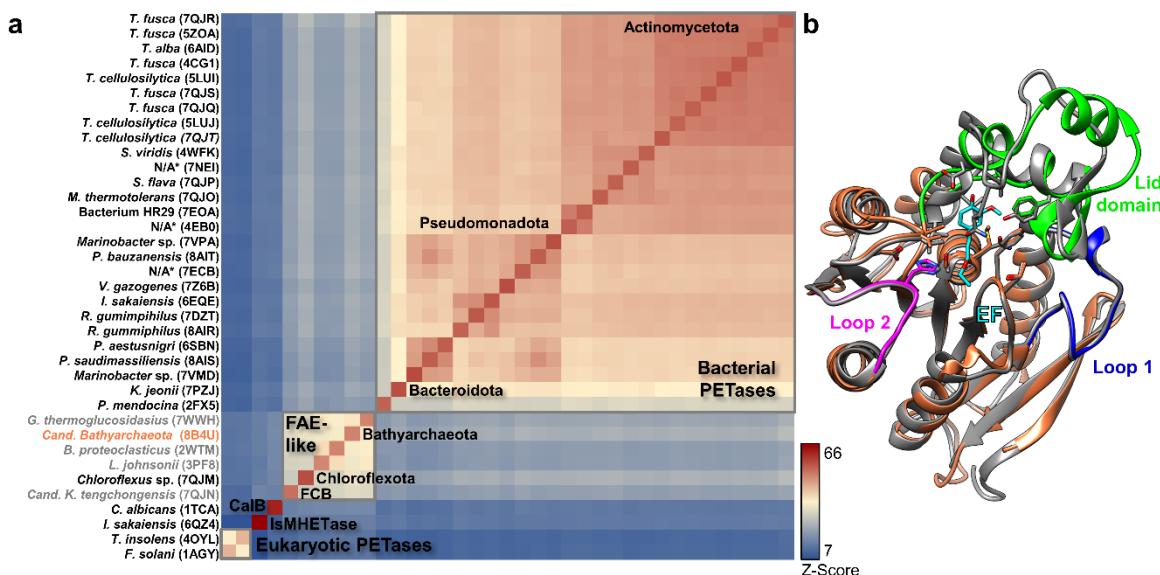


Abb. 8: Die Proteinstruktur der archaeellen PETase PET46 und der Ferulasäureesterasen (FAEs) ist eng mit bakteriellen PETasen verwandt. Eine Heatmap stellt die Strukturähnlichkeit (Z-Score87) dar und zeigt Strukturcluster. Der FAE-Cluster, zu dem auch PET46 (korallenorange) gehört, zeigt die größte Ähnlichkeit mit dem Cluster der bakteriellen PETasen. PET 46 ist die FAE mit der größten strukturellen Ähnlichkeit zu den bakteriellen PETasen. Enzyme, für die keine PET-Aktivität nachgewiesen wurde (z. B. FAEs), sind grau dargestellt. a. PET46 hat den größten Teil seiner Struktur mit FAEs gemeinsam. b. Die Struktur der archaeellen PETase (korallenorange) ist der Kristallstruktur der Cinnamoylesterase LJ0536 S106A-Mutante aus *Lactobacillus johnsonii* (dunkelgrau, PDB 3QM1) im Komplex mit Ethylferulat (EF, cyan) überlagert. Schleife 1 (dunkelblau) und Schleife 2 (magenta) sind hoch konserviert, aber es gibt einige Variationen in der Deckel-Domäne (hellgrün). Ein Tyr in der Schleife von LJ0536, das an der Substratbindung beteiligt ist, hat ein homologes Phe in PET46 (hellgrün). *Keine offensichtliche phylogenetische Zugehörigkeit.

