



**Abbau von Chlorbenzol in *Pseudomonas putida* GJ31:  
das Plasmid pKW1**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Chemie  
der Bergischen Universität  
Wuppertal

vorgelegt von  
Dipl. Chem. Markus Kunze  
aus Wuppertal

September 2002

Die vorliegende Dissertation entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Reineke am Institut für Chemische Mikrobiologie des Fachbereiches 9 der Bergischen Universität Wuppertal in der Zeit von Mai 1998 bis September 2002.

Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und durch die Europäische Union unter der Projektnummer BIO4-CT97-2040 und EVK1-CT-1999-00023 gefördert.

# Inhaltsverzeichnis

	-Seite-
<b>Abstract</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Umweltrelevanz anthropogener Schadstoffemissionen	1
1.2 Modifizierter <i>ortho</i> -Weg versus <i>meta</i> -Weg	2
1.3 <i>Pseudomonas putida</i> GJ31: Mineralisierung von 3-Chlorcatechol über den <i>meta</i> -Weg	4
1.4 Die genetische Umgebung von <i>cbzE</i>	5
1.5 Transponierbare Elemente als Werkzeuge für neue Abbauwege	6
1.6 Konstruktion von Chloraromatenverwertern	8
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	10
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Chemikalien und Enzyme	11
2.2 Verwendete Organismen	12
2.3 Medien	13
2.3.1 Medien für <i>Escherichia coli</i>	14
2.3.2 Medien für <i>Pseudomonas putida</i>	14
2.3.3 Mineralmedium	15
2.3.4 Antibiotika	15
2.4 Verwendete Vektoren und Plasmide	16
2.5 Oligonukleotide	20
2.6 Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien	23
2.6.1 Anzucht und Lagerung von <i>Escherichia coli</i>	23
2.6.2 Anzucht und Lagerung von <i>Pseudomonas putida</i>	23
2.6.3 Stammhaltung	24

---

2.7	Trübungsmessung	24
2.8	Zellernte und Herstellung von zellfreien Proteinextrakten	24
2.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.10	Herstellung von Expressionsstämmen	25
2.11	Bestimmungen von Enzymaktivitäten	26
2.11.1	Catechol-2,3-Dioxygenase, C23O	26
2.11.2	2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, HMSD	27
2.11.3	2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, HMSH	27
2.11.4	4-Oxalocrotonat-Tautomerase, OI	28
2.11.5	4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, OD	28
2.11.6	2-Oxopent-4-enoat-Hydratase, OEH	29
2.11.7	4-Hydroxy-2-ketovalerat-Aldolase, HOA	30
2.11.8	Acetaldehyd-Dehydrogenase, ADA	30
2.11.9	Synthese von 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat	31
2.11.10	Synthese von Vinylpyruvat	31
2.11.11	Synthese von 4-Hydroxy-2-oxovalerat	32
2.12	Molekularbiologische Methoden	32
2.12.1	Replica-Plating	32
2.12.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	32
2.12.3	Isolierung von chromosomaler-DNA	33
2.12.4	Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Pseudomonaden	33
2.12.5	<i>In vitro</i> -Manipulation von DNA	34
2.12.6	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	34
2.12.7	Elution von DNA aus Agarosegelen	34
2.12.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.12.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	36
2.12.10	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	36
2.12.11	Southern Blotting und DNA-DNA-Hybridisierung	37
2.12.12	Klonierungen	37
2.12.13	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	37
2.12.14	Sequenzierung von DNA	38
2.13	Chloridbestimmung	38
2.14	pH-Bestimmung	38
2.15	Computergestützte Analyse von DNA- und Proteinsequenzen	38

---

<b>3</b>	<b>Experimente und Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Stammunterscheidung - Etablierung eines Nachweisverfahrens zur Bestimmung der Übertragungsrichtung	40
3.1.1	Bildung von Hybridstämmen mit neuen Abbaueigenschaften	40
3.1.2	Differenzierung der Stämme über 16S rDNA	42
3.1.3	Differenzierung der Stämme über Polymorphismen	44
3.2	Isolierung des degradativen Plasmides pKW1 aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31	45
3.3	Der Transposonbereich um <i>cbzE</i>	49
3.3.1	Analyse des plasmidisch codierten Transposonbereiches von <i>Pseudomonas putida</i> GJ31	53
3.3.2	Analyse nichtcodierender Bereiche	55
3.3.3	Analyse codierender Bereiche	59
3.3.3.1	Die Genprodukte der Leserahmen TraN, TraE, TraO, TraF, TraG	59
3.3.3.2	Die Genprodukte TnpA(1) und TnpA(2)	62
3.3.3.3	Die Genprodukte der Leserahmen CbzT, CbzE und CbzX	63
3.3.3.4	Das Genprodukt CbzG	63
3.3.3.5	Das Genprodukt GST	65
3.3.3.6	Das Genprodukt CbzJ	66
3.3.3.7	Die Genprodukte TnpA(3), TnpR und TnpA(4)	68
3.4	Lokalisierung, Klonierung und Sequenzierung eines <i>meta</i> -Weg Operons auf Plasmid pKW1 aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31	69
3.4.1	Analyse des plasmidisch codierten <i>meta</i> -Weges von <i>Pseudomonas putida</i> GJ31	71
3.4.1.1	Analyse nichtcodierender Bereiche	73
3.4.1.2	Analyse codierender Bereiche	77
3.4.1.2.1	Das Genprodukt ORF1	77
3.4.1.2.2	Das Genprodukt ORF2	78
3.4.1.2.3	Das Genprodukt CbzK	79
3.4.1.2.4	Das Genprodukt CbzQ	81
3.4.1.2.5	Das Genprodukt CbzJ(2)	82
3.4.1.2.6	Das Genprodukt CbzF	85
3.4.1.2.7	Das Genprodukt CbzE(2)	87
3.4.1.2.8	Das Genprodukt GntR	90
3.4.1.2.9	Das Genprodukt ORF3	92
3.4.1.2.10	Das Genprodukt ORF4	92

---

3.5	Identifizierung, Klonierung und Sequenzierung eines peripheren Abbauweges aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31	94
3.5.1	PCR-Strategie	95
3.5.2	Analyse nichtcodierender Bereiche	96
3.5.3	Analyse codierender Bereiche	97
3.5.3.1	Die Genprodukte CbzAa und CbzAb	98
3.5.3.2	Die Genprodukte CbzAc und CbzAd	100
3.5.3.3	Das Genprodukt CbzB	101
3.5.3.4	Das Genprodukt CbzE(3)	103
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>106</b>
4.1	Transposons und mögliche Transpositionereignisse	107
4.2	Ein neues <i>meta</i> -Operon in Stamm GJ31	113
4.3	Vergleich der beiden Abbau-Cluster von Stamm GJ31 mit Abbaucleistern anderer Stämme	115
4.4	CbzE(2) – eine neue Catechol-2,3-Dioxygenase Stamm GJ31	119
4.5	Abbau von 3-Chlorcatechol bzw. 4-Chlorcatechol	121
4.6	Inaktivierung der Hydrolase durch 4-substituierte Verbindungen	123
4.7	Ein neuer oberer Abbauweg in Stamm GJ31	123
4.8	Ausblick	125
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>128</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>157</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>158</b>
8.1	DNA-Sequenz des Transposonbereiches um <i>cbzE</i>	158
8.2	DNA-Sequenz des <i>meta</i> -Operons von <i>Ps. putida</i> Stamm GJ31	171
8.3	DNA-Sequenz des oberen Abbauweges von <i>Ps. putida</i> Stamm GJ31	179

## Abstract

The objective of this study was on the one hand the analysis of the genetic environment of the suicide stable catechol-2,3-dioxygenase *cbzE* and on the other hand the search for further degradative *meta* pathway and upper pathway genes, respectively, in *Pseudomonas putida* strain GJ31.

- It was found that RAPD PCR method is suitable to determine the direction of gene transfer in conjugation experiments between the wild type strains of *Pseudomonas putida* strain GJ31 and *Pseudomonas putida* strain PaW1 relative to their behaviour as donor and acceptor, respectively.
- *Pseudomonas putida* strain GJ31, which is able to grow on chlorobenzene via the *meta* cleavage pathway, was found to carry the plasmid pKW1 with a size of about 180 kbp. Activity experiments of wild type GJ31 and a “benzoate cured” derivative QM1 that have lost the ability to grow on chlorobenzene (CB<sup>-</sup>) as the sole carbon source gave a hint that the catabolic genes coding for the chlorobenzene degrading enzymes, designated *cbz*, are located on this plasmid. Hybridization experiments with *cbzE* as radioactive probe show both the presence of *cbzE* on a 2.4 kbp *SspI*-fragment of the plasmid and the absence of *cbzE* in the “benzoate cured” derivative QM1. These results were confirmed by PCR experiments.
- PCR analysis of the genetic region flanking the *cbzE* gene revealed upstream about 6,3 kbp and downstream about 11,0 kbp new nucleotide sequence. Upstream of *cbzE* a part of a transfer operon with the open reading frames *traNEOFG* followed by a transposase gene were identified. Downstream of *cbzE* the following open reading frames *cbzG*, *GST*, *tnpA(2)*, *cbzJ* encode 2-hydroxymuconate-semialdehyde dehydrogenase, glutathione S-transferase, transposase and 2-keto-4-pentenoate hydratase followed by a region with high similarity to transposon Tn5501.
- Via PCR experiments a region was found that exhibits high similarity to *meta* pathway operons for the dioxygenolytic pathway for initial catabolism of 3-phenylpropionate of

*Escherichia coli* K12 and *Comamonas testosteroni* strain TA441, respectively. Sequence analysis of this 9632 bp fragment revealed the following ten new open reading frames ORF1, ORF2, *cbzK*, *cbzQ*, *cbzJ*, *cbzF*, *cbzE(2)*, *gntR*, ORF3 and ORF4 in this order. The open reading frames ORF1 and ORF2 probably encode a porin and a 4-hydroxy-benzoate transporter protein. The *meta* pathway genes *cbzKQJFE(2)* encode 4-hydroxy-2-oxo-valerate aldolase (*cbzK*), acylating acetaldehyde dehydrogenase (*cbzQ*), 2-keto-4-pentenoate hydratase (*cbzJ(2)*), 2-hydroxy-6-ke-tonona-2,4-dienoate hydrolase (*cbzF*) and the *meta* cleavage 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase (*cbzE(2)*). The gene *gntR*, encoding a putative transcriptional activator of the *gntR* family, was located adjacent to the *meta* cluster in the opposite orientation. The functions of ORF3 and ORF4 are not known at present.

