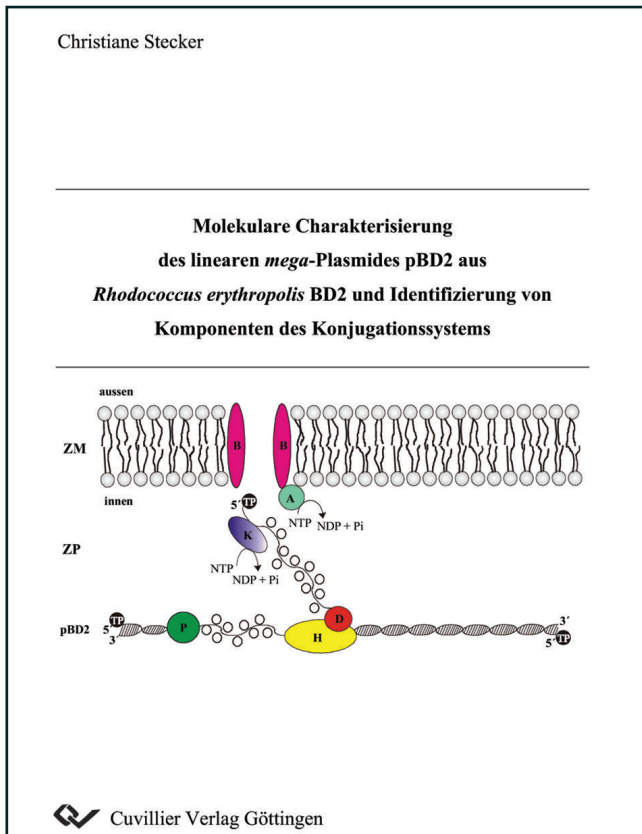




Christiane Stecker (Autor)

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, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	VI
1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	8
2.1	Organismen, Plasmide und Primer	8
2.2	Nährmedien und Medienzusätze	14
2.2.1	Komplexmedien	14
2.2.2	Mineralmedium	17
2.2.3	Medienzusätze	18
2.3	Kultivierung, Stammhaltung und digitale Aufnahmen von Mikroorganismen	19
2.3.1	Anzuchtbedingungen	19
2.3.2	Stammhaltung	20
2.3.3	Reinheitskontrolle	20
2.3.4	Digitale Aufnahmen	21
2.3.5	Messung der optischen Dichte	21
2.4	Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	21
2.4.1	Behandlung von Geräten und Lösungen	21
2.4.2	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion	21
2.4.3	DNA-Fällung	22
2.4.4	Mikrodialyse von DNA	22
2.4.5	Lagerung von DNA	22
2.5	Isolierung von Nukleinsäuren	23
2.5.1	Isolierung von Plasmid-/Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i>	23
2.5.1.1	Schnelle Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> ("Cracking")	23
2.5.1.2	Plasmid-/Cosmidisolierung durch alkalische Lyse	24
2.5.1.3	Plasmid-/Cosmidisolierung durch Anionenaustausch-Chromatographie zur Gewinnung hochreiner DNA	25
2.5.1.4	Cosmidisolierung im großen Maßstab durch Anionenaustausch-Chromatographie	25
2.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>R. erythropolis</i>	26
2.5.2.1	Präparative Isolierung intakter linearer Plasmide durch Elektroelution	26
2.5.2.2	Analytische Isolierung intakter linearer Plasmide	29
2.5.2.3	Isolierung zirkulärer Plasmide (Dabbs 1988, modifiziert)	29
2.5.3	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>R. erythropolis</i>	30

2.6	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.6.1	Konventionelle Gelelektrophorese	31
2.6.2	Wechselfeld-Gelelektrophorese ("Pulsed Field Gel Electrophoresis", PFGE)	32
2.6.3	Ethidiumbromidfärbung und Fotografie von Agarosegelen	33
2.6.4	Größenbestimmung von DNA-Fragmenten	33
2.6.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	34
2.6.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
2.7	Enzymatische Modifikationen von DNA	35
2.7.1	Restriktionsspaltung von DNA in Lösung	35
2.7.2	Restriktionsspaltung von DNA in Agarose	36
2.7.3	Herstellung von glatten Enden ("Blunt Ends")	36
2.7.4	Dephosphorylierung von DNA	37
2.7.5	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.8	DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
2.9	DNA-Transfer durch Transformation	39
2.9.1	Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen durch Hitzeschock	39
2.9.2	Elektroporation von <i>E.coli</i> -Zellen	40
2.9.3	Selektion rekombinanter <i>E.coli</i> -Klone durch den Blau-Weiß-Test	41
2.9.4	Elektroporation von <i>R. erythropolis</i> -Zellen	42
2.10	DNA-Transfer durch Transduktion	43
2.10.1	Herstellung des "Freeze-Thaw" Lysates aus <i>E. coli</i> BHB2688	43
2.10.2	Herstellung des Ultraschall-Lysates aus <i>E. coli</i> BHB2690	45
2.10.3	Verpackung des Ligationsansatzes	45
2.10.4	Transduktion von <i>E. coli</i>	46
2.11	DNA-Transfer durch Konjugation	46
2.12	DNA-DNA-Hybridisierung	47
2.12.1	DNA-Sonden-Markierung mit Digoxigenin-11-dUTP	47
2.12.2	Konzentrationsbestimmung von DNA-Sonden	48
2.12.3	Übertragung von DNA durch Vakuumblot auf Nylonmembranen (Peferoen et al., 1982)	49
2.12.4	Hybridisierung	50
2.12.5	DIG-Detektion	51
2.12.6	Wiederverwertung von Nylonmembranen ("Strippen")	52
2.13	Sequenzierung und Editierung	53
2.13.1	Subklonierung von Cosmiden nach der „Shotgun“-Methode	53
2.13.2	Aufreinigung der Plasmid-DNA aus „Shotgun“-Subklonen	53

