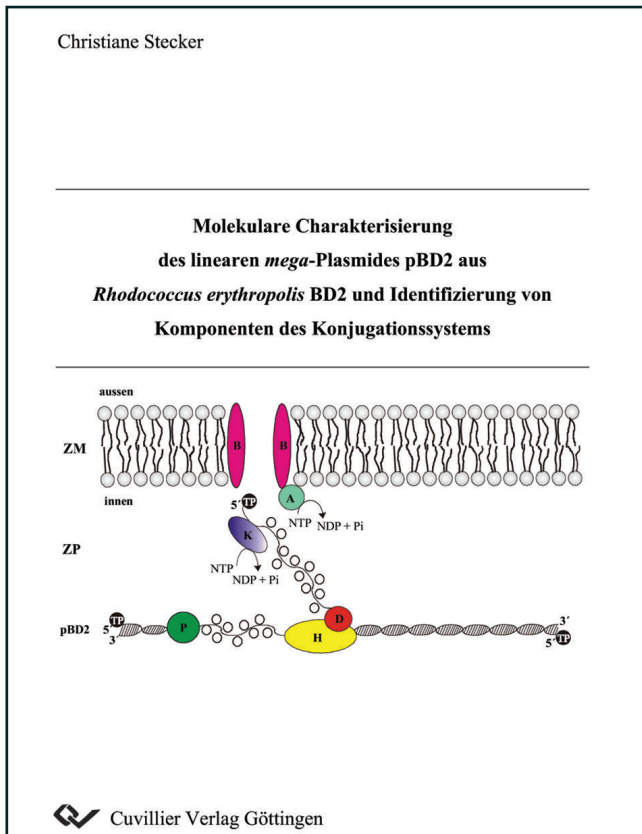




Christiane Stecker (Autor)

# Molekulare Charakterisierung des linearen mega-Plasmides pBD2 aus *Rhodococcus erythropolis* BD2 und Identifizierung von Komponenten des Konjugationssystems



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2966>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

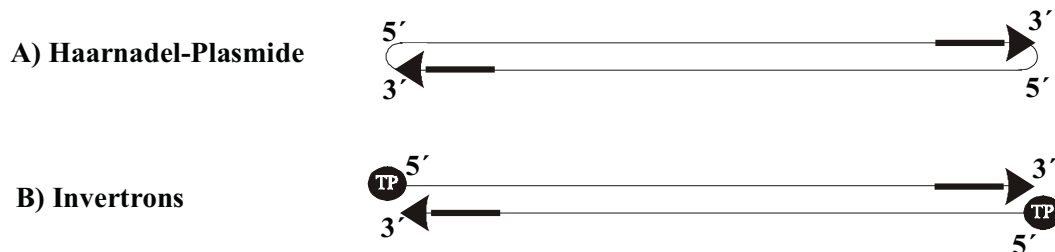
# 1 Einleitung

Bei Plasmiden handelt es sich um extrachromosomale selbstreplizierende DNA-Elemente, die sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien weit verbreitet sind und auch bei Eukaryonten gefunden werden. Eine Vielzahl der Plasmide ist kryptisch, d.h. sie führen zu keinem erkennbaren Phänotyp des Wirts. Meist jedoch tragen die Plasmide Gene, die ihrem Wirt einen Selektionsvorteil innerhalb seines Ökosystems bieten. Hierzu zählen Resistenzgene, welche eine Reaktion auf neue selektive Drücke, zum Beispiel gegen Antibiotika oder Schwermetalle, ermöglichen. Ebenfalls von Bedeutung sind Gene, die für katabole Enzyme kodieren und dem Wirt die Anpassung an eine ökologische Nische gestatten.

Lange Zeit ging die biomolekulare Wissenschaft davon aus, dass Plasmide prinzipiell eine Ringstruktur aufweisen müssen, und auch heute noch werden derartige Definitionen in Lehrbüchern gefunden („Plasmid: kleiner extrachromosomaler DNA-Ring bei Bakterien“; Campbell und Reece, 2003). Es ist jedoch seit Ende der siebziger Jahre bekannt, dass prokaryontische und eukaryontische Organismen auch lineare Plasmide tragen können. Erstmals entdeckt wurden sie 1977 in den Mitochondrien von Mais-Pflanzen (Pring et al., 1977). Das erste lineare Plasmid (pSLA2) eines prokaryontischen Organismus wurde zwei Jahre später in *Streptomyces rochei* nachgewiesen (Hayakawa, 1979).

Zur Stabilisierung der Plasmidenden und zum Schutz vor Degradation durch Wirts-Restriktionssysteme weisen die linearen Plasmide charakteristische Strukturen im Bereich der Plasmidtermini auf. Ein wesentliches Merkmal ist das Auftreten invertierter Sequenzwiederholungen (terminal inverted repeats, TIR; Hinnebusch und Tilly, 1993). Anhand der Struktur ihrer Telomere werden prinzipiell zwei Typen von Plasmiden unterschieden: Eine Gruppe linearer Plasmide weist kovalent geschlossene Enden mit einer Haarnadel-ähnlichen Struktur auf (Haarnadelplasmide, Abb. 1.1 A; Hinnebusch und Tilly, 1993). Die zweite Gruppe trägt am 5'-Phosphatende des Telomers kovalent gebundene Terminale Proteine, die vor der Degradation durch 5'-3'-Exonukleasen schützen (Invertrons, Abb. 1.1 B; Sakaguchi, 1990; Hinnebusch und Tilly, 1993). Es

gibt inzwischen Evidenz, dass die Terminalen Proteine (TPs) der linearen Plasmide darüber hinaus wichtige Funktionen bei der Replikation erfüllen (Salas, 1991; Bao und Cohen, 2001).