- Hybridization experiments show both the belonging of *cbzE* and the *meta* pathway operon to the plasmid and the orientation of this two closely neighbouring regions to each other.
- The function of the *meta* cleavage genes *cbzG* (2-hydroxymuconate-semialdehyde dehydrogenase), *cbzJ* and *cbzJ(2)* (2-keto-4-pentenoate hydratase), *cbzE(2)* (catechol 2,3-dioxygenase), *cbzF* (2-hydroxy-6-ke-tonona-2,4-dienoate hydrolase), *cbzQ* (acylating acetaldehyde dehydrogenase) were characterised by cloning into an expression vector and following enzymatic analysis of their products in *E. coli* cells.
- Furthermore a 5493 bp region was found that contains the following six new open reading frames *cbzAa*, *cbzAb*, *cbzAc*, *cbzAd*, *cbzB* and *cbzE(3)*. Sequence comparisons revealed that while *cbzAaAbAcAd* genes encode the four subunits of the multi enzyme complex chlorobenzene dioxygenase, the *cbzB* gene encodes for the corresponding *cis*-dihydrodiol dehydrogenase. The gene *cbzE(3)* exists as an discontinuous open reading frame with high similarity to both the *todE* catechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain F1 and *tecE* of *Burkholderia* sp. strain PS12. Both homologues exist only as deletion remnants. Furthermore the genes and gene products are most closely related to those for toluene (*todC1C2BADE*) and benzene degradation (*bedC1C2BA* and *bznABCD*) and distantly to those for biphenyl, naphthalene and benzoate degradation.

Hybridization experiments with *cbzB* as radioactive probe show that in contrast to the plasmid encoded pathways described above, the upper pathway operon is located on the chromosome.

# **1 Einleitung**

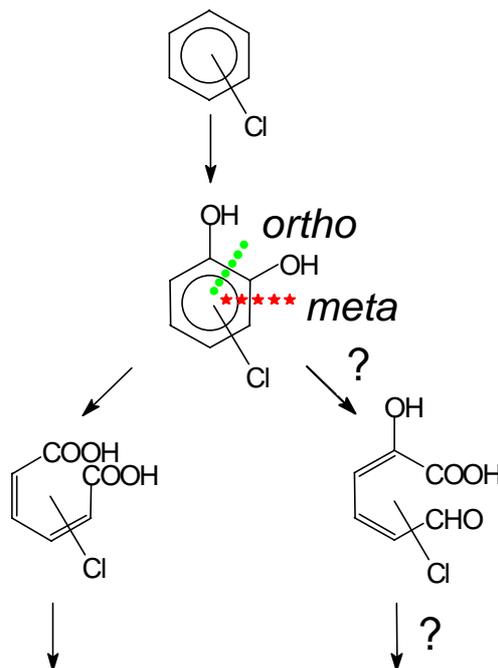
## **1.1 Die Umweltrelevanz anthropogener Schadstoffemissionen**

Chlorierte organische Verbindungen in ihrer Gesamtheit sind eine Stoffgruppe von höchster technischer und wirtschaftlicher Bedeutung. Die chemische Industrie der Bundesrepublik macht ca. 60 % ihres Umsatzes mit "Chlorchemie". Manche Chloraromaten werden mit dem Ziel produziert, sie in die Umwelt auszubringen. Andere werden nach Ende ihrer regulären Nutzung frei, wieder andere dadurch, dass Zwischenprodukte der Industrie ins Abwasser (oder in die Abluft) gelangen. Viele Chloraromaten können toxisch wirken, einige sind in der Umwelt außerordentlich persistent und zeigen aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften eine Anreicherung in der Nahrungskette. Dies führte dazu, dass eine ganze Reihe von chlorierten Aromaten zu den von der "Environmental Protection Agency" definierten "priority pollutants" gerechnet wird (EPA, 1979 und 1985).

Die Ausnutzung des mikrobiellen Abbau- bzw. Umwandlungspotentials eröffnet eine sichere und wirtschaftliche Alternative zur Lagerung von Umweltschadstoffen in Deponien bzw. zu gebräuchlichen physikochemischen Verfahren zum Entzug solcher Substanzen aus der Biosphäre. Für eine Reihe von Gefahrstoffen konnten Mikroorganismen isoliert werden, die diese Verbindungen unter Laborbedingungen mineralisieren. Die Anreicherung von hochtoxischen persistenten Stoffen in der Umwelt zeigt jedoch, dass entweder die mikrobielle metabolische Vielfalt nicht ausreicht oder die vorhandenen Bedingungen ungeeignet sind, um die Biosphäre vor dieser Verschmutzung zu schützen. Viele der persistenten Verbindungen enthalten Strukturelemente oder Substituenten, die natürlicherweise nicht oder nur in geringen Mengen vorkommen (Xenobiotika). Aufgrund der Neuheit dieser Verbindungen in der Biosphäre ist davon auszugehen, dass Mikroorganismen nicht genügend Zeit hatten, um entsprechende Abbauwege zu entwickeln. So ist für manche Xenobiotika kein Abbau bekannt, in anderen Fällen ist dieser unvollständig oder ineffizient oder komplexe Mischungen an kontaminierten Standorten verhindern einen Abbau durch bereits vorhandene Abbauwege.

## 1.2 Modifizierter *ortho*-Weg versus *meta*-Weg

Viele Chloraromaten sind zwar im Prinzip vollständig abbaubar, oft aber nur langsam oder nur nach ausreichender Adaptation der jeweiligen Mikroflora. Es gibt unterschiedliche Gründe für den fehlenden, unvollständigen oder im Vergleich zu den nicht-chlorierten Analoga verlangsamten Abbau von Chloraromaten. Trotz mancher Probleme gibt es Bakterien, die Chloraromaten aerob mineralisieren und sie als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Die Chloraromaten müssen wie auch nicht-halogenierte Aromaten in der Regel zunächst in eine aromatische Dihydroxyverbindung überführt werden, die dann der Ringspaltung durch Dioxygenierung unterliegt. Die Ringspaltung kann nun in bezug auf die beiden Hydroxyl-Gruppen proximal gespalten werden und es folgt eine weitere Metabolisierung der dabei entstehenden (chlorierten) Muconsäure über den (modifizierten) *ortho*-Weg. Bei einer distalen Spaltung erfolgt der weitere Abbau über den *meta*-Weg.



**Abb. 1.1** Abbau von Chloraromaten: Der *meta*-Weg, eine Alternative zum modifizierten *ortho*-Weg?

Normalerweise sind der *ortho*- und der *meta*-Weg inkompatibel, d.h. dass chlorierte Catechole über den *ortho*-Weg und methylierte Catechole über den *meta*-Weg metabolisiert werden. Der mikrobielle Abbau von Chloraromaten über Chlorcatechole und anschließend den modifizierten *ortho*-Abbauweg ist gut untersucht (DORN & KNACKMUSS, 1978 a, 1978 b;

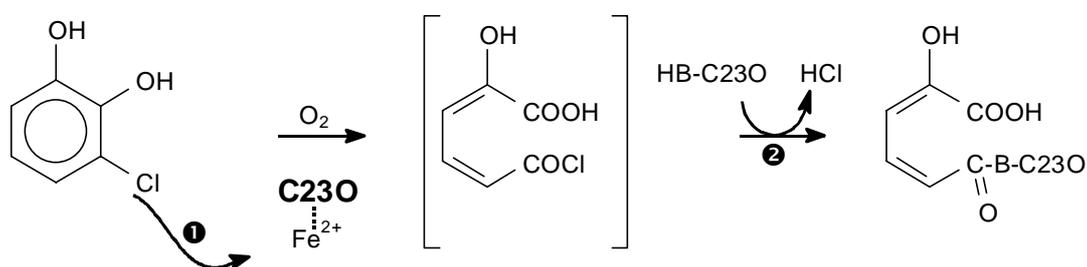
EVANS et al., 1971; KASCHABEK & REINEKE, 1992, 1995; MÜLLER et al., 1996; SCHMIDT & KNACKMUSS, 1980; SCHWIEN et al. 1988; VOLLMER & SCHLÖMANN 1995).

Zahlreiche Arbeiten belegen, dass methylierte Catechole nicht über den *ortho*-Weg metabolisiert werden können, da es dort zu einer Anhäufung von Methyl-Lactonen als sogenannten dead-end-Metaboliten kommt (CATELANI et al., 1971; KNACKMUSS et al., 1976; KNACKMUSS, 1981).

Hingegen galt der *meta*-Weg lange Zeit als ungeeignet für den Abbau von Chloraromaten (KNACKMUSS, 1981; PETTIGREW et al., 1991; ROJO et al. 1987), insbesondere dann, wenn 3-Chlorcatechol als Intermediat auftritt, da dieses als starker Inhibitor für extradiole Dioxygenasen agiert (ARENSDORF & FOCHT, 1994; BARTELS et al., 1984; HAIGLER & SPAIN, 1989; HIGSON & FOCHT, 1992; HOLLENDER et al., 1994; KLECKA & GIBSON, 1981).

Zwei Gründe für ein Versagen des *meta*-Weges für 3-Chlorcatechol wurden detailliert untersucht. BARTELS et al. (1984) konnten zeigen, dass die Inaktivierung der 2,3-Dioxygenase (XylE) von *Pseudomonas putida* PaW1 durch 3-Chlorcatechol ein irreversibler Prozess ist, der unter Sauerstoffverbrauch abläuft. Vermutlich setzt XylE 3-Chlorcatechol zu 2-Hydroxy-6-chlorcarboxymuconsäure um, bei dem es sich um ein reaktives Säurechlorid handelt und welches zu einer Inaktivierung durch Reaktion mit nukleophilen Gruppen des Enzyms führt. Durch diese sogenannte Suizid-Inaktivierung wird ein weiterer Umsatz des 3-Chlorcatechols über den *meta*-Weg vollständig verhindert.

Das Säurechlorid kann ebenso mit Wasser reagieren, welches dann zur Bildung von 2-Hydroxymuconsäure führt. Dieses Produkt wurde in geringen Mengen während der Umsetzung von 3-Chlorcatechol durch XylE beobachtet.



**Abb. 1.2** Inaktivierung der 2,3-Dioxygenase durch 3-Chlorcatechol: ❶ reversible Inaktivierung durch Chelierung des Fe<sup>2+</sup>-Ions der Dioxygenase, ❷ Suizid-Inaktivierung der 2,3-Dioxygenase durch Reaktion des intermediär gebildeten Säurechlorids mit nukleophilen Gruppen des Enzyms.