2.13.3	Sequenzierreaktion	54
2.13.4	Sequenz-Assemblierung und Editierung	55
2.14	Bezugsquellen für Biochemikalien und Enzyme	56
3	Experimente und Ergebnisse	58
3.1	Sequenzierung des linearen Plasmides pBD2	58
3.1.1	Sequenzierungsstrategie	58
3.1.2	Herstellung einer Cosmidgenbank	60
3.1.3	Sequenzierung des linearen Plasmides	61
3.1.4	Überprüfung einer <i>in silico</i> Restriktionskarte der pBD2-Sequenz	64
3.2	Annotation der pBD2-Nukleotidsequenz	66
3.2.1	Identifizierung offener Leserahmen (ORFs)	66
3.2.2	Datenbank-Recherche und Zuweisung potentieller Funktionen	68
3.2.3	Ähnlichkeiten zu anderen linearen Plasmiden	70
3.2.4	Suche nach dem Replikationsursprung von pBD2	70
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der pBD2-Sequenzanalyse	73
3.3	Strategie zur Mutagenisierung des linearen Plasmides pBD2	74
3.4	Molekulare Charakterisierung und funktionelle Analyse der Zelldifferenzierung	77
3.4.1	Charakterisierung des offenen Leserahmens PBD2.015	78
3.4.1.1	Mutagenese von PBD2.015	79
3.4.1.2	Nachweis der Mutation in PBD2.015-Mutante M22	80
3.4.1.3	Vergleich der Zelldifferenzierung der PBD2.015-Mutante M22 mit den <i>R. erythropolis</i> -Stämmen BD2 und BD2.101	82
3.4.2	Charakterisierung des offenen Leserahmens PBD2.026	84
3.4.2.1	Mutagenese von PBD2.026	85
3.5	Untersuchung von potentiellen Genen des pBD2-Konjugationssystems	87
3.5.1	Vergleichende Konjugationsstudien mit <i>R. erythropolis</i> BD2 und BD2.101 in Flüssigkultur und auf Festmedium	88
3.5.2	Charakterisierung des potentiellen Konjugationsgens PBD2.016	90
3.5.2.1	Mutagenese von PBD2.016	92
3.5.2.2	Charakterisierung des Mutationsortes von <i>traA</i> -Mutante C14	95
3.5.2.3	Genorganisation des potentiellen Konjugationsgenortes I	99
3.5.2.4	Identifizierung potentieller Translationsstarts und –stopps innerhalb des Konjugationsgenortes I	100
3.5.2.5	Komplementationsanalysen der <i>traA</i> -Mutante C14	102
3.5.2.6	Komplementationsstudien durch Nutzung des <i>nptII</i> -Promotors	109
3.5.3	Charakterisierung und Mutagenisierung von PBD2.015	111

3.5.4	Charakterisierung und Mutagenese von PBD2.017	113
3.5.5	Charakterisierung des potentiellen Konjugationsgens PBD2.059	114
3.5.5.1	Mutagenese von PBD2.059	117
3.5.5.2	Charakterisierung des Mutationsortes von <i>traK</i> -Mutante S5	119
3.5.5.3	Genorganisation des Konjugationsgenortes II	120
3.5.5.4	Komplementation der <i>traK</i> -Mutante S5	122
4	Diskussion	125
4.1	Morphologische Differenzierung	125
4.2	Charakteristik der Plasmidtermini	128
4.2.1	Telomere	128
4.2.2	Terminale Proteine	131
4.3	Plasmidvervielfältigung und Stabilisierung	134
4.3.1	Plasmid-Replikation	134
4.3.2	Plasmid-Segregation	140
4.3.3	Post-Segregationale Kontrolle	143
4.4	Das Konjugationssystem von pBD2	145
4.4.1	Der Zell-Zell-Kontakt	146
4.4.2	DNA-Prozessierung	147
4.4.3	Präsentation der Transfer-DNA	150
4.4.4	DNA-Translokation	153
4.4.5	Der Konjugationsprozess von pBD2	158
4.5	Metabolismus und Energiekonservierung	159
4.5.1	Der IPB-Abbauweg	159
4.5.2	Komponenten zur Assimilation anorganischen Sulfats	163
4.5.3	Der Fettsäureabbau	164
4.6	Efflux und Metallresistenz	165
4.6.1	Arsenatresistenz	165
4.6.2	Cadmiumresistenz	167
4.6.3	Kupferresistenz und –homeostase	168
4.7	Organisation von pBD2 und potentielle Dynamik	169
4.8	Ausblick	173

5	Zusammenfassung	176
6	Literatur	179
7	Anhang	203