Eine hohe Aktivität gegenüber den PET-Depolymerisations-Zwischenprodukten BHET und MHET ist eine erwünschte Eigenschaft für die Anwendung in einem industriellen Prozess, bei dem die weitere Hydrolyse dieser Verbindungen zu den Endmonomeren TPA und EG derzeit die Gesamtprozesszeit verdoppelt, was auch den Energieverbrauch stark erhöht (Prof. Dr. Alain Marty, CSO von Carbios). Wir konnten eine höhere Aktivität von PET46 gegenüber diesen Zwischenprodukten im Vergleich zu den am meisten untersuchten und verwendeten Enzymen IsPETase und LCC nachweisen. Daher haben wir uns gefragt, ob wir diese Aktivität noch weiter steigern können. Um dies zu erreichen, erstellten wir eine Mutantenbibliothek durch zufällige Mutagenese des Wildtyp-Enzyms mittels einer *error prone* PCR. Dazu fügten wir dem Reaktionsgemisch 20 µM MnCl₂ zu, was die Fehlerrate der Taq-DNA-Polymerase stark erhöht. Nach Ligation in einen Vektor und Transformation in *Escherichia coli* CodonPlus

(DE3)-RIL erhielten wir insgesamt 949 putative Varianten von PET46. Wir sequenzierten 12 von ihnen nach dem Zufallsprinzip und schätzten eine Mutationsrate von $3,2 \times 10^{-3}$ pro Base. Wir untersuchten die Aktivität der Bibliotheksklone *in vivo* auf LB-Agarplatten mit BHET. Insgesamt 558 Transformanten (58 %) zeigten Aktivität, was durch einen deutlichen Hydrolysehof um die Kolonie angezeigt wurde. Davon zeigten 291 (31 %) eine geringe, 233 (25 %) eine mittlere und 34 (4 %) eine hohe Aktivität. Die sechs leistungsfähigsten Transformanten wurden für weitere Analysen ausgewählt. Die Expression im kleinen Maßstab zielte auf die Produktion von Proteinen zur weiteren Charakterisierung ab. Bei drei von ihnen beobachteten wir hohe Zielproteinkonzentrationen, während die andere Hälfte in geringen Mengen produziert wurde. Wir untersuchten die gereinigten Enzyme auf BHET-haltigen Platten und bestätigten, dass die Mutante 3 über den gesamten untersuchten Temperaturbereich die höchste Aktivität aufwies. Wir modellierten die 3D-Struktur der Mutanten und bestätigten, dass die Mutante 3 die einzige mit einer Mutation innerhalb der aktiven Tasche war, die den Hohlraum vergrößerte. Diese Mutation könnte den Zugang und die Zugänglichkeit des Substrats zur katalytischen Stelle erleichtern.

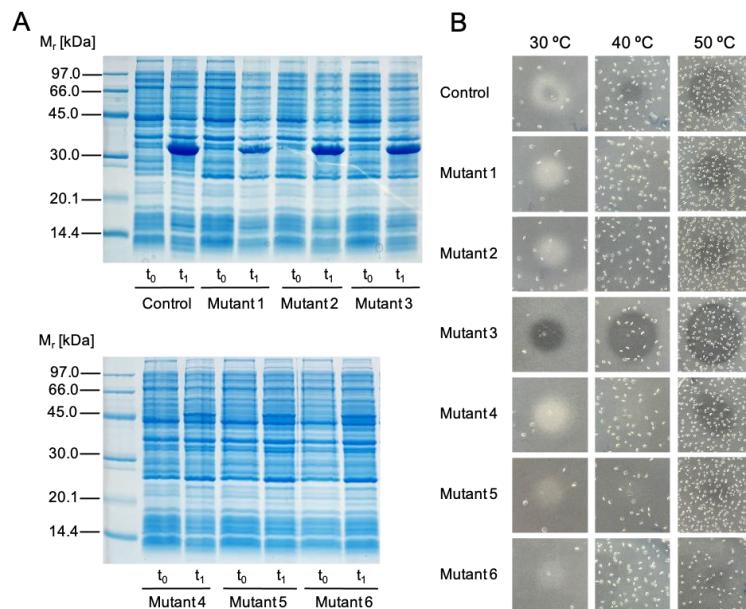


Abb. 9: Expression von sechs PET46-Mutanten (A) und Aktivität auf BHET-Platten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (B). Die stärkste Bande entspricht das rekombinant produzierte Protein.