Im Gegensatz dazu beobachteten KLECKA & GIBSON (1981), dass die Catechol-2,3-Dioxygenase (TodE) aus *Pseudomonas putida* F1 durch 3-Chlorcatechol reversibel inaktiviert wurde.

Diese Beobachtung konnte durch die Chelierung des Eisen-Co-Faktors durch 3-Chlorcatechol erklärt werden (ELTIS & BOLIN, 1996).

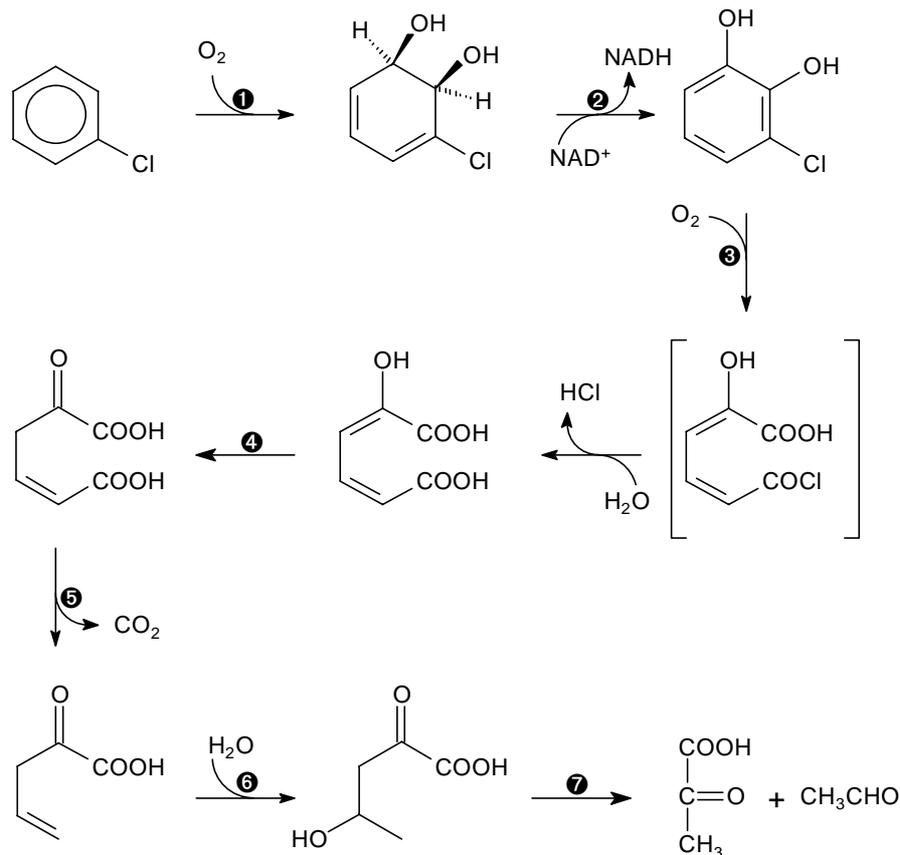
### **1.3 *Pseudomonas putida* GJ31: Mineralisierung von 3-Chlorcatechol über den *meta*-Weg**

Aus dem Rhein konnte der Organismus *Pseudomonas putida* Stamm GJ31 isoliert werden (OLDENHUIS et al., 1989), bei dem kürzlich die erstaunliche Eigenschaft nachgewiesen wurde, sehr effektiv mit Chlorbenzol zu wachsen, obwohl er den Abbau über 3-Chlorcatechol und den *meta*-Weg betreibt (MARS et al., 1997).

Nähere Untersuchungen zeigten die Anwesenheit eines neuen Typs von Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase (KASCHABEK et al., 1998). Dieses Enzym (CbzE) ist offensichtlich gegenüber dem intermediär auftretenden 2-Hydroxymuconsäurechlorid unempfindlich oder weniger empfindlich. Eine Resistenz des katalytischen Zentrums gegenüber diesem Säurechlorid hebt die Unvereinbarkeit des modifizierten *ortho*- und des *meta*-Weges auf. GJ31 besitzt demnach die Fähigkeit, mit Toluol und Chlorbenzol gleichzeitig zu wachsen.

Die Mineralisierung von Chlorbenzol durch *Pseudomonas putida* GJ31 beginnt mit der Dihydroxylierung durch eine Chlorbenzol-Dioxygenase und führt zum Chlorbenzoldihydrodiol (Abb. 1.3 auf der nächsten Seite). Dieses wird unter NAD<sup>+</sup>-Verbrauch durch die Chlorbenzoldihydrodiol-Dehydrogenase zum 3-Chlorcatechol rearomatisiert. Durch *meta*-Spaltung mittels Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase entsteht ohne Beeinträchtigung des Enzyms 2-Hydroxymuconsäure. Diese wird durch die Oxalocrotonat-Tautomerase in 4-Oxalocrotonsäure überführt, welche unter Abspaltung von Kohlendioxid durch die Oxalocrotonat-Decarboxylase in die 2-Oxopent-4-ensäure übergeht.

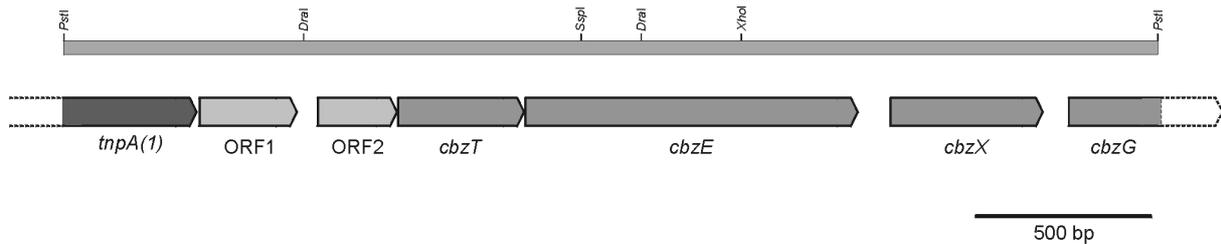
Eine Hydratase addiert nun Wasser an die Doppelbindung und die resultierende 4-Hydroxy-2-oxovaleriansäure unterliegt im folgenden einer Aldolspaltung durch 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase in Pyruvat und Acetaldehyd. Der Intermediärstoffwechsel ist damit erreicht.



**Abb. 1.3** Abbau von Chlorbenzol über den *meta*-Weg durch *Pseudomonas putida* GJ31. Die beteiligten Enzyme sind: **1** Chlorbenzol-Dioxygenase; **2** Chlorbenzoldihydrodiol-Dehydrogenase; **3** Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase; **4** Oxalocrotonat-Tautomerase; **5** Oxalocrotonat-Decarboxylase; **6** 2-Oxopent-4-enoat-Hydratase; **7** 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase

## 1.4 Die genetische Umgebung von *cbzE*

Der von MARS et al. (1997) gefundene offene Leserahmen *cbzE* codiert für die säurechlorid-stabile 2,3-Dioxygenase CbzE. Er ist vermutlich plasmidisch codiert und wurde in einer Region gefunden, die weitere degradative Gene enthält (Abb. 1.4 auf der nächsten Seite): ORF1: Teil einer Transposase; ORF2 und ORF3: nicht komplette Gene für Komponenten von Toluol- und Phenol-Monooxygenasen; *cbzT*: codiert für ein Ferredoxin, welches homolog zu XylT ist; *cbzX*: codiert für ein Enzym, welches hohe Ähnlichkeit mit einem Protein des *meta*-cleavage pathway mit unbekannter Funktion hat; *cbzG*: codiert für einen Teil einer 2-Hydroxy-2-oxovalerat-Dehydrogenase.



**Abb. 1.4** Schematische Anordnung der offenen Leserahmen und Gene des *meta*-Weges, die auf dem 3103 bp großen *Pst*I-Fragment um *cbzE* identifiziert werden konnten (nach MARS et al., 1997). Nicht vollständig sequenzierte Gene sind durch eine gestrichelte Umrandung dargestellt. Zum *cbzTEXG*-Operon zugehörige Gene sind dunkelgrau, offene Leserahmen hellgrau dargestellt. Die Darstellung ist maßstabsgetreu. Es sind nur die für den Verlauf der Arbeit wichtigen Restriktionsstellen angegeben.

Die Tatsache, dass *cbzE* downstream von einer Transposase angeordnet ist und die nicht publizierte Beobachtung, dass nach MARS et al. (1997) die durch Benzoat-Curing erhaltene Mutante GJ31M1 ein geringfügig kleineres Plasmid enthält und nicht mehr in Besitz von *cbzE* ist, legt die Vermutung nahe, dass sich der Abbau-Cluster *cbzTEXG* auf einem transponierbaren Element befinden könnte und unter nicht selektiven Bedingungen herausgetrennt wird. Solche Excisions-Vorgänge wurden auch schon bei TOL-Plasmid tragenden Organismen *Pseudomonas putida* PaW1 (mt-2) und dem zu PaW1 sehr ähnlichen Stamm HS1 beobachtet (BAYLEY et al., 1977; KEIL & WILLIAMS, 1985; KUNZ & CHAPMAN, 1981; WORSEY & WILLIAMS, 1977).

## 1.5 Transponierbare Elemente als Werkzeuge für neue Abbauwege

Alle bisher identifizierten transponierbaren Elemente, sogenannte Transposons, lassen sich bezüglich ihrer Komplexität in mehrere Gruppen einteilen (GRINDLEY & REED, 1995).

Im einfachsten Fall enthalten sie nur DNA-Elemente, die für die Transposition notwendig sind und/oder den Transpositionsprozess regulieren. Diese Elemente codieren für eine Transposase TnpA, die die Rekombinationsereignisse katalysiert und die mit dem Transpositionsergebnis einhergeht. Beispiele für einfache Transposons sind die in Bakterien beobachteten IS-Elemente, deren Längen zwischen 750 und 1500 bp liegen und die in der Regel nur ein Transposase-Gen enthalten, welches von zwei kurzen inversen terminalen Repetitionen eingeschlossen ist (SHAPIRO, 1983; BERG & HOWE, 1989). IS-Elemente und mit ihnen verwandte DNA-Sequenzen werden auch als Klasse I-Transposons bezeichnet. DNA-Bereiche, die von

IS-Elementen flankiert werden und deshalb ebenfalls als geschlossene Einheit transponiert werden können, werden zusammengesetzte Transposons genannt. Neben den für die Transposition erforderlichen Funktionen enthalten diese Transposons zusätzliche genetische Informationen, wie beispielsweise Antibiotika- und Schwermetall-Resistenzen oder häufig auch einzelne Gene bzw. vollständige Gencluster, die für einen Fremdstoffabbau codieren.