**Abb. 1.1 Schematische Darstellung linearer Plasmide nach Hinnebusch und Tilly (1993)**

Der DNA-Doppelstrang ist durch dünne Linien dargestellt, die invertierten Sequenzwiederholungen durch Pfeile. 5': 5'-Terminus der Plasmide; 3'-Terminus der Plasmide. TP: kovalent gebundene terminale Proteine der 5'-Termini.

Haarnadelplasmide sind weit verbreitet bei den humanpathogenen Spirochaeten der Gattung *Borrelia*. Ein Großteil der Borrelien weist sogar mehrere lineare Plasmide pro Zelle auf, häufig in Koexistenz mit zirkulären Plasmiden, und auch das Chromosom der Borrelien besitzt meist eine lineare Haarnadelstruktur. So trägt *Borrelia burgdorferi* B31 ein lineares Chromosom von 911 kb und besitzt zwölf lineare und neun zirkuläre Plasmide (Fraser, 1997). Die linearen Plasmide der Borrelien tragen häufig Gene, die den Bakterien Schutz vor der Immunantwort des Wirtes ermöglichen, meist durch Modifikation der Oberflächenproteine (Barbour und Garon, 1987). Neben den Plasmiden und Chromosomen der Borrelien weisen auch der *E. coli*-Phage N15, die Pockenviren, der Afrikanische Schweinefiebertivirus (ASFV) und der *Chlorella*-Virus Replikons mit Haarnadelstrukturen auf (Casjens, 1999).

Die weit größere Gruppe umfasst die linearen Plasmide mit 5'-terminal gebundenen Proteinen. Dieser Gruppe gehören eine Vielzahl eukaryontischer linearer Plasmide an, die im Zytoplasma, in den Mitochondrien und den Chloroplasten zahlreicher Pilze, Algen und höherer Pflanzen lokalisiert sind (Meinhardt et al., 1990). Auch zahlreiche Viren besitzen TIRs und terminale Proteine (TP). Hierzu zählt die große Gruppe der Adenoviren, die Vertebraten-Zellen befallen. Die Viren besitzen ein Genom einer Größe von 26-45 kb mit TIRs, die in einem Größenbereich von 36 bp bis über 200 bp liegen (Davison et al., 2003). Auch die  $\phi$ 29-Phagen, die *Bacillus subtilis*-Zellen befallen,

gehören dieser Gruppe an; ihr Genom ist mit durchschnittlich 20 kb etwas kleiner, als das der Adenoviren (Meijer et al., 2001).

Im Bereich der prokaryotischen Organismen wurden lineare Plasmide besonders häufig bei den Gram-positiven Bakterien der Ordnung *Actinomycetales* gefunden, hierbei in erster Linie bei Vertretern der Gattungen *Streptomyces*, *Mycobacterium* und *Rhodococcus*.

Besonders gut untersucht sind die linearen Plasmide der filamentösen Bodenbakterien *Streptomyces*. Sie stehen häufig im Zusammenhang mit der Produktion von Sekundärmetaboliten, wie der Bildung von Antibiotika. Identifiziert wurden auf den linearen Plasmiden der Streptomyceten Gene, die unter anderem für die Synthese von Methylenomycin (*Streptomyces coelicolor*), Lasalocid A (*Streptomyces lasaliensis*), Actinomycin D (*Streptomyces parvulus*) oder Chloramphenicol (*Streptomyces venezulae*) verantwortlich sind (Kinashi et al., 1993; Kinashi et al., 1987; Kinashi und Shimaji, 1987). Die Größen der streptococcalen linearen Plasmide liegen in einem Bereich von 12-1000 kb (Wu und Roy, 1993; Panzda et al., 1998). Viele *Streptomyces* Species besitzen mehr als ein lineares Plasmid. Häufig handelt es sich um Derivate, die große Bereiche identischer Sequenzen aufweisen. So wurden in *Streptomyces rochei* zwei 17 kb-Plasmide, pSLA1 und pSLA2, vorgefunden, wobei pSLA1 um 500 bp kürzer ist als pSLA2 (Hirochika und Skaguchi, 1982). Von SCP1 (350 kb) aus *S. coelicolor* existieren gleich mehrere sequenzähnliche Derivate in einer Zelle. Sie besitzen eine Größe zwischen 410 kb und 560 kb (Kinashi et al. 1987).

Neben den Plasmiden weisen auch die Chromosomen der Streptomyceten (mit einer durchschnittlichen Größe von 8 Mb) eine lineare Struktur auf. Sie besitzen wie die linearen Plasmide TIRs und TPs (Huang et al., 1998). Von einigen Plasmiden ist bekannt, dass sie reversibel in das Chromosom zu integrieren vermögen (pPZG101 aus *S. rimosus* und SCP1 aus *S. coelicolor*). Diese integrativen Plasmide verfügen meist über lange TIRs (pPZG101: 95 kb; SCP1: 80 kb; Gravius et al., 1994; Kinashi et al., 1992). Es wird angenommen, dass sie durch Integration und Exzision chromosomale Gene akquirieren können (Gravius et al., 1994).