Im Rahmen der strukturellen Analyse der archaeellen PETase-Kandidaten KAP1-KAP8 wurde festgestellt, dass KAP7 und KAP8 am wahrscheinlichsten über die gewünschte Aktivität verfügen (s. AP 1). Da sie aus Archaeen stammen und nicht für die Expression in Bakterien codonoptimiert sind, wurde das Archaeon *Methanosarcina mazei* als Expressionswirt ausgewählt. Ein Shuttle-Vektor war zwar vorhanden, erwies sich jedoch als sehr groß und schwer zu handhaben. Zudem waren viele Bereiche der DNA nicht vollständig verstanden. Daher wurde daran gearbeitet, diesen Vektor zu verkleinern, wodurch seine Größe von fast 9 kb auf weniger als 6 kb reduziert werden konnte, ohne dabei Funktionen zu verlieren - eine Reduktion um 35 %. Zusätzlich wurde eine Multiple Cloning Site mit 27 Schnittstellen hinzugefügt, um das Klonieren zu erleichtern.

Die archaeelle gDNA wurde aus *Methanoculleus bourgensis* und *M. thermophilus* isoliert, die Gene für KAP7 und KAP8 amplifiziert und mithilfe von *E. coli*-Zellen in den Vektor kloniert. Später erfolgte die Transformation von *M. mazei*-Zellen. Die Expression der Gene im archaeellen Wirt führte zu einer erfolgreichen Produktion von KAP7, welches noch genauer charakterisiert werden soll. Leider konnte KAP8 bisher nicht hergestellt werden.

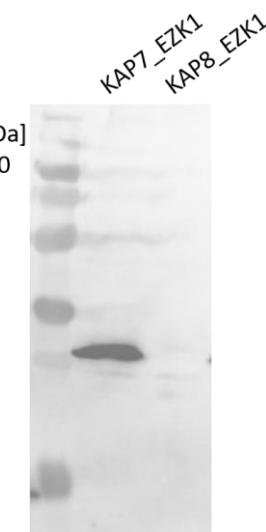


Abb. 10: Die Expression von KAP7 in dem Archaeon *M. mazei* konnte mittels Westernblot nachgewiesen werden (links).

AP 6: Management und Öffentlichkeitsarbeit

Öffentlichkeitsarbeiten erfolgten auf verschiedenen renommierten Veranstaltungen und die Ergebnisse wurden in hochangesehenen wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht. Des Weiteren fanden Medienberichterstattungen und Auftritte in TV, Radio und Nachrichtensendungen statt:

- Science Café MINT Schule – Hamburg 2022: Vortrag über Bakterien und Plastikabbau für Schüler aus verschiedenen Schulen, die überdurchschnittlich vielfältige, praxisnahe Unterrichtsangebote in den Fächern Mathematik, Informatik, Naturwissenschaften und Technik anbieten.
- VAAM 2021 – Düsseldorf/online 2022: Poster „Searching for new plastic-degrading enzymes, bacteria and microbial consortia“. Die Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie ist einem der führenden wissenschaftlichen Foren für Mikrobiologie und Biotechnologie in Deutschland.
- 11th International Congress of Biocatalysis/Biocat 2022 – Hamburg 2022: Vortrag „PETzyme: a novel toolbox of microbial PET-degrading enzymes“.
- 1st World PET Recycling Summit (organisiert von Carbios) – Paris 2022: Poster „PETzyme - a novel toolbox of microbial PET-degrading enzymes“. Carbios ist das erste und einzige Unternehmen, welches PET industriell mit Hilfe von Enzymen abbaut.
- 5th European Summer School on Industrial Biotechnology/ESSIB 2023: Vorlesungen „An *in vitro* and reporter strain coupled pipeline for the discovery of plastic-degrading enzymes“ und „Interbacterial relationships: From biofilms to jellyfish“.

Die Forschungsarbeit zu PET46 wurde im Journal Communications Chemistry veröffentlicht und erzielte eine hohe Aufmerksamkeit. Die Publikation erreichte den 99. Perzentil-Rang (Platz 2.503 von 278.117) unter Artikeln ähnlichen Alters in allen wissenschaftlichen

Zeitschriften und den 98. Perzentil-Rang (Platz 2 von 60) unter Artikeln ähnlichen Alters in "Communications Chemistry": <https://www.nature.com/articles/s42004-023-00998-z/metrics>

Eine Pressemitteilung (<https://www.uni-kiel.de/de/detailansicht/news/227-pet46-enzym-plastikabbau>) hat der Veröffentlichung eine erhebliche mediale Resonanz gegeben, unter anderen in einer Reihe von Verbreitungartikeln, die in verschiedenen Medien (z.T. auch in anderen Sprachen) veröffentlicht wurden, z.B.:

Laborpraxis (De): <https://www.laborpraxis.vogel.de/das-besondere-aus-der-tiefsee-neues-pet-abbauendes-enzym-entdeckt-a-0f3b03af0624567421d6fdf98c593426/>

Enerzine (Fr): https://www.enerzine.com/les-abyses-marins-devoilent-un-nouvel-espoir-contre-la-pollution-plastique/68216-2023-09?utm_content=cmp-true

GreenReport (It): <https://greenreport.it/news/rifiuti-e-bonifiche/il-gusto-per-la-plastica-dellenzima-che-viene-dalle-profondita-marine/>

Des Weiteren kam es zu Auftritten in TV, Radio und Nachrichtensendungen. Die Forschungsarbeit und ihre Bedeutung für die Gesellschaft wurden in TV-Sendungen wie "Schleswig-Holstein-Magazin," "Tagesschau" und "Hamburg Journal" ausführlich diskutiert und vorgestellt:

SH-Magazin: <https://www.ndr.de/nachrichten/schleswig-holstein/Forschungsergebnis-Enzym-aus-der-Tiefsee-zersetzt-PET-Plastik,enzym100.html>

<https://www.ardmediathek.de/video/ndr-info/uni-kiel-erforscht-bakterien-als-plastikmuell-vernichter/ndr/Y3JpZDovL25kci5kZS9kNWQ2MmlwZi02NTkxLTQ4ZWUtODgwZi0xYzNkN2Q5OGlyNDU> (Ganzer Beitrag: <https://www.ardmediathek.de/video/schleswig-holstein-magazin/schleswig-holstein-magazin-oder-11-05-2023/ndr/Y3JpZDovL25kci5kZS9wcm9wbGFuXzE5NjMzNTk0M19nYW56ZVNlbmR1bmc>)

Tagesschau: Video ist nicht mehr verfügbar

Hamburg Journal: <https://www.ardmediathek.de/video/hamburg-journal/forscher-entdecken-enzym-zur-zersetzung-von-plastikflaschen/ndr/Y3JpZDovL25kci5kZS9hYzM3YzY1NS1iNTA4LTRhNTQtYTEwYy03Mzc4OTgxMzQ2YTk>

Diese breite Präsentation und Verbreitung unserer Forschungsarbeit haben dazu beigetragen, die Aufmerksamkeit der Wissenschaftsgemeinschaft, der Industrie und der Öffentlichkeit auf die Bedeutung und Relevanz unseres Projekts und seiner Ergebnisse zu lenken. Wir sind stolz auf die positiven Auswirkungen unserer Forschung und die Möglichkeiten, die sich daraus ergeben, um die Plastik-Recycling-Technologie weiter voranzubringen.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

- Personalkosten: 43 Monate 100% Stelle TV-L E13 (Postdoktorand) entsprechend der vereinbarten 3 Jahre und der 7 Monate KN-Verlängerung.
- Sequenzierungen
- Verbrauchsmaterialien

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Für den Fortschritt und den Erfolg des Projektes waren die Arbeiten der CAU Kiel und ebenfalls die der anderen Projektpartner notwendig und angemessen. Ebenfalls entscheidend für den

Erfolg des Projektes war der regelmäßige Austausch der neu erlangten Ergebnisse und Methoden, sowie die sehr gute Zusammenarbeit zwischen den Kooperationspartnern.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

In dem Projekt PLASTISEA konnte eine Vielzahl an äußerst zufriedenstellenden Ergebnissen erzielt werden. Es wurde eine ausgesprochen hohe Anzahl an Metagenom-Sequenzdaten generiert, die zur Identifizierung einer Vielzahl an Plastik modifizierenden Enzymen führte. Die in dem Projekt entwickelte Technologie-Plattform ermöglicht einen internationalen Wissenstransfer und stellt eine schnelle und sichere Methode dar, um neue Enzyme zu identifizieren, die in Folgeprojekte mit Firmenbeteiligung münden können. Es wurden innerhalb des Projektes hunderte potentielle Genkandidaten identifiziert und die interessantesten biochemisch näher charakterisiert und weiterentwickelt.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Es wurden während der Laufzeit des Projekts bei anderen Stellen keine nennenswerten Fortschritte auf den Gebieten des Vorhabens erzielt. Während unser Manuskript in derselben Zeitschrift begutachtet wurde, erschien eine Publikation, in der viele thermotolerante PETasen beschrieben wurden ([www.doi.org/10.1038/s41467-022-35237-x](https://doi.org/10.1038/s41467-022-35237-x)). In dieser Publikation wurde ein Enzym beschrieben, das PET46 ähnelt. Dieses Enzym stand jedoch nicht im Mittelpunkt der Studie, seine phylogenetische Herkunft wurde nicht analysiert, und es wurde nicht mit der gleichen Detailtiefe charakterisiert wie unseres. Daher kann PET46 immer noch als die erste archaeelle PETase angesehen werden.

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Folgende Publikationen wurden veröffentlicht (oft in Kooperation mit UHH-Partner):

- Chow, J., Perez-Garcia, P., Dierkes, R., & Streit, W. R. (2023). Microbial enzymes will offer limited solutions to the global plastic pollution crisis. *Microbial Biotechnology*, 16(2), 195-217.
- Dierkes, R. F., Wypych, A., Pérez-García, P., Danso, D., Chow, J., & Streit, W. R. (2023). An ultra-sensitive *Comamonas thiooxidans* biosensor for the rapid detection of enzymatic polyethylene terephthalate (PET) degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(1), e01603-22.
- Han, Y., Kinfu, B. M., Blombach, F., Cackett, G., Zhang, H., Pérez-García, P., ... & Streit, W. R. (2022). A novel metagenome-derived viral RNA polymerase and its application in a cell-free expression system for metagenome screening. *Scientific Reports*, 12(1), 17882.
- Perez-Garcia, P., Chow, J., Costanzi, E., Gurschke, M., Dittrich, J., Dierkes, R. F., ... & Streit, W. R. (2023). An archaeal lid-containing feruloyl esterase degrades polyethylene terephthalate. *Communications chemistry*, 6(1), 193.
- Weigert, S., Perez-Garcia, P., Gisdon, F. J., Gagsteiger, A., Schweinshaut, K., Ullmann, G. M., ... & Höcker, B. (2022). Investigation of the halophilic PET hydrolase PET6 from *Vibrio gazogenes*. *Protein Science*, 31(12), e4500.

- Zhang, H., Dierkes, R. F., Perez-Garcia, P., Costanzi, E., Dittrich, J., Cea, P. A., ... & Streit, W. R. (2023). The metagenome-derived esterase PET40 is highly promiscuous and hydrolyses polyethylene terephthalate (PET). *The FEBS Journal*.
- Zhang, H., Perez-Garcia, P., Dierkes, R. F., Applegate, V., Schumacher, J., Chibani, C. M., ... & Streit, W. R. (2022). The Bacteroidetes *Aequorivita* sp. and *Kaistella jeonii* produce promiscuous esterases with PET-hydrolyzing activity. *Frontiers in microbiology*, 12, 803896.
- Weiterhin wird derzeit ein Manuskript zu den isolierten Konsortien und insbesondere zu den *Alcanivorax* Stämmen, Genomen und Proteinen vorbereitet.