Ein Beispiel für ein Transposon dieser letztgenannten Gruppe bildet Tn5271 auf dem Plasmid pBRC60 aus *Alcaligenes* sp. BR60 mit einer Größe von 17 kbp, welches die Gene *cbaABC* für einen Teil des oberen Abbaupfades von 3-Chlorbenzoat beherbergt (NAKATSU et al., 1991). Ebenso befinden sich die zwei für den Chlorbenzolabbau codierenden Gene *tcbAB* aus *Pseudomonas* sp. P51 auf dem etwa 8,5 kbp großen Transposon Tn5280 (VAN DER MEER et al., 1991).

Eine weitere Gruppe transponierbarer Elemente bilden Klasse II-Transposons, zu denen das Transposon Tn3 und eine Familie verwandter Elemente gehört (GRINDLEY & REED, 1985; KLECKNER et al., 1975; GILL et al., 1978). Diese Elemente sind mit einer durchschnittlichen Länge von über 5 kbp wesentlich länger als IS-Elemente und haben, bis auf Reste, ursprünglich vorhandene IS-Sequenzen verloren. Tn3, das von kurzen inverted repeats eingerahmt wird, enthält im zentralen Teil ein Gen für eine  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin-Resistenz) und zwei Transpositionsgene, die Transposase TnpA und die Resolvase TnpR, wobei letztere sowohl als Repressor für die Expression von *tnpA* und von *tnpR* selbst wirkt, als auch die ortsspezifische Rekombinationsreaktion katalysiert, die für die Transposition von Bedeutung ist.

Klasse III-Transposons sind die Genome der miteinander verwandten Bakteriophagen Mu (TAYLOR, 1963) und D108 (MISE, 1971; HULL et al., 1978; GILL et al., 1981; GAELLEN & TOUSSAINT, 1980). Bei ihnen gehört die replikative Transposition zum normalen Verlauf einer Infektion und der vegetativen Vermehrung des Phagenoms. Allerdings kann anders als bei den zuvor besprochenen mobilen genetischen Elementen die Phagen-DNA als extrachromosomale Einheit existieren, da sie mit Strukturproteinen bedeckt wird und dann wie andere Bakteriophagen Bakterienzellen infiziert.

Durch die Integration eines katabolischen Transposons in einen DNA-Bereich können Mutationen mit verschiedenen Auswirkungen entstehen. So kann es durch das Integrationsereignis einerseits zu einer Unterbrechung der codierenden Region eines Gens oder der für seine Expression benötigten regulatorischen Regionen kommen (GALAS & CHANDLER, 1989; KALLASTU et al., 1998). Andererseits können durch Transpositionereignisse innerhalb einer Zelle Umlagerungen, Insertionen bzw. Deletionen erfolgen, die mehrere Gene unter die Kontrolle neuer regulatorischer Elemente bringen. In einigen Fällen beobachtet man auch die

Transkriptionsaktivierung von Genen, in deren Nachbarschaft ein Transposon integriert wurde (GALAS & CHANDLER, 1989; KALLASTU et al., 1998).

Transposon-vermittelte Umordnungen sind wohl auch dafür verantwortlich, dass ursprünglich entfernt voneinander lokalisierte Gene zu koordiniert regulierten Operons organisiert werden, und dass neue Proteine durch Verknüpfung zweier zuvor unabhängiger Genabschnitte gebildet werden können (OHTSUBO & SEKINE, 1996). Darüber hinaus wurden in verschiedenen nicht miteinander verwandten Bakterienstämmen identische Transposons gefunden (NAKATSU et al., 1991; SPRINGAEL et al., 1993; TSUDA et al., 1989; VAN DER MEER et al., 1991) – ein Hinweis darauf, dass im Gegensatz zur allgemeinen Rekombination die Transposon-vermittelte Übertragung genetischer Information zwischen verschiedenen Organismen nicht auf verwandte Spezies beschränkt ist und dass sich verschiedene degradative Gene durch horizontalen Gentransfer auch in entfernt verwandten Organismen weiterverbreiten und somit zur Entwicklung und Organisation neuer Operons mit neuen bzw. verbesserten Abbaueigenschaften führen können.

## 1.6 Konstruktion von Chloraromatenverwertern

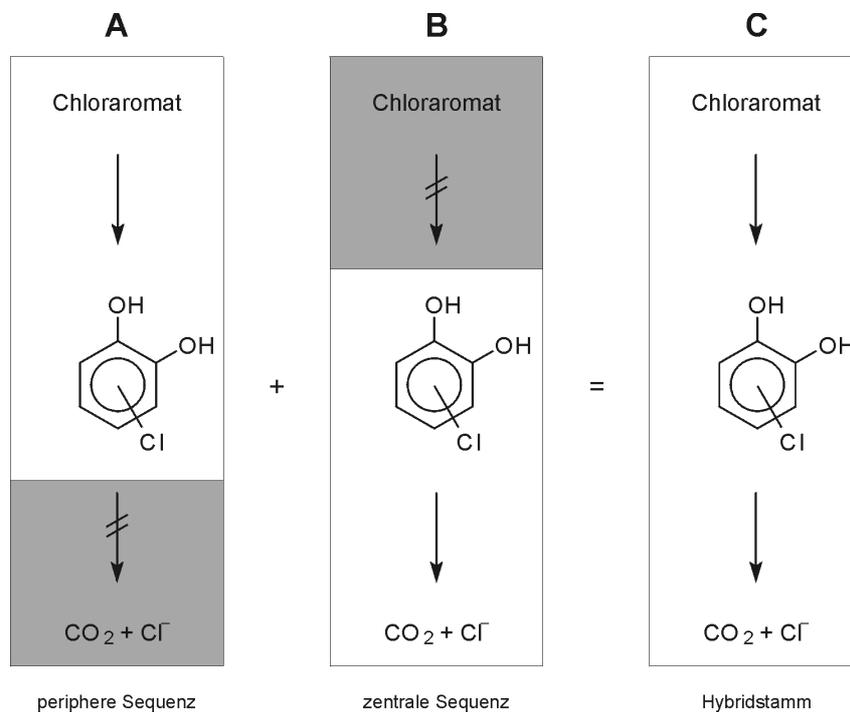
Die Entwicklung optimierter, zum Chloraromatenabbau befähigter Mikroorganismen kann durch Anreicherung von Mischpopulationen oder Reinkulturen aus Bodenproben mit anschließender Adaptation an einen bestimmten Schadstoff geschehen. Mit der Kombination aus Anreicherungs- und Adaptationsprozess ist allerdings ein in der Regel großer Zeitaufwand verbunden.

Alternativ können durch *in vitro*-Übertragung von Genen oder Genclustern, bzw. durch Mutagenese metabolische Hindernisse beseitigt werden.

Eine weitere, weniger aufwendige, aber sehr elegante Methode besteht in der *in vivo*-Konstruktion eines sogenannten hybriden Abbauweges für Chloraromaten, an dessen Ende Chlorid, CO<sub>2</sub> und Biomasse stehen.

Ein hybrider Chloraromatenabbauweg besteht aus zwei Teilsequenzen. Es ist dies zum einen eine periphere Sequenz aus Chloraromaten verwertenden Stämmen, mit der Fähigkeit, chloranalogue Substrate bis zur Stufe der chlorierten Catechole umzusetzen. Zum anderen wird eine Chlorcatechol abbauende zentrale Sequenz benötigt, beispielsweise der modifizierte *ortho*-Weg. Erleichtert wird dieses Prinzip zur Konstruktion von Chloraromatenverwertern durch

den Umstand, dass sowohl periphere als auch zentrale Abbausequenzen häufig plasmidisch lokalisiert und somit durch Konjugation leicht übertragbar sind.



**Abb. 1.5** Prinzip zur Konstruktion eines Hybridstammes **C** für den Abbau von Chloraromaten durch Kombination zweier partieller Abbaueg-Segmente **A** und **B** mit Chlorcatechol als zentralem Metaboliten nach REINEKE & KNACKMUSS (1979). (**A**) Periphere Enzymsequenz eines Chlorverbindungen abbauenden Stammes, der in der Lage ist, Chloraromaten bis zum Chlorcatechol umzusetzen; (**B**) zentrale Enzymsequenz für Chlorcatechole, wie zum Beispiel der *ortho*- oder der *meta*-Weg.

Da *Pseudomonas putida* GJ31 in der Lage ist, mit Toluol und Chlorbenzol gleichzeitig zu wachsen, erscheint die Konstruktion neuer Chloraromatenverwerter denkbar, die in der Lage sind, komplexe chlor- und methyl-substituierte Aromatengemische ohne die bislang beobachteten Einschränkungen zu verwerten.

Ebenso kann Stamm GJ31 4-Chlorcatechol verwerten. Die Eignung des *meta*-Weges für den Abbau von Chloraromaten über 4-Chlorcatechol kann demnach mit dem Stamm GJ31 untersucht werden. Durch Einkreuzung von genetischen Informationen, die für periphere Abbausequenzen codieren (z. B. das TOL-Plasmid als Träger der Xylol-Abbausequenz aus *Pseudomonas putida* PaW1), sollten nun schnell wachsende Organismen erzeugt werden können. Da Stämme, die auf chlorierten Benzoaten wachsen, leichter zu handhaben sind als solche mit Wachstum auf chlorierten Benzolen bzw. Toluolen, besteht die Möglichkeit, sie durch Selektion mit anderen Chlorisomeren weiter zu entwickeln.

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit:

Im Verlauf dieser Dissertation sollten die nachfolgend aufgeführten Punkte untersucht werden.

- Isolierung und Charakterisierung der von MARS et al. (1997) postulierten Plasmide, sowohl das aus *Pseudomonas putida* GJ31 als auch das aus der (durch Benzoat-Curing entstandenen) Mutante QM1
- Nachweis der plasmidischen Codierung von *cbzE* sowie Untersuchungen zu seiner Lage und zu seiner genetischen Umgebung
- Charakterisierung des, vermutlich durch ein Transpositionereignis, verloren gegangenen Fragmentes der Mutante QM1
- Identifizierung und Charakterisierung von weiteren degradativen Genen aus *meta*-Wege(n) (ggf. Klonierung, Sequenzierung und Überexpression)
- Identifizierung und Charakterisierung von degradativen Genen eines peripheren Abbauweges
- Etablierung eines Verfahrens zur Feststellung der Übertragungsrichtung bei ungerichtet ablaufenden Konjugationen der Wildtypstämme *Pseudomonas putida* GJ31 und *Pseudomonas putida* PaW1

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien, Enzyme und Kits wurden von folgenden Firmen bezogen:

#### Chemikalien:

$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dCTP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Agarose	Roche Diagnostics (Mannheim)
Antibiotika	Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg)
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics (Mannheim)
Chemikalien, p.a. Qualität	Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)
dNTP	Roche Diagnostics (Mannheim)
Hybond N <sup>+</sup> /P-Membranen	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Medienbestandteile	Difco (Detroit, USA), Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe)
NADPH	Roche Diagnostics (Mannheim)
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

#### Kits:

Advantage-GC cDNA PCR Kit	Clontech (Heidelberg)
DNeasy <sup>TM</sup> Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
Jet-Sorb-Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Nucleo Spin Kit	Macherey-Nagel (Düren)
PCR-Script <sup>TM</sup> Amp Cloning Kit	Stratagene (Heidelberg)
Proteinbestimmungs-Kit	BioRad (München)
Qiagen <sup>TM</sup> Large-Construct Kit	Qiagen (Hilden)

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen (Hilden)
ReadyToGo RAPD Analysis Beads	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
rediprime Random primer labelling Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Universal GenomeWalker™ Kit	Clontech (Heidelberg)
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

## Enzyme:

Alkalische Phosphatase CIP bzw. SAP	Roche Diagnostics (Mannheim)
DNA Polymerase I Klenow Fragment	Life Technologies (Karlsruhe)
Lysozym	Serva (Heidelberg)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach)
Taq-DNA-Polymerase (einschl. Puffer)	Life Technologies (Karlsruhe)
Vent-DNA-Polymerase (einschl. Puffer)	New England Biolabs (Schwalbach)
Advantage cDNA-Polymerase	Clontech (Heidelberg)

## 2.2 Verwendete Organismen

Die bei der Anfertigung der Arbeit verwendeten Organismen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

**Tab. 2.1** Übersicht der verwendeten Organismen

Organismus	Genotyp/Eigenschaften <sup>a)</sup>	Referenz/Herkunft
<i>Pseudomonas putida</i> GJ31	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>-</sup>	OLDENHUIS et al., 1989
<i>Pseudomonas putida</i> GJ31*	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , Nic <sup>-</sup>	REINEKE, pers. Mit.
<i>Pseudomonas putida</i> QM1	CB <sup>-</sup> , BA <sup>+</sup>	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> PaW1	TOL-Plasmid, 3MBA <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , Nic <sup>+</sup>	MURRAY et al., 1972
<i>Pseudomonas putida</i> PaW258	TOL-Plasmid, C23O <sup>-</sup> , 3MBA <sup>-</sup> , Xyl <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	WORSEY et al., 1978
<i>Pseudomonas putida</i> WR301	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	REINEKE, pers. Mit.
<i>Pseudomonas putida</i> WR303	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	REINEKE, pers. Mit.
<i>Pseudomonas putida</i> WR304	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	REINEKE, pers. Mit.

**Fortsetzung Tab. 2.1** Übersicht der verwendeten Organismen

<i>Pseudomonas putida</i> MK133	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	KUNZE, 1998
<i>Pseudomonas putida</i> WR311	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	REINEKE, pers. Mit.
<i>Pseudomonas putida</i> WR313	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	REINEKE, pers. Mit.
<i>Pseudomonas putida</i> WR314	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>-</sup>	REINEKE, pers. Mit.
<i>Pseudomonas putida</i> MK134	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>-</sup> , 3CT <sup>-</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>-</sup>	KUNZE, 1998
<i>Pseudomonas putida</i> MK314	CB <sup>-</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>-</sup> , 3CT <sup>-</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	KUNZE, 1998
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>hsdM</i> <sup>+</sup> <i>hsdR</i> <sup>+</sup> <i>rif</i> <sup>r</sup>	BAGDASARIAN et al., 1981
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	<i>hsdM</i> <sup>+</sup> <i>hsdR</i> <sup>+</sup>	BAGDASARIAN et al., 1981
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE</i> $\Delta$ <i>lacK169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	HANAHAN, 1983
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lac</i> <sup>f</sup> $\Delta$ M15, Tn10]	Stratagene, Heidelberg

<sup>a)</sup> Für die Pseudomonaden mit der Bezeichnung WR und MK sind die Eigenschaften aufgeführt, die für die Beschreibung des Abbauverhaltens von Wichtigkeit sind; Abkürzungen für die getesteten Wachstumssubstrate sind die folgenden: CB, Chlorbenzol; BA, Benzoat; 3MBA, 3-Methylbenzoat, 3CBA, 3-Chlorbenzoat; 4CBA, 4-Chlorbenzoat; 3CT, 3-Chlortoluol; 4CT, 4-Chlortoluol; Tln, Toluol; Xyl, *m*-Xylol; Nic, Nicotinat

## 2.3 Medien

Zur Kultivierung der verwendeten Organismen wurden unterschiedliche Medien benutzt. Die Stämme wurden sowohl in flüssigen Nährlösungen als auch auf festem Medium kultiviert, wobei letztere zusätzlich zur Nährlösung 1,5% (w/v) Agar enthielten.

Alle eingesetzten Puffer, Lösungen und Medien wurden vor der Anwendung autoklaviert. Nicht hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert (Sartorius Membranfilter, 0,2  $\mu$ m Porendurchmesser) und dem autoklavierten Medium oder Puffer nach dem Abkühlen zugesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde nur zweifach destilliertes Wasser verwendet. Glasgeräte wurden 4 h bei 180°C hitzesterilisiert. Soweit nicht anders vermerkt, beziehen sich alle prozentualen Angaben bei Feststoffen auf Gewichtsprozent (w/v), bei Flüssigkeiten auf Volumenprozent (v/v).

### 2.3.1 Medien für *Escherichia coli*

#### LB-Medium (MILLER, 1972)

10,0 g Pepton aus Casein  
 10,0 g NaCl  
 5,0 g Hefeextrakt  
 ad 1000 ml bidest. H<sub>2</sub>O

#### LB-Agar (MILLER, 1972)

LB-Medium  
 Agar (Gibco) 16 g/l

#### SOB-Medium

20,0 g Bacto-Trypton  
 50,0 g Bacto-Yeast  
 0,58 g NaCl  
 0,19 g KCl  
 2,03 g MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O  
 46,0 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O

#### SOC-Medium

SOB-Medium  
 20 mM Glucose

### 2.3.2 Medien für *Pseudomonas putida*

#### NB-Medium

8,0 g Nutrient-Broth  
 5,0 g NaCl  
 ad 1000 ml bidest. H<sub>2</sub>O

#### NB-Agar

NB-Medium  
 Agar (Gibco) 16 g/l

### 2.3.3 Mineralmedium

Grundlage der Mineralmedien ist die von DORN et al. (1974) angegebene chloridfreie und phosphatgepufferte Minerallösung, bei der zur besseren pH-Stabilisierung die Pufferkonzentration verdoppelt wurde (HARTMANN et al., 1979).

7,0	g	NaHPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
2,0	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,05	g	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
0,1	g	Fe(III)amoniumnitrat · 7 H <sub>2</sub> O
0,2	g	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
1,0	g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,0	ml	Spurenelementlösung nach PFENNIG & LIPPERT (1966) ohne EDTA und FeSO <sub>4</sub>
ad 1000	ml	bidest. H <sub>2</sub> O

Als Energie- und Kohlenstoffquelle fanden die jeweils angegebenen Substrate in Konzentrationen zwischen 2 und 10 mM Verwendung. Flüchtige Substrate wurden über die Gasphase zugeführt.

### 2.3.4 Antibiotika

Wenn erforderlich, wurde den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	100	µg/ml
Kanamycin	50	µg/ml
Rifampicin* (Methanol)	50	µg/ml
Streptomycin	100	µg/ml

\* Zur Herstellung der Stammlösung wurde kein Wasser, sondern das angegebene Lösungsmittel verwendet

## 2.4 Verwendete Vektoren und Plasmide

In den nachfolgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide (Tab. 2.2) und die konstruierten rekombinanten Plasmide (Tab. 2.3) verzeichnet.

**Tab. 2.2** Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide

Plasmid	Genotyp/Eigenschaften	Referenz
pKW1	<i>cbzE</i>	GJ31 (JANSSEN, Groningen, Niederlande)
pUC18	ColE1, <i>bla</i> , <i>lacZ</i> - $\alpha$ , $P_{lac}$	YANISH-PERRON (1985)
pJOE2702	ColE1, <i>bla</i> , $P_{rhaBAD}$ , <i>rrnB</i>	VOLFF et al. (1996)
pPCR bluescript SK+	ColE1 <i>f1 lacZ</i> Ap <sup>r</sup>	Stratagene, Heidelberg

**Tab. 2.3** Übersicht der konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen / Eigenschaft
pQW01a	720 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm PaW1 (Primer Qno01 und Qno02) in pUC18	16S rDNA
pQW02a	665 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm PaW1 (Primer Qno03 und Qno04) in pUC18	16S rDNA
pQW03a	603 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm PaW1 (Primer Qno05 und Qno06) in pUC18	16S rDNA
pQW01b	720 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno01 und Qno02) in pUC18	16S rDNA
pQW02b	665 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno03 und Qno04) in pUC18	16S rDNA
pQW03b	603 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno05 und Qno06) in pUC18	16S rDNA
pQW04	2819 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno13 und Qno14) in pBlue-scriptSK(+)	<i>cbzAa-d</i>
pQW04a	1517 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno09 und Qno10) in pBlue-scriptSK(+)	<i>cbzAa-d</i>

Fortsetzung Tab. 2.3 Übersicht der konstruierten rekombinanten Plasmide

pQW05	1206 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno43 und Qno44) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzE</i> (3)
pQW06	844 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno15 und Qno16) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzAa-d</i>
pQW07	1027 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno07 und Qno8) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzAa</i>
pQW08	1294 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno11 und Qno12) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzAd-B</i>
pQW09	733 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno26 und Qno27) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzK</i>
pQW10	1127 bp-PCR-Fragment aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno28 und Qno29) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzQ</i>
pQW11	840 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPD2 und <i>PvuII</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzK</i>
pQW12	1074 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPK2 und <i>SmaI</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	ORF2
pQW13	1338 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPK2 und <i>NruI</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	ORF2
pQW14	1598 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPK2 und <i>PvuII</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	ORF1, ORF2
pQW15	1792 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPK2 und <i>HincII/HpaI</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	ORF1, ORF2
pQW16	577 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPC2 und <i>AseI</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzJ</i>
pQW17	1014 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPC2 und <i>PvuII</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzJ</i>

Fortsetzung Tab. 2.3 Übersicht der konstruierten rekombinanten Plasmide

pQW18	1300 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPC2 und <i>NruI</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzJ</i> , <i>cbzF</i>
pQW19	724 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPE2 und <i>StuI</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzF</i>
pQW20	1699 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPF2 und <i>HincII</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>cbzE</i> (2)
pQW20a	702 bp- <i>StuI</i> - <i>StuI</i> -Fragment aus pQW20 in pBluescriptSK(+)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW20b	852 bp- <i>HincII</i> - <i>StuI</i> -Fragment aus pQW20 in pBluescriptSK(+)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW21	2239 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPH2 und <i>HincII</i> / <i>HpaI</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>gntR</i> , ORF3, ORF4
pQW21a	507 bp- <i>HincII</i> - <i>PstI</i> -Fragment aus pQW21 in pBluescriptSK(+)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW21b	1370 bp- <i>PstI</i> - <i>HincII</i> / <i>HpaI</i> -Fragment aus pQW21 in pBluescriptSK(+)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW22	3382 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno17 und Qno18) in Zero Blunt Topo	<i>cbzG</i> , GST, <i>tnpA</i> (2)
pQW22a	1454 bp- <i>HindIII</i> -Fragment aus pQW22 in Zero Blunt Topo	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW22b	1928 bp- <i>HindIII</i> -Fragment aus pQW22 in Zero Blunt Topo	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW23	1627 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPA2 und <i>PvuII</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>tnpA</i> (1)
pQW23a	790 bp-Fragment durch Primer Qno30 und Qno31 aus beidseitiger Ansequenzierung von pQW23	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW24	3825 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPA2 und <i>AseI</i> -Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>traF</i> , <i>traG</i> , <i>tnpA</i> (1)
pQW24a	2198 bp- <i>PvuII</i> - <i>AseI</i> -Fragment aus pQW24 in pBluescriptSK(+)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung

**Fortsetzung Tab. 2.3** Übersicht der konstruierten rekombinanten Plasmide

pQW24b	961 bp-Fragment durch Primer Qno32 und Qno33 aus beidseitiger Ansequenzierung von pQW23	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW25	895 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPG2 und <i>Stu</i> I-Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>traF</i>
pQW26	1620 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPG2 und <i>Hinc</i> II-Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>traO</i> , <i>traF</i>
pQW27	2620 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPG2 und <i>Sma</i> I-Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>traE</i> , <i>traO</i> , <i>traF</i>
pQW27a	725 bp- <i>Hinc</i> II- <i>Stu</i> I-Fragment aus pQW27 in pBluescriptSK(+)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW28	2970 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPG2 und <i>Pvu</i> II-Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>traN</i> , <i>traE</i> , <i>traO</i> , <i>traF</i>
pQW28a	1000 bp- <i>Hinc</i> II- <i>Sma</i> I-Fragment aus pQW28 in pBluescriptSK(+)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW29	413 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPB2 und <i>Hpa</i> I-Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>tnpA</i> (2)
pQW30	2209 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPB2 und <i>Eco</i> RV-Schnitt) in pBluescriptSK(+)	<i>tnpA</i> (2), <i>cbzJ</i>
pQW30a	1193 bp-Fragment durch Primer Qno34 und Qno35 aus beidseitiger Ansequenzierung von pQW30	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pQW31	2196 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPJ2 und <i>Nru</i> I-Schnitt) in pBluescriptSK(+)	IS1071
pQW32	1224 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer GSPJ2 und <i>Hinc</i> II-Schnitt) in pBluescriptSK(+)	IS107, Tn5501
pQW33	1305 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno36 und Qno37) in pBluescriptSK(+)	Tn5501
pQW34	2011 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno36 und Qno38) in pBluescriptSK(+)	Tn5501

**Fortsetzung Tab. 2.3** Übersicht der konstruierten rekombinanten Plasmide

pQW35	2725 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno36 und Qno39) in pBlue-scriptSK(+)	Tn5501
pQW36	3354 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno36 und Qno40) in pBlue-scriptSK(+)	Tn5501
pQW37	4121 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno36 und Qno41) in pBlue-scriptSK(+)	Tn5501
pQW38	4900 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer Qno36 und Qno42) in pBlue-scriptSK(+)	Tn5501
pXPG	1494 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer cbzG-XP-1 und cbzG-XP-2) in Expressionsvektor pJOE2702	cbzG
pXPJ	846 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer cbzJ-XP-1 und cbzJ-XP-2) in Expressionsvektor pJOE2702	cbzJ
pXPE2	983 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer cbzE(2)-XP-1 und cbzE(2)-XP-2) in Expressionsvektor pJOE2702	cbzE(2)
pXPF	959 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer cbzF-XP-1 und cbzF-XP-2) in Expressionsvektor pJOE2702	cbzF
pXPJ2	849 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer cbzJ-XP-3 und cbzJ-XP-4) in Expressionsvektor pJOE2702	cbzJ(2)
pXPQ	974 bp-PCR-Fragment aus Plasmid-DNA von <i>Pseudomonas putida</i> Stamm GJ31 (Primer cbzQ-XP-1 und cbzQ-XP-2) in Expressionsvektor pJOE2702	cbzQ

## 2.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Sie wurden ausschließlich von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Unterstrichene Basen kennzeichnen die eingeführten Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen.

Tab. 2.4 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Gen
Qno01	5' - GGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGA - 3'	16S rDNA
Qno02	5' - TCGCACCTCAGTGTCTCAGTATCAGTC - 3'	16S rDNA
Qno03	5' - AGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGT - 3'	16S rDNA
Qno04	5' - GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGT - 3'	16S rDNA
Qno05	5' - GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG - 3'	16S rDNA
Qno06	5' - TAAGGAGGTGATCCAGCCGCAGGTT - 3'	16S rDNA
Qno07	5' - ACCATCCGTTCTGAAAGCACGTCATCGGCA - 3'	<i>cbzAa</i>
Qno08	5' - GGGGAAGACGGTCATGTGCTCGACCATGAG - 3'	<i>cbzAa</i>
Qno09	5' - CGAGATCCAGCACATCCTGCGAGGCCACAA - 3'	<i>cbzAa-d</i>
Qno10	5' - TCCGCAGAGAGCGTGGTGCCATCATCCAGA - 3'	<i>cbzAa-d</i>
Qno11	5' - GACGCTTGCCCAAGGCGTATTCGCC - 3'	<i>cbzB</i>
Qno12	5' - CTTTGAATGCTCATGACACTTCTCC - 3'	<i>cbzB</i>
Qno13	5' - GGCGAGGCGAAGTTCTACATGGACC - 3'	<i>cbzAB</i>
Qno14	5' - CAT(CT)TGCAT(GCT)CGATGCC(AG)GC(AG)ATC - 3'	<i>cbzAB</i>
Qno15	5' - GAGCCGACGTCTTTCTCCGCAAGCCGGCAC - 3'	<i>cbzAa-b</i>
Qno16	5' - CACTTCATCGCCTTCGACCTTGATTGGGAA - 3'	<i>cbzAa-b</i>
Qno17	5' - GTCAGCGGCAAGACCTACGAGAAGCGCAAC - 3'	<i>cbzG</i>
Qno18	5' - GTAGATACGGGCCATCAGCACCGCCACAA - 3'	<i>cbzG</i>
Qno19	5' - GGCGGTTTATGACCTCGTGTAGCCCCACCT - 3'	<i>cbzG</i>
Qno20	5' - TGCAGGCGAGGGCGCACTTGGGGTA - 3'	<i>tmpA(1)</i>
Qno21	5' - ACTGACGCGCTGATCGACCTCGAAG - 3'	<i>tmpA(1)</i>
Qno22	5' - AGGGTTCGTTTCATCAACGAACGAG - 3'	<i>cbzE</i>
Qno23	5' - CAAGCTGATGAATCAAGACTTGGGG - 3'	<i>cbzE</i>
Qno24	5' - ATCAGCGCGTCAGTTGGTAG - 3'	<i>cbzT</i>
Qno25	5' - TGCAGCAGACTCTCATCCGT - 3'	<i>cbzT</i>
Qno26	5' - A(AG)GT(GC)ACCCACGG(CT)GA(CT)GGC - 3'	<i>cbzK</i>
Qno27	5' - (AC)(AG)TAGAC(GC)CC(GC)GC(AG)TA(AG)CCC - 3'	<i>cbzK</i>
Qno28	5' - TGGCAACATTGGTACCGATCTGATG - 3'	<i>cbzQ-K</i>
Qno29	5' - TTCAATCCACTCGATGTCCGGTATGC - 3'	<i>cbzQ-K</i>
Qno30	5' - CTACGAGAGCTGGCTGGAGCTGGCTTGCGA - 3'	<i>tmpA(1)</i>
Qno31	5' - AAAACCCGCTGTGCTTGTAGCCCAGCATCT - 3'	<i>tmpA(1)</i>
Qno32	5' - CATGGACATGGCCCTGGCGGCGGCGAACTT - 3'	<i>traF</i>
Qno33	5' - CGGGTCGTACAGGATTTCCAGCACTTCACG - 3'	<i>traF</i>
Qno34	5' - ATCAGCGCGTCAGTTGGTAGGGTGGCAACA - 3'	Tn5501
Qno35	5' - AGGCGCCTCCACCGCCGCTCACTGGTCAA - 3'	Tn5501

Fortsetzung Tab. 2.4 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Qno36	5' - CGGCTGCGGCTCATGATGTGGTTGTCTCCA - 3'	Tn5501
Qno37	5' - TCCGACGACACGCGCATGTAGCCAACCAAC - 3'	Tn5501
Qno38	5' - CTGCAGGCTAGGCCGGCTGCTGG - 3'	Tn5501
Qno39	5' - ACGTACCCAGGCATAGCACAGCAGGTAGAG - 3'	Tn5501
Qno40	5' - GGACAAATGCCGGTGTGCAAGCTATCGTC - 3'	Tn5501
Qno41	5' - GTTGCGGTACCAGATGTGCAACACGTGGTG - 3'	Tn5501
Qno42	5' - GGTGTGTACGCCGAATCCCAGAAATTTCCG - 3'	Tn5501
Qno43	5' - TTCCATTGGACGACATGCTGAAATCCGTTC - 3'	<i>cbzE</i> (3)
Qno44	5' - CCTCGATTAACACCTTCCAGGATTTTTGCG - 3'	<i>cbzE</i> (3)
AP1	5' - GTAATACGACTCACTATAGGGC - 3'	Hilfsprimer 1
AP2	5' - ACTATAGGGCACGCGTGGT - 3'	Hilfsprimer 2
GSPA 1	5' - ATGATGTGCATTTGCCCGCCGAGATG - 3'	<i>traG</i> , <i>tnpA</i> (1)
GSPA 2	5' - GCCATCAGCACCGCCACAAATAGTGC - 3'	<i>traG</i> , <i>tnpA</i> (1)
GSPB 1	5' - TGCCGTACGGCGCTGGCGCGTGATGCAGC - 3'	<i>tnpA</i> (1), <i>cbzJ</i>
GSPB 2	5' - GAGCCAGCCAGCACGGCTGCAGGCGAGGGC - 3'	<i>tnpA</i> (1), <i>cbzJ</i>
GSPC 1	5' - ATTTTCACAAGACCCGCAACACCCTCGTGG - 3'	<i>cbzJ</i> (2)
GSPC 2	5' - ACTGCCATTTCCAAGTGTCTCGGCATTACGC - 3'	<i>cbzJ</i> (2)
GSPD 1	5' - ATGGATGCTGCAGATGATCTGGTGCCTCCA - 3'	<i>cbzK</i> , ORF2
GSPD 2	5' - ATCGACCGTTGAAACCCTGGCTCTAGGTTA - 3'	<i>cbzK</i> , ORF2
GSPE 1	5' - GCCCCAGATAACCAAGGTCTCTGCGTTGA - 3'	<i>cbzF</i>
GSPE 2	5' - AACCGCGTCTGGAACAGCTCCTCAGTCAGA - 3'	<i>cbzF</i>
GSPF 1	5' - CGTGGAGCATCACAACGGTTTCTTTGCCTT - 3'	<i>cbzE</i> (2)
GSPF 2	5' - TCTCCGTGAAGGTGTATTAGCGCTGGGTGT - 3'	<i>cbzE</i> (2)
GSPG 1	5' - AAACGGCTTCGCCGTGATTGACGGTCA - 3'	<i>traN-F</i>
GSPG 2	5' - GTGTCGCTGTCCGACTTGTCCGGTGGAG - 3'	<i>traN-F</i>
GSPH 1	5' - CCGACGAGCGACAACAGCGAAAATGACTGA - 3'	<i>gntR</i> , ORF3, ORF4
GSPH 2	5' - CATATCTTGGAGCGCTACTCACTTGCCGA - 3'	<i>gntR</i> , ORF3, ORF4
GSPJ 1	5' - TGCCTGCAAGGGGTATCCGCTTAGCTCCAT - 3'	Tn5501
GSPJ 2	5' - CGCCGGTTGAAACGGAACACGAATTCATCG - 3'	Tn5501
GSPK1	5' - AGTGCTCATCGTGTCCGGTGGCACTATTCCG - 3'	ORF1, ORF2
GSPK2	5' - CGCATCGCTGCCAAACCTGATTGCCCTGGC - 3'	ORF1, ORF2
<i>cbzE</i> (2)-XP-1	5' - <u>GTACATATGAACGCTTACCTACATTGCCTG</u> - 3'	<i>cbzE</i> (2)
<i>cbzE</i> (2)-XP-2	5' - TGCAGTCACGATTAAGGATCCGTGAAGGTG - 3'	<i>cbzE</i> (2)
<i>cbzF</i> -XP-1	5' - <u>TCCCATATGGATCGCAGGCTTCGGCTCTAT</u> - 3'	<i>cbzF</i>
<i>cbzF</i> -XP-2	5' - TGTGAAGTGTCCATGCGGATCCTCGGTGAG - 3'	<i>cbzF</i>
<i>cbzG</i> -XP-1	5' - TCAAGAGAGAGACATATGAAAGACATCAGG - 3'	<i>cbzG</i>

**Fortsetzung Tab. 2.4** Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

cbzG-XP-2	5´ - AATGGGGGCACAGGATCCTCAATAC - 3´	<i>cbzG</i>
cbzJ-XP-1	5´ - AGCCCATATGACCCAGACGCCCAA - 3´	<i>cbzJ</i>
cbzJ-XP-2	5´ - ACCGGGTTGATGTGCAGGGGATCCG - 3´	<i>cbzJ</i>
cbzJ-XP-3	5´ - TCACATATGAACACTTCACAAGAGACCCTT - 3´	<i>cbzJ(2)</i>
cbzJ-XP-4	5´ - AGCCAAGGATCCCAACTTTACGTTTGGTAG - 3´	<i>cbzJ(2)</i>
cbzQ-XP-2	5´ - TTTTCATATGACTACCAAACGTAAAGTTGCC - 3´	<i>cbzQ</i>
cbzQ-XP-2	5´ - GAGCTTTTTTACGGATCCTAACTGCGCT - 3´	<i>cbzQ</i>

## 2.6 Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien

### 2.6.1 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Stämmen erfolgte in LB-Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten bei 37°C. Dem LB-Agar wurde zur Selektion rekombinanter pUC18- bzw. pBlue-script-Derivate 40 µg/ml X-Gal zugesetzt. Dauerkulturen wurden aus Übernachtskulturen durch Zugabe von 50% Glycerin hergestellt und bei -70°C aufbewahrt. Als Übernachtskulturen werden Ansätze bezeichnet, die mindestens 16 h kultiviert worden sind.

### 2.6.2 Anzucht und Lagerung von *Pseudomonas putida*

Vorkulturen wurden in 100 ml Schikanenkolben angezogen, welche 20 ml Nährlösung enthielten. Die Konzentrationen der Nährstoffe betrug 5 mM.

Die für die Herstellung von Rohextrakten benötigten größeren Zellmengen wurden in 3000 ml Schikanenkolben mit 500 ml Medium gewonnen. In diesen Hauptkulturen betragen die Konzentrationen der Nährstoffe zwischen 5 und 10 mM.

Alle Kulturen wurden bei 31°C auf einem Rotationsschüttler (Typ RC 106, Infors AG, Basel/Schweiz bzw. Gyrotory water bath shaker Typ G 76, New Brunswick, N.J., USA) bei etwa 100 Upm inkubiert.

### **2.6.3 Stammhaltung**

Die Aufbewahrung der Stämme erfolgte bei 4°C auf Agarplatten (1,5 Gew.% Agar, 50 mM Phosphatpuffer pH 7,3, Salzlösung wie unter 2.3.), die 2-10 mM stammspezifische Kohlenstoffquelle als Selektivmedium enthielten. Flüchtige Substrate wurden über die Gasphase zugeführt, die Agarplatten in dafür geeigneten Glasgefäßen aufbewahrt.

Die Stämme wurden alle 6 - 8 Wochen überimpft.

### **2.7 Trübungsmessung**

Die optische Dichte der Zellsuspensionen wurde durch Extinktionsmessungen bei 546 nm und einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer (Uvikon 820, Kontron, Eching) ermittelt. Zum Nullabgleich diente Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,3).

Sobald die Extinktion den Wert von 0,3 überschritt, wurde die Probe entsprechend verdünnt.

Alternativ wurde die Trübung von Zellsuspensionen bei Wachstumsmessungen mit einem Klettphotometer (Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter, Mod. 900-3, Klett MFG Co. Inc., N.J. USA) ermittelt. Zehn Kletteinheiten entsprachen dabei einer Dichte von 0,070 Extinktionseinheiten (EE).

### **2.8 Zellernte und Herstellung von zellfreien Proteinextrakten**

Kulturen, die sich kurz vor dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont, Bad Nauheim) bei einer Temperatur von 4°C zwanzig Minuten bei 8000 Upm zentrifugiert. Nach zweimaliger Wäsche der Zellrückstände mit Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,0 + 0,5 mM Dithioerythrit) erfolgte Resuspension in etwa 5 ml des gleichen Puffers.

Die resuspendierten Zellen wurden nach Zugabe von Desoxyribonuklease mit einer auf 4°C vorgekühlten French-Press (Amicon, Silver Spring/USA) bei einem Druck von 14 Mpa aufgeschlossen. Noch verbliebene ganze Zellen und Zelltrümmer wurden anschließend in einer Ultrazentrifuge (Sorvall OTD-50B, Du Pont, Bad Nauheim) bei 105 g (60 min, 4°C) abzentrifugiert. Die Sedimente wurden verworfen, die Überstände abpipettiert und für enzy-

matische Untersuchungen verwendet. Sie werden im weiteren als Rohextrakte bezeichnet. Die Lagerung der Rohextrakte erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Proteinbestimmungs-Kits (BioRad, München) nach der Methode von BRADFORD (1976) spektralphotometrisch bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

## **2.10 Herstellung von Expressionsstämmen**

Die Überexpression von Proteinen erfolgte mit dem L-Rhamnose induzierbaren Vektor pJOE2702 in *E. coli* XL1-Blue. Dazu wurden von den betreffenden Genen über PCR *NdeI*-*Bam*HI-Fragmente erzeugt und in mit *NdeI* und *Bam*HI behandelten pJOE2702 ligiert. Nach Transformation in *E. coli* XL1-Blue wurden die Zellen, wie unter 2.6.1 beschrieben, angezogen. Zur Induktion des Promotors  $P_{\text{rhaBAD}}$  wurde das Medium mit 0,2% L-Rhamnose angereichert. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte wie unter 2.11 beschrieben.

## 2.11 Bestimmungen von Enzymaktivitäten

Die Berechnung der spezifischen Enzym-Aktivitäten erfolgte nach der Gleichung:

$$C = \frac{\Delta E \cdot V_1}{\epsilon \cdot d \cdot V_2 \cdot c_p} \quad (\text{mol/s} \cdot \text{mg Protein})$$

C	=	spezifische Enzym-Aktivität [kat]	d	=	Küvettdurchmesser [cm]
$\Delta E$	=	Extinktionsänderung [1/s]	$V_2$	=	Volumen der eingesetzten Probe [ $\mu\text{l}$ ]
$V_1$	=	Volumen des Testansatzes [ $\mu\text{l}$ ]	$c_p$	=	Proteinkonzentration der eingesetzten Probe [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
$\epsilon$	=	molarer Extinktionskoeffizient [l/mol]			

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte in 1 cm Quarzküvetten wahlweise mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvikon 710, Kontron Instruments, Zürich/Schweiz) und angeschlossenem Schreiber (Uvikon Recorder 21) oder mit einem Spektralphotometer (Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer, Varian, Australien).

Eine Enzymeinheit (U) wird definiert als die Aktivität, die den Umsatz von 1  $\mu\text{mol}$  Substrat bzw. die Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  Produkt in einer Minute bei 25°C katalysiert. Die spezifische Aktivität wird in Einheiten pro Milligramm Protein angegeben.

### 2.11.1 Catechol-2,3-Dioxygenase, C23O (*meta*-Pyrocatechase)

Catechol-2,3-Dioxygenase setzt das Substrat Catechol zu 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat [HOMS] um. Die Bildung dieses Produktes kann anhand der Extinktionszunahme bei 375 nm verfolgt werden. Die Testansätze enthielten nach SCHACHT (1984) und SALA-TREPAT & EVANS (1971) in einem Volumen von 1 ml:

45	$\mu\text{mol}$ Phosphat-Puffer, pH 7,4
0,5	$\mu\text{mol}$ Catechol oder 4-Chlorcatechol
1-5	$\mu\text{l}$ Rohextrakt

Für das Ringspaltungsprodukt des Catechols (2-Hydroxy-5-formylpenta-2,4-dienoat) beträgt der molare Extinktionskoeffizient bei 375 nm  $\epsilon_M = 36.000$  l/mol cm; für das Spaltungsprodukt von 4-Chlorcatechol (5-Chlor-5-formyl-2-hydroxypenta-2,4-dienoat) bei 379 nm  $\epsilon_M = 42700$  l/mol cm. Beide Werte wurden von SCHACHT (1984) bei pH = 7,4 in Phosphatpuffer bestimmt.

### 2.11.2 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, HMSD

Die Aktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase wurde durch die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Bildung eines gelben Ringöffnungsproduktes aus Catechol bei einer Wellenlänge von 375 nm ermittelt. Der Reaktionsansatz enthielt nach BAYLY & DAGLEY, 1969 in 1 ml:

45	$\mu\text{mol}$ Phosphatpuffer, pH 7,4
60	nmol 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat
0,5	$\mu\text{mol}$ $\text{NAD}^+$
1-10	$\mu\text{l}$ Rohextrakt

Das 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat wurde frisch hergestellt (siehe 2.11.9). Um die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität zu erhalten, wurde vom Wert der Abbaugeschwindigkeit des 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoats die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase-Aktivität subtrahiert.

### 2.11.3 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, HMSH

Die  $\text{NAD}^+$ -unabhängige Konzentrationsabnahme des gelben Ringspaltungsproduktes von Catechol wurde bei einer Wellenlänge von 375 nm gemessen.

Die Testansätze enthielten nach MARS et al. (1997) in einem Volumen von 1 ml:

45	μmol Phosphatpuffer, pH 7,4
60	nmol 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat
1-10	μl Rohextrakt

Das 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat wurde frisch hergestellt (siehe 2.11.9).

#### 2.11.4 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, OI

In eine 1 ml-Quarzküvette wurden Puffer und Substrat vorgelegt, der Blindwert beobachtet, anschließend 10 μl Rohextrakt hinzugegeben und die Abnahme der Extinktion ( $\epsilon = 24100 \text{ l/mol cm}$ ) bei 295 nm beobachtet (SALA-TREPAT & EVANS, 1971; HARAYAMA et al., 1989; WHITMAN et al., 1992). Die Messung erfolgte nach Einstellung des Gleichgewichtes (WHITMAN et al., 1991). Der Blindwert ohne Zellextrakt wurde von der enzymbedingten Abnahme subtrahiert.

Die Testansätze enthielten in einem Volumen von 1 ml:

10	μmol 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,3
0,08	μmol 2-Hydroxymuconsäure (gelöst in Ethanol)
10	μl Rohextrakt

#### 2.11.5 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, OD

In einer Küvette wurden 456 μl, Tris-HCl-Puffer,  $\text{MgSO}_4$  und Oxalocrotonat vorgelegt, die Reaktion durch Zugabe von 10 μl Rohextrakt gestartet, mit Hilfe von 534 μl Stopplösung (0,3 M NaOH, 16 mM EDTA) angehalten und die Extinktion bei 350 nm gemessen (SALA-TREPAT & EVANS, 1971; HARAYAMA et al., 1989). Die Abnahme der Extinktion ließ sich verfolgen, indem die Reaktionszeit immer weiter verlängert wurde und so die 4-Oxalocrotonat-konzentration linear abnahm.

Reaktionslösung: 466  $\mu$ l

50	$\mu$ mol Tris-HCl-Puffer, pH 7,4
1	$\mu$ mol $MgSO_4$
0,1	$\mu$ mol 4-Oxalocrotonat
10	$\mu$ l Rohextrakt

Stopplösung: 534  $\mu$ l

150	$\mu$ mol NaOH
8	$\mu$ mol EDTA

Es wurde eine Eichgerade zwischen 0 - 80  $\mu$ M 4-Oxalocrotonat erstellt, um die Menge umgesetztes Substrat zu bestimmen.

### 2.11.6 2-Oxopent-4-enoat-Hydratase, OEH

In 1 ml Gesamtvolumen wurden nach COLLINSWORTH et al. (1973) Phosphatpuffer,  $MgCl_2$  und frisch hergestelltes Vinylpyruvat ( $\epsilon = 10.000$  l/mol cm) in einer Quarzküvette vorgelegt und die Blindreaktion bei 265 nm beobachtet. Die verstärkte Extinktionsabnahme infolge der Zugabe von Rohextrakt wurde bestimmt und der Blindwert von der Aktivität subtrahiert. Die Synthese von Vinylpyruvat wird unter 2.11.10 beschrieben.

Die Testansätze enthielten in einem Volumen von 1 ml:

50	$\mu$ mol Phosphatpuffer, pH 7,2
0,33	$\mu$ mol $MgCl_2$
0,2	$\mu$ mol Vinylpyruvat
10	$\mu$ l Rohextrakt

### 2.11.7 4-Hydroxy-2-ketovalerat-Aldolase, HOA

Die Aktivität der 4-Hydroxy-2-ketovalerat-Aldolase wurde in einem mit Lactat-Dehydrogenase gekoppelten Test gemessen. Als Messsignal diente die bei der Oxidation von NADH verursachte Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 340 nm. Um das bei der Reaktion entstehende Pyruvat umzusetzen, wurde dem Reaktionsansatz Lactat-Dehydrogenase im Überschuss zugesetzt (SALA-TREPAT & EVANS, 1971).

1 ml des Reaktionsansatzes enthielt nach SHINGLER et al. (1992) in einer leicht abgeänderten Zusammensetzung:

46	µmol Phosphat-Puffer, pH 7,5
1,0	µmol MnCl <sub>2</sub>
260	µmol NADH
10-50	µl Rohextrakt
	Lactat-Dehydrogenase im Überschuss
260	µmol 4-Hydroxy-2-oxoalderat

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4-Hydroxy-2-oxoalderat gestartet (Synthese unter 2.11.11). 1 Unit ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol NADH in Anwesenheit von überschüssiger Lactat-Dehydrogenase pro Minute reduziert.

### 2.11.8 Acetaldehyd-Dehydrogenase, ADA

In 1 ml Reaktionsansatz wurden Phosphatpuffer, Acetaldehyd, NAD<sup>+</sup> und Rohextrakt pipettiert. Die Reduktion von NAD<sup>+</sup> wurde durch Zugabe von Coenzym A gestartet und durch die Extinktionsänderung bei 340 nm verfolgt. 1 Unit ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol NAD<sup>+</sup> in Anwesenheit von Coenzym A pro Minute reduziert.

Die Testansätze enthielten nach SHINGLER et al. (1992) in einem Volumen von 1 ml:

50	μmol Phosphat-Puffer, pH 7,5
10	μmol Acetaldehyd
285	μmol NAD <sup>+</sup>
100	μl Rohextrakt
100	μmol Coenzym A

### 2.11.9 Synthese von 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat

Zur Synthese von 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat nach BAYLY et al. (1969) wurde Rohextrakt von *Pseudomonas putida* PaW1, der mit 3-Methylbenzoat als alleiniger Kohlenstoffquelle gewachsen war, für 10 min. bei 55°C inkubiert. Die Catechol-2,3-Dioxygenase ist unter diesen Konditionen stabil, während unter anderem die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase denaturiert. Nach dem Abzentrifugieren der gefällten Proteine enthielt der Überstand Catechol-2,3-Dioxygenase ohne Folgeenzyme. Die so gewonnene Dioxygenase setzte 3-Methylcatechol in Mineralmedium zu 2-Hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoat um. Die Vollständigkeit des Umsatzes konnte durch Zugabe überschüssiger Catechol-2,3-Dioxygenase kontrolliert werden.

### 2.11.10 Synthese von Vinylpyruvat

5 mg L-Aminosäure-Oxidase wurden nach COLLINSWORTH et al. (1973) in 0,5 ml 0,1 M NaCl-Lösung suspendiert und mit einer Lösung aus 0,9 mg (60 μmol) DL-Allylglycin in 5,5 ml Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5) sowie mit 10 μl Katalase versetzt. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 6%iger Perchlorsäure gestoppt und der Niederschlag abzentrifugiert. Die Lösung konnte ohne weitere Aufarbeitung im Enzymtest eingesetzt werden.

### **2.11.11 Synthese von 4-Hydroxy-2-oxoalerat**

4-Hydroxy-2-oxoalerat wurde nach DAGLEY & GIBSON (1965) durch milde alkalische Hydrolyse von 4-Methyl-2-oxobutyrolacton hergestellt. Dazu wurden 11,4 mg (100 µmol) des Lactons in 9,9 ml destilliertem Wasser gelöst, durch Zugabe von 0,1 ml 1M NaOH die alkalische Hydrolyse in Gang gesetzt und mindestens 14 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösungen waren über mehrere Monate durch Lagerung bei –20°C stabil.

## **2.12 Molekularbiologische Methoden**

### **2.12.1 Replica-Plating**

Für die Konjugationsexperimente wurden die Elternstämme auf eine NB-Agarplatte aufgetragen, sorgfältig miteinander verschmiert und über Nacht bei 31°C bebrütet. Nun wurde der auf der Agaroberfläche gewachsene Rasen mit Hilfe der Stempeltechnik auf antibiotikahaltige Minