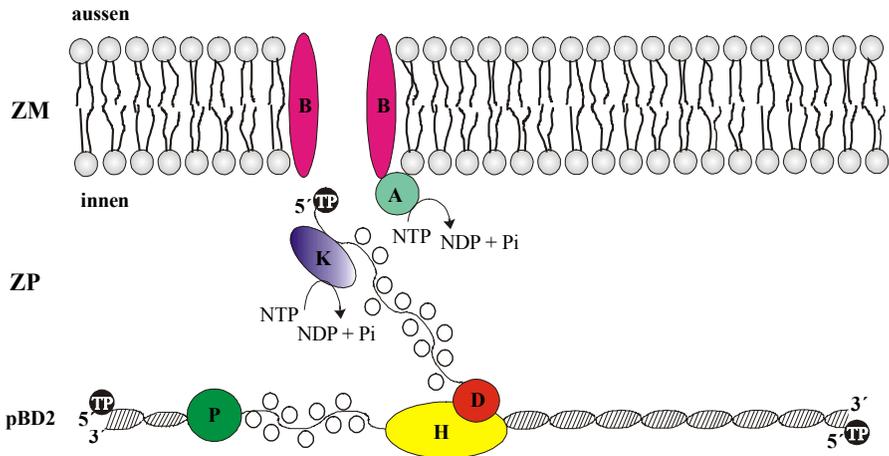

**Molekulare Charakterisierung
des linearen *mega*-Plasmides pBD2 aus
Rhodococcus erythropolis BD2 und Identifizierung von
Komponenten des Konjugationssystems**



Titelseite: Modell des postulierten Konjugationsprozesses von pBD2 (Kapitel 4.4.5)

Leere Kreise: Einzelstrang-bindende Proteine; A: TypIV-Sekretions-ATPase TraA (PBD2.016); B: potentielles membranintegrales TypIV-Sekretionsprotein kodiert durch PBD2.017; D: DprA-Homologes (PBD2.002); H: Helikase (PBD2.027); K: Kopplungsprotein TraK (PBD2.059) der SpoIIIE/FtsK-Familie; P: DNA-Polymerase; TP: Terminales Protein des 5'-Terminus von pBD2; ZM: Zytoplasmamembran; ZP: Zytoplasma.

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

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christiane Stecker (geb. Scherp)
aus Bad Nauheim

Göttingen 2003

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2003
ISBN 3-86537-086-1

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen angefertigt.

Die Sequenzierung des linearen Plasmides pBD2 erfolgte am Göttinger Labor für Genomanalyse (G₂L).

D 7

Referent: Prof. Dr. B. Averhoff
Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk
Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 2004

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2004
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-086-1

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

Abkürzungen

<i>A.</i>	<i>Actinobacillus, Agrobacterium</i>
aa	amino acids: Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus, Borrelia, Brucella, Burkholderia</i>
bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C.</i>	<i>Caulobacter, Chlamydia</i>
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
Cm	Chloramphenicol
CoA	CoenzymA
ca.	circa
ccc	covalently closed circular
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
cm	Zentimeter
d	Desoxy
<i>D.</i>	<i>Deinococcus</i>
Δ	Delta
demin	demineralisiert
dest	destilliert
d. h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig, Doppelstrang
DR	direct repeat: direkte Sequenzwiederholung

E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EB	elution buffer: Elutionspuffer
eds.	editors: Herausgeber
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolbis-(2-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetat
et al.	<i>et alteri</i> : und andere
Fa.	Firma
g	Gramm
γ	Gamma
G ₂ L	Labor für Genomanalyse, Institut für Microbiologie und Genetik, Universität Göttingen
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
<i>H.</i>	<i>Haemophilus, Halobacterium</i>
HOHD	2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat; PAPS: 3-Phosphoadenylylsulfat
HOMODA	2-Hydroxy-6-oxo-7-methylocta-2,4-dienoat
Hrsg.	Herausgeber
IPB	Isopropylbenzol
IPC	Isopropylcatechol
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	inverted repeat: invertierte Sequenzwiederholung
IS	insertion sequence: Insertionssequenz
ISP	iron sulfur protein: Eisen-Schwefel-Protein
Km	Kanamycin
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
konz.	Konzentriert
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Lactococcus, Listeria</i>
λ	Lambda
LB	Luria-Bertani
LMP	low melting point: geringe Schmelztemperatur

μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
M	molar
<i>M.</i>	<i>Micrococcus, Mycobacterium</i>
mRNA	messenger RNA
min	Minute
mod.	modifiziert
n	nano (10^{-9})
<i>N.</i>	<i>Nostoc</i>
N-	Amino-
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
ORF	open reading frame: Offener Leserahmen
<i>p</i>	<i>para-</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCR	polymerase chain reaction: Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFGE	pulsed field gel electrophoresis: Wechselfeld-Gelelektrophorese
P_{lac}	Promotor des <i>lac</i> -Operons
P_{nptII}	Promotor des <i>nptII</i> -Markers
pH	<i>pondus hydrogeni</i> : negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
r	resistent
<i>R.</i>	<i>Rhodococcus</i>
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
rpm	rounds per minute: Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde, sensitiv
s.	siehe
<i>S.</i>	<i>Salmonella, Sinorhizobium, Streptomyces, Streptococcus, Staphylococcus, Synechococcus, Synechocystis, Sulfolobus</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat
Str	Streptomycin
<i>T.</i>	<i>Thermoplasma</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-HCl-EDTA
Tet	Tetracyclin
TIR	terminal inverted repeat: terminal invertierte Sequenzwiederholung
T _m	Schmelztemperatur
TP	am 5'-Terminus linearer Replikons gebundenes Terminales Protein
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
Ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen
<i>X.</i>	<i>Xylella</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indouyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
z.Z.	zur Zeit

Nukleotidbasen

A	Purinbase Adenin	G	Purinbase Guanin
C	Pyrimidinbase Cytosin	T	Pyrimidinbase Thymin

Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

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).

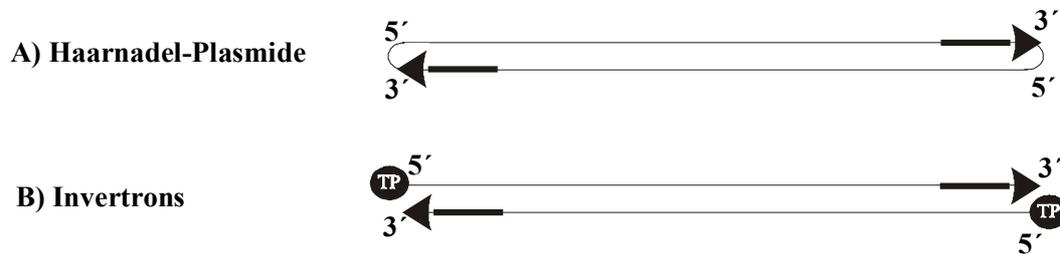


Abb. 1.1 Schematische Darstellung linearer Plasmide nach Hinnebusch und Tilly (1993)

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 ϕ 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

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

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

Tab. 2.2 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Relevante Merkmale (Genotyp^a oder Phänotyp)	Herkunft /Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , <i>DlacU169</i> (f80 <i>lacZ</i> DM15), <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> [\(\lambdaimm434, <i>cIts</i> , b2, <i>redE</i> _{am} , <i>Sam</i> /\(\lambda]	Hohn & Murray, 1977; Hohn, 1979
<i>E. coli</i> BHB2690	N205, <i>recA</i> [\(\lambdaimm434, <i>cIts</i> , b2, <i>redD</i> _{am} , <i>Sam</i> /\(\lambda]	Hohn & Murray, 1977; Hohn, 1979

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

Tab. 2.3 Verwendete Vektoren

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

a: Phänotypbezeichnung: Amp^r: Ampicillin-Resistenz; Km^r: Kanamycin-Resistenz

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

Tab. 2.4 Rekombinante Plasmide der klonierten pBD2-Termini

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

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