Die Telomere der linearen Plasmide und Chromosomen weisen palindromische Sequenzen auf, die eine Ausbildung komplexer Sekundär- und Tertiärstrukturen ermöglichen (Huang et al., 1998). Es wird angenommen, dass diese dem Schutz des

3'-Endes vor DNasen dienen und eine wichtige Rolle bei der Replikation besitzen (Huang et al., 1998). Die Replikationsmechanismen der linearen Plasmide pSCL (*S. clavuligerus*) und pSLA2 (*S. rochei*) sind weitgehend bekannt. Sie entsprechen denen der linearen Chromosomen: Die Replikation erfolgt bidirektional, ausgehend von einem zentral lokalisierten Replikationsursprung (*ori*). Die *ori* der Plasmide kodieren für ein bzw. zwei Replikationsinitiatorproteine und sind reich an Sequenzwiederholungen (Iterons; Shiffman und Cohen, 1992; Chang und Cohen, 1994; Qin und Cohen, 1998). Die *ori* der linearen Plasmide ähneln darin denen der temperenten Bakteriophagen der *Enterobacteriaceae* und von *Bacillus* (Chang et al., 1996). Sie unterscheiden sich jedoch von den Phagen insofern, dass deren Replikation an den Telomeren beginnt und anhand eines anderen Mechanismus erfolgt (Salas, 1991; Chang et al., 1996).

Viele lineare Plasmide der Streptomyceten sind konjugativ übertragbar, wie zum Beispiel SCP1 (350 kb) aus *S. coelicolor* (Chen et al., 1993), pSLL (90 kb) aus *Streptomyces laurentii* ATC31255 (Kinoshita-Iramina, 1997), pRJ3L (322 kb) und pRJ28 (330 kb) aus *Streptomyces* sp. CHR3 und CHR28 (Ravel et al., 2000). Darüber hinaus sind auch zahlreiche zirkuläre konjugative Plasmide bekannt, zu den am besten charakterisierten zählen pIJ101 (*S. lividans*), pSG5 (*S. ghanaensis*), SCP2 (*S. lividans*) und pSAM2 (*Streptomyces ambofaciens*; Pettis und Cohen, 1996; Muth et al., 1995; Brolle et al., 1993, Hagege et al., 1993). Während der konjugativen Übertragung bilden die Zellen der Streptomyceten, die in der Regel als Substratmycel wachsen, eine typische Pockenstruktur aus (Hopwood und Kieser, 1993). Diese Pocken sind unter dem Mikroskop sichtbar und gehen auf eine Retardation von Wachstum und Differenzierung der Zellen zurück. Verantwortlich hierfür ist ein Transfer-Gen, das bisher unter anderem auf den zirkulären Plasmiden pIJ101 (*tra*), pSN22 (*traB*), pSA1.1 (*spi*) und pSAM2 (*traSA*) gefunden wurde (Kinoshita-Iramina, 1997). Dieses Gen besitzt eine essentielle Funktion bei der Konjugation. Außer diesem verfügen die Plasmide über ein bis vier weitere Gene (spread-Gene, *spd*), die für die Verbreitung der Plasmide innerhalb des Rezipientenmycels verantwortlich sind (Brolle et al., 1993). Anders als die Transfergene besitzen sie keine essentielle Funktion bei der Konjugation. Die komplette Transfer-Region der Plasmide ist auf DNA-Fragmenten einer Größe von 5-9 kb lokalisiert. (Muth et al., 1995). Der konjugative Transfer von linearen *mega-*

Plasmiden und damit verbunden die Übertragung der auf den Plasmiden lokalisierten Genen lässt vermuten, dass diesen Plasmiden eine bedeutende Rolle im horizontalen Gentransfer zukommt.

Neben den Streptomyceten wurden lineare Plasmide auch bei den Mycobacterien gefunden. Diese Gattung umfasst eine sehr heterogene Gruppe von Organismen, bei denen es sich häufig um klinische Isolate handelt. Die meisten der in Mycobakterien aufgefundenen linearen Plasmide sind kryptisch. Auch das kürzlich sequenzierte 23 kb große lineare Plasmid pCLP des opportunistischen pathogenen *Mycobacterium celatum* weist keine Gene auf, die seinem Wirt einen Selektionsvorteil bieten; es trägt in erster Linie Gene, die zu seiner Stabilisierung in der Zelle beitragen (Le Dantec et al., 2001).

Auch Rhodococci tragen lineare Plasmide. Isoliert wurden sie aus den unterschiedlichsten Habitaten, zum Beispiel an terrestrischen und marinen Standorten sowie im Grundwasser (Bell et al., 1998). Auch hier existieren klinische Isolate, wie der humanpathogene Stamm *Rhodococcus equi*, der HIV-Patienten infiziert (Bell et al., 1998). Sie besitzen eine starke metabolische Diversität. Ihr Substratspektrum ist weit und umfasst Alkane und aromatische (auch polycyclische) Verbindungen, die auch durch Nitrogruppen modifiziert oder chloriert vorliegen können. Sie werden deshalb oft aus Böden und Gewässern isoliert, die durch aromatische Lösungsmittel, Insektizide, Pestizide, Acrylamide oder halogenierte Kohlenwasserstoffe verunreinigt sind.

Die bei Rhodococci identifizierten linearen Plasmide stehen häufig in Zusammenhang mit der metabolischen Diversität ihrer Wirte. So wurde in *R. corallinus* B-276 eine plasmidkodierte Monooxygenase des Trichlorethylen-Abbauweges gefunden (Saeki, 1999), und in *Rhodococcus* sp. RHA1 tragen die linearen Plasmide pRHL1 und pRHL2 die Gene eines Biphenylabbauweges (Yamada et al., 1998). Die linearen Plasmide aus *Rhodococcus opaca* MR11 und MR22 kodieren für eine Hydrogenase und eine Ribulose 1,5-bisphosphat-Carboxylase, die zu dem chemolithoautotrophen Phänotyp ihres Wirtes beitragen (Kalkus et al., 1990; Grzeszik, 1997). Ähnlich den Streptomyceten, tragen auch die Stämme *R. opaca* MR11 und MR22 mehr als ein lineares Plasmid. Zusätzlich zu den drei linearen Plasmiden mit einer Größe zwischen 180 kb und 510 kb besitzen sie ein zirkuläres Plasmid, das jedoch nicht zu dem chemolithotrophen Charakter des Wirtes beiträgt (Sensfuss, 1986; Kalkus, 1990). Ob die rhodococcalen Chromosomen, wie die der Streptomyceten, einen linearen Charakter

besitzen, ist nicht bekannt. Bisher konnte lediglich nur bei einem Phytopathogenen, *Rhodococcus fascians*, neben einem linearen Plasmid auch ein lineares Chromosom identifiziert werden (Crespi et al., 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das lineare *mega*-Plasmid pBD2 aus *R. erythropolis* BD2 untersucht, das ebenfalls Gene kataboler Enzyme trägt. Bei *R. erythropolis* BD2 handelt es sich um ein Isolat, das durch Anreicherungsstudien Trichlorethen (TCE)-abbauender Organismen identifiziert wurde. Ein co-metaboler TCE-Abbau war in *R. erythropolis* BD2 durch einige monoalkylierte Benzolderivate (Isopropylbenzol (IPB), Toluol, Ethylbenzol und Propylbenzol) induzierbar. Weiterführende Studien zeigten, dass BD2 diese monoalkylierten Benzolderivate als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen vermochte. Molekulare Untersuchungen führten zu der Identifizierung des ca. 210 kb großen linearen *mega*-Plasmides pBD2, das die Abbaugene der monoalkylierten Benzolderivate trug. Die für den Abbauweg kodierenden Gene *ipbA1A2A3A4C* von pBD2 wurden von Kessler (1996) kloniert, sequenziert und charakterisiert. Sie kodieren für drei Untereinheiten der IPB-Dioxygenase (Eisen-Schwefel-Protein, große Untereinheit IpbA1; Eisen-Schwefel-Protein; kleine Untereinheit IpbA2 und Ferredoxin-Reduktase IpbA4), den Cofaktor Ferredoxin der IPB-Dioxygenase (IpbA3) und die Isopropylcatechol (IPC)-Dioxygenase (IpbC).

pBD2 kann der Gruppe der Invertrons zugeordnet werden, da es 5'-terminal gebundene Terminale Proteine aufweist, wie anhand von Gelretardationsstudien mit Restriktionsfragmenten des isolierten linearen Plasmides gezeigt wurde (Isolation durch Kessler und Kalkus, pers. Mitteilung; Stecker et al., 2003). Konjugationsstudien ergaben, dass pBD2 konjugativ auf andere *R. erythropolis*-Stämme (BD2.101, cE2, Ce3 und MS14) übertragen werden kann. Die Konjugationsfrequenzen lagen hierbei zwischen  $3,5 \times 10^{-5}$  und  $2,6 \times 10^{-3}$  Transkonjuganten pro Donor (Dabrock et al., 1994). Auch für weitere rhodococcale lineare Plasmide wurde von einer konjugativen Übertragbarkeit berichtet. So sind die Plasmide pHG201 (270 kb) aus *R. opacus* MR11 und pHG205 (280 kb) und 204 (180 kb) aus *R. opacus* MR22 konjugativ übertragbar (Kalkus et al., 1990). Bezüglich der für die Konjugation notwendigen Gene bei Rhodococcen ist bisher nichts bekannt.

Um das lineare *mega*-Plasmid pBD2 aus *R. erythropolis* BD2 näher zu charakterisieren und um weitere pBD2-kodierte Funktionen zu identifizieren, sollte pBD2 vollständig sequenziert werden. Die Annotation der pBD2-Sequenz sollte Informationen über die plasmidvermittelten Eigenschaften liefern und Einblicke in die potentielle Rolle linearer Plasmide beim horizontalen Gentransfer geben.

Eine Auswahl der im Rahmen der Annotation identifizierten Gene sollte durch Mutantenstudien näher charakterisiert werden. Im Vordergrund dieser Untersuchungen stand hierbei die Suche nach Komponenten des pBD2-Konjugationssystems, da über die molekularen Grundlagen konjugativer linearer Plasmide nahezu nichts bekannt ist.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen, Plasmide und Primer

In den Tabellen 2.1 und 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Organismen aufgeführt. Die Tabellen 2.3 bis 2.7 zeigen eine Übersicht der verwendeten Klonierungsvektoren und rekombinanten Plasmide. Eine Auflistung der verwendeten Primer findet sich in Tabelle 2.8.

**Tab. 2.1 *Rhodococcus erythropolis*-Stämme**

<b>Stamm</b>	<b>Relevante Merkmale</b>	<b>Herkunft /Referenz</b>
<i>R. erythropolis</i> BD2	Wildtyp, IPB <sup>+</sup> , Str <sup>s</sup> , Rif <sup>s</sup>	Dabrock 1993
<i>R. erythropolis</i> BD2.1	IPB <sup>+</sup> , Str <sup>s</sup> , Rif <sup>r</sup>	Dabrock 1993
<i>R. erythropolis</i> BD2.101	IPB <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Rif <sup>s</sup>	Dabrock 1993
<i>R. erythropolis</i> C14	Konjugationsdefekte Mutante von BD2.1, IPB <sup>+</sup> , Str <sup>s</sup> , Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , beide pBD2-Allele PBD2.016:: <i>nptII</i>	diese Arbeit
<i>R. erythropolis</i> M11	Konjugationseingeschränkte Mutante von BD2.1 IPB <sup>+</sup> , Str <sup>s</sup> , Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , ein pBD2-Allel PBD2.015:: <i>nptII</i> , ein pBD2-Wildtypallel PBD2.016	diese Arbeit
<i>R. erythropolis</i> M22	Mutante von BD2, IPB <sup>+</sup> , Str <sup>s</sup> , Rif <sup>s</sup> , beide pBD2-Allele PBD2.015:: <i>nptII</i>	diese Arbeit
<i>R. erythropolis</i> S5	Konjugationseingeschränkte Mutante von BD2.1, IPB <sup>+</sup> , Str <sup>s</sup> , Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , beide pBD2-Allele PBD2.059:: <i>nptII</i>	diese Arbeit

IPB<sup>+</sup>/IPB<sup>-</sup>: Fähigkeit/Unfähigkeit auf Isopropylbenzol bzw. Toluol als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen; Str<sup>r</sup>/Str<sup>s</sup>: Streptomycin-Resistenz/Sensitivität; Rif<sup>r</sup>/Rif<sup>s</sup>: Rifampicin-Resistenz/Sensitivität; Km<sup>r</sup>: Kanamycin-Resistenz

**Tab. 2.2 *Escherichia coli*-Stämme**

<b>Stamm</b>	<b>Relevante Merkmale (Genotyp<sup>a</sup> oder Phänotyp)</b>	<b>Herkunft /Referenz</b>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , <i>DlacU169</i> (f80 <i>lacZDM15</i> ), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> VCS257	DP50 Derivat: <i>tonA53</i> , <i>dapD8</i> , <i>lacY1</i> , <i>glnV44</i> ( <i>supE44</i> ), <i>D(gal-uvrB)</i> , <i>47 tyrT58</i> ( <i>supF58</i> ), <i>gyrA29</i> , <i>D(thyA57)</i> , <i>hsdS3</i> (rk-mk-), <i>mcrA</i>	Stratagene, San Diego, USA
<i>E. coli</i> BHB2688	N205, <i>recA</i> [ $\lambda$ imm434, <i>cIts</i> , b2, <i>redE</i> <sub>am</sub> , <i>Sam</i> / $\lambda$ ]	Hohn & Murray, 1977; Hohn, 1979
<i>E. coli</i> BHB2690	N205, <i>recA</i> [ $\lambda$ imm434, <i>cIts</i> , b2, <i>redD</i> <sub>am</sub> , <i>Sam</i> / $\lambda$ ]	Hohn & Murray, 1977; Hohn, 1979

a: Genotypbezeichnungen für *E. coli* siehe Bachmann (1990)

**Tab. 2.3 Verwendete Vektoren**

<b>Plasmid/ Cosmid</b>	<b>Relevante Merkmale (Genotyp<sup>a</sup> oder Phänotyp<sup>b</sup>)</b>	<b>Größe (kb)</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
pWE15	Cosmidvektor für Inserts bis 45 kb ; Amp <sup>r</sup> , T3-, T7-RNA-Polymerase-Promotor	8,2	Stratagene, San Diego, USA
pTZ19R	Amp <sup>r</sup> , <i>lacPOZ'</i>	2,68	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
pBluescriptIIKS+/- (pBIKS)	Amp <sup>r</sup> , <i>lacPOZ'</i> , ColE1, <i>oriR</i> , F1 <i>ori</i>	2,96	Stratagene, San Diego, USA
pBluescriptIISK+/- (pBIISK)	Amp <sup>r</sup> , <i>lacPOZ'</i> , ColE1, <i>oriR</i> , F1 <i>ori</i>	2,96	Stratagene, San Diego, USA
pUC4K	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ( <i>nptII</i> ), <i>lacZ'</i>	4,9	Viera & Messing, 1982
pDA71	Shuttle-Vektor, Derivat von pEcoR251 (Amp <sup>r</sup> , <i>EcoRI</i> ) und pDA30 (Cm <sup>r</sup> )	8,8	Dabbs, 1988

a: Phänotypbezeichnung: Amp<sup>r</sup>: Ampicillin-Resistenz; Km<sup>r</sup>: Kanamycin-Resistenz

b: Genotypbezeichnung: *lacPOZ'*: Promotor-Operator-Region des Lactose-Operons und  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli*; siehe Bachmann, 1990.

**Tab. 2.4 Rekombinante Plasmide der klonierten pBD2-Termini**

Plasmid	Relevantes Merkmal	Größe (kb)	Referenz/Herkunft
pKL2 (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 1,5 kb- <i>KpnI</i> -Fragment aus pBD2 (0,47 kb vom linken Ende entfernt)	4,4	Kessler, 1996
pNEL7 (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 4,94 kb- <i>EcoRI/NotI</i> -Fragment aus pBD2 (0,56 kb vom linken Ende entfernt)	7,9	Kessler, 1996
pBD2 <sub>BamHI</sub> (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 3,8 kb- <i>BamHI</i> -Fragment aus pBD2 (rechtes Ende von pBD2)	6,8	Kalkus, unveröffentlicht

Amp<sup>r</sup>:Ampicillinresistenz**Tab. 2.5 Rekombinante Cosmide, Shotgun-Plasmide und rekombinante Plasmide zur Klonierung des Replikationsorigins von pBD2**

Plasmid	Relevantes Merkmal	Größe (kb)	Referenz/ Herkunft
pBD2.K (pWE15)	Amp <sup>r</sup> ; 35,5 kb- <i>Sau3AI</i> -Fragment aus pBD2 (Bereich 3,9-39,8 kb)	44,1	diese Arbeit
pBD2.L (pWE15)	Amp <sup>r</sup> ; 35,0 kb- <i>Sau3AI</i> -Fragment aus pBD2 (Bereich 40,0-74,6 kb)	42,8	diese Arbeit
pBD2.B (pWE15)	Amp <sup>r</sup> ; 30,5 kb- <i>Sau3AI</i> -Fragment aus pBD2 (Bereich 56,6-87,1 kb)	38,7	diese Arbeit
pBD2.A (pWE15)	Amp <sup>r</sup> ; 42,6 kb- <i>Sau3AI</i> -Fragment aus pBD2 (Bereich 80,8-123,4 kb)	50,8	diese Arbeit
pBD2.I (pWE15)	Amp <sup>r</sup> ; 39,3 kb- <i>Sau3AI</i> -Fragment aus pBD2 (Bereich 104,8-144,1 kb)	47,5	diese Arbeit
pBD2.D (pWE15)	Amp <sup>r</sup> ; 38,2 kb- <i>Sau3AI</i> -Fragment aus pBD2 (Bereich 139,8-178,0 kb)	46,4	diese Arbeit
pBD2.N (pWE15)	Amp <sup>r</sup> ; 39,0 kb- <i>Sau3AI</i> -Fragment aus pBD2 (Bereich 166,9-205,9 kb)	47,2	diese Arbeit
pDABS272 (pDA71)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; Genbankplasmid, trägt <i>BstYI</i> - Fragment von pBD2 (Bereich 10,8-20,6 kb)	18,6	Kessler, 1996
pK279 (pTZ19R)	Amp <sup>r</sup> ; <i>Sau3AI</i> -shotgun-Plasmid, trägt rechtes Endfragment von pBD2.K	5,3	diese Arbeit
pA122 (pTZ19R)	Amp <sup>r</sup> ; <i>Sau3AI</i> -shotgun-Plasmid, trägt linkes Endfragment von pBD2.A	5,2	diese Arbeit
pD209 (pTZ19R)	Amp <sup>r</sup> ; <i>Sau3AI</i> -shotgun-Plasmid, trägt rechtes Endfragment von pBD2.D	5,1	diese Arbeit
pD324 (pTZ19R)	Amp <sup>r</sup> ; <i>Sau3AI</i> -shotgun-Plasmid, trägt linkes Endfragment von pBD2.D	5,4	diese Arbeit
pL347 (pTZ19R)	Amp <sup>r</sup> ; <i>Sau3AI</i> -shotgun-Plasmid von pBD2.L, trägt Bereich 64,0-66,7 kb von pBD2	5,5	diese Arbeit
pH270 (pTZ19R)	Amp <sup>r</sup> ; <i>Sau3AI</i> -shotgun-Plasmid von pBD2.K, trägt PBD2.026	4,3	diese Arbeit
pB527 (pTZ19R)	Amp <sup>r</sup> ; <i>Sau3AI</i> -shotgun-Plasmid, trägt linkes Endfragment von pBD2.B	5,2	diese Arbeit

pEORI (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 9,7 kb- <i>EcoRV</i> -Fragment aus Cosmid pBD2.K (PBD2.019-027)	12,6	diese Arbeit
pEORIKm (pEORI)	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; <i>nptII</i> -Marker in <i>SpeI</i> - Vektorschnittstelle	13,8	diese Arbeit
pNORI (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 14,2 kb- <i>NotI</i> -Fragment aus Cosmid pBD2.K (PBD2.021-030)	17,1	diese Arbeit
pNORIKm (pNORI)	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; <i>nptII</i> -Marker in <i>SpeI</i> - Vektorschnittstelle	18,3	diese Arbeit

Amp<sup>r</sup>:Ampicillinresistenz; Cm<sup>r</sup>: Chloramphenicolresistenz; Km<sup>r</sup>: Kanamycinresistenz

**Tab. 2.6 Rekombinante Plasmide zum Auslösen von Mutationen in *R. erythropolis* BD2 und BD2.1**

Plasmid	Relevantes Merkmal	Größe (kb)	Referenz/Herkunft
pCB5 (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 1,0 kb- <i>Cfr42I/BamHI</i> -Fragment aus pDABS272 ( $\Delta 5' \Delta 3'$ PBD2.016)	4,0	diese Arbeit
pCB5Km1 (pCB5)	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; <i>nptII</i> -Marker in <i>NcoI</i> - Schnittstelle von pCB5 ( $\Delta 5' \Delta 3'$ PBD2.016:: <i>nptII</i> ), P <sub><i>nptII</i></sub> in Orientierung von P <sub><i>lac</i></sub>	5,2	diese Arbeit
pCB5Km2 (pCB5)	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; <i>nptII</i> -Marker in <i>NcoI</i> - Schnittstelle von pCB5 ( $\Delta 5' \Delta 3'$ PBD2.016:: <i>nptII</i> ), P <sub><i>nptII</i></sub> in entgegengesetzter Orientierung von P <sub><i>lac</i></sub>	5,2	diese Arbeit
pMB1 (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 0,6 kb- <i>MlsI/BamHI</i> -Fragment aus pDABS272 ( $\Delta 5' \Delta 3'$ PBD2.015)	3,6	diese Arbeit
pMB1Km (pMB1)	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; <i>nptII</i> -Marker in <i>EheI</i> - Schnittstelle von pMB1Km ( $\Delta 5' \Delta 3'$ PBD2.015:: <i>nptII</i> )	4,8	diese Arbeit
pS4 (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 1,4 kb- <i>SalI</i> -Fragment aus pL347 ( $\Delta 5' \Delta 3'$ PBD2.059)	4,4	diese Arbeit
pS4Km (pS4)	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; <i>nptII</i> -Marker in <i>Pfl23II</i> – Schnittstelle von pS4 ( $\Delta 5' \Delta 3'$ PBD2.059:: <i>nptII</i> )	5,6	diese Arbeit
pXK5 (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 0,5 kb- <i>XhoI/KpnI</i> -Fragment aus pH270 ( $\Delta 5' \Delta 3'$ PBD2.026)	3,5	diese Arbeit
pXK5BKm (pXK5)	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; <i>nptII</i> -Marker in <i>BoxI</i> - Schnittstelle von pXK5 ( $\Delta 5' \Delta 3'$ PBD2.026:: <i>nptII</i> )	4,7	diese Arbeit
pXK5Ekm (pXK5)	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; <i>nptII</i> -Marker in <i>EcoRI</i> - Vektorschnittstelle ( $\Delta 5' \Delta 3'$ PBD2.026:: <i>nptII</i> )	4,7	diese Arbeit

Amp<sup>r</sup>:Ampicillinresistenz; Km<sup>r</sup>: Kanamycinresistenz; *nptII*: Kanamycinkassette aus pUC4K; P<sub>*nptII*</sub>: Promotor von *nptII*; P<sub>*lac*</sub>: Promotor des *lac*-Operons

**Tab. 2.7 Rekombinante Plasmide zur Komplementation einer Mutation in *R. erythropolis* BD2 und BD2.1**

Plasmid	Relevantes Merkmal	Größe (kb)	Referenz/Herkunft
pKS7.9NH (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 7,9 kb- <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment aus Cosmid pBD2.K (PBD2.013-020, 5' PBD2.021)	10,8	diese Arbeit
pDA7.9NH (pDA71)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; Insert aus pKS7.9NH über <i>HindIII/PstI</i> in pDA71 umklontiert	16,7	diese Arbeit
pKS6.7NHΔS (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; Δ1,2 kb- <i>StuI</i> -Fragment aus pKS7.9NH (PBD2.013, 3' PBD2.014, 5' PBD2.015, PBD2.016-020, 5' PBD2.021)	9,8	diese Arbeit
pDA6.7NHΔS (pDA71)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; Insert aus pKS6.7NHΔS über <i>HindIII/PstI</i> in pDA71 umklontiert	15,7	diese Arbeit
pDA6.6HH (pDA71)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; Δ1,4 kb- <i>HpaI/HindIII</i> -Fragment aus pDA7.9NH (3' PBD2.014, PBD2.015-020, 5' PBD2.021)	15,4	diese Arbeit
pDA5.0EP (pDA71)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; Δ3,0 kb- <i>EcoRV/PstI</i> -Fragment aus pDA7.9NH (PBD2.013-017, 5' PBD2.018)	13,8	diese Arbeit
pKS2.3SX (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 2,3 kb- <i>StuI/XhoI</i> -Fragment aus pKS7.9NH blunt über <i>EcoRV</i> in pBIIKS (PBD2.016, 5' PBD2.017)	5,2	diese Arbeit
pDA2.3SX (pDA71)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; 2,3 kb-Insert aus pKS2.3SX über <i>HindIII/PstI</i> in pDA71 umklontiert	11,1	diese Arbeit
pKS4.9X (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 4,9 kb <i>XhoI</i> -Fragment blunt über <i>EcoRV</i> in pBIIKS(PBD2.013-016, 5' PBD2.017)	7,8	diese Arbeit
pDA4.9X (pDA71)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; Insert aus pKS4.9X über <i>HindIII/PstI</i> in pDA71 umklontiert	13,7	diese Arbeit
pDA4.4XP (pDA4.9X)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; pDA4.9X Δ2,1 kb <i>NotI/PstI</i> ::1,5 kb <i>NotI/PstI</i> PCR-Produkt von PBD2.016 (PBD2.013-016)	13,1	diese Arbeit
pDA2.7KH (pDA71)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; 2,7 kb <i>KpnI</i> (blunt)/ <i>HindIII</i> -Insert aus pL347 über <i>PstI</i> (blunt)/ <i>HindIII</i> in pDA71 kloniert	11,5	diese Arbeit
pTZKm (pTZ19R)	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; <i>npII</i> -Marker in umgekehrter Orientierung über <i>PstI</i> in pTZ19R (pTZ19R:: <i>npII</i> )	4,1	diese Arbeit
pKS1.8XP (pBIIKS)	Amp <sup>r</sup> ; 1,8 kb <i>XhoI</i> /blunt PCR-Produkt von PBD2.016 über <i>XhoI/EcoRV</i> in pBIIKS	4,7	diese Arbeit

pTZKm1.8XP (pKS1.8XP)	Amp <sup>r</sup> ; Umklonierung von 1,8 kb <i>XhoI/XbaI</i> (blunt)-Fragment aus pKS1.8XP in pTZKm Δ1,1 kb <i>XhoI/KpnI</i> (blunt) ( <i>nptII</i> -Promotor vor PBD2.016)	4,8	diese Arbeit
pDAKm1.8XP (pDA71)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; 2,0 kb <i>PstI</i> -Fragment aus pTZKm1.8XP über <i>PstI</i> -Schnittstelle in pDA71 umkloniert	10,8	diese Arbeit
pTZKm2.7XE (pTZ19R)	Amp <sup>r</sup> ; Insertion von 2,7 kb <i>XhoI/EcoRV</i> PCR-Produkt von PBD2.059 in pTZKm Δ1,1 kb <i>XhoI/KpnI</i> (blunt) ( <i>nptII</i> -Promotor vor PBD2.059)	5,7	diese Arbeit
pDAKm2.7XE (pDA71)	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; 2,9 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pTZKm2.7XE über <i>HindIII</i> - Schnittstelle in pDA71 umkloniert	11,7	diese Arbeit

Amp<sup>r</sup>: Ampicillinresistenz; Km<sup>r</sup>: Kanamycinresistenz; Cm<sup>r</sup>: Chloramphenicolresistenz; *nptII*: Kanamycin-kassette aus pUC4K

**Tab. 2.8 Verwendete Primer**

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')
forward <sup>a</sup>	ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC
new reverse <sup>a</sup>	CCA AGC TCT AAT ACG ACT CAC
pWE15_for <sup>b</sup>	GCT TAT CGA TGA TAA GCG
pWE15_rev <sup>b</sup>	CGA GGC CCT TTC GTC TTC
pDA71_for <sup>c</sup>	GTT GTA CTT GTT GCT GAA GC
pDA71_rev <sup>c</sup>	ACG TAA GGA AAG TGG CTC TC
Km up <sup>d</sup>	GTA TGA GTC AGC AAC ACC TTC
Km down <sup>d</sup>	CTT GTG CAA TGT AAC ATC AGA G
rek289 <sup>e</sup>	GGG GAG ATT TCT CTC GG
rel393 <sup>e</sup>	GCA CGA ACT ATG GCG AAC
rec045b <sup>e</sup>	GAG CCA CAC AAA CAC CAG
PBD2.016_for	CAA TGC GGT ACC CAC GGA A
PBD2.016_rev	CGA GGA GGT ACC AGA ACG A
PBD2.059_for	CAA CGC CAC CAT CAC TGC
PBD2.059_rev	CGC TAT CGC GCG ATC TTC
PBD2.017_for	CGA AAC CCG TAT CGG CAC A
PBD2.017_rev	GAA AAG GAA CAG GCC GAC G
TadA_for <i>XhoI</i>	GGC CTA CCT CGA GGA ACA C
TadA_rev <i>PstI</i>	CGA GCA ATC TGC AGA TCA GTA C
FtsK_for <i>XhoI</i>	GGT AGC TCG AGC GCG GAT
pTZ19R_rev <i>EcoRV</i>	GAC CAT GAT ATC GCC AAG CTC

a, b, c, d: Primer zur Sequenzierung der klonierten Fragmente in pTZ19R und pBIIS/pBIISK (Standardprimer, a), in pWE15 (b), in pDA71 (c) und zur Sequenzierung der Fragmente, in welche die Kanamycinkassette aus pUC4K kloniert wurde (d).

## 2.2 Nährmedien und Medienzusätze

Im Folgenden sind die verwendeten Nährlösungen aufgeführt. Diese wurden, wenn nicht anders angegeben, durch Autoklavieren sterilisiert. Zur Herstellung von festen Nährböden wurde den Medien 1,5% [w/v] Agar zugesetzt.

### 2.2.1 Komplexmedien

#### **Luria Bertani-Medium (LB)** (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium.

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1000 ml

#### **M-LB-Medium**

In diesem Medium wurden die zur Transduktion eingesetzten *E. coli*-Zellen angezogen. Dem LB-Medium wurde nach dem Autoklavieren 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2% [w/v] Maltose aus sterilen Stammlösungen (1 M MgSO<sub>4</sub>, 10% [w/v] Maltose) zugegeben.

#### **SOB-Medium** (Hanahan, 1983)

Anzucht-Medium für transformationskompetente *E. coli*-Zellen.

Trypton	2%	[w/v]
Hefeextrakt	0,5%	[w/v]
NaCl	10	mM
KCl	2,5	mM
MgSO <sub>4</sub>	10	mM
MgCl <sub>2</sub>	10	mM

Die Magnesiumsalze wurden als 1 M Stammlösungen angesetzt und getrennt autoklaviert.

**F-TYE-Medium**

Das Medium zur Anzucht von *R. erythropolis* setzt sich aus Komponenten zusammen, die als Stammlösungen getrennt autoklaviert wurden.

10x Lösung D	20 ml
5x Lösung A	10 ml
Fruktose-Lsg.	20 ml
TYE	4 ml
Fe-Citrat	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	160 ml

**F-TYE-Agar**

Bei der Herstellung der Nährböden für *R. erythropolis* wurden 7,5 g Agar in 390 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> autoklaviert und die übrigen Komponenten steril zugegeben.

10x Lösung D	50 ml
5x Lösung A	25 ml
Fruktose-Lsg	25 ml
TYE	3 ml
Fe-Citrat	2,5 ml

**10x Lösung D**

NH <sub>4</sub> Cl	5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,1 g
NiCl <sub>2</sub> -Lösung, 3 mM	0,5 ml
MnCl <sub>2</sub> -Lösung, 30 mM	0,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 500 ml

Nickel- und Mangansalze wurden aus Stammlösungen steril zugegeben.

**5x Lösung A**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 500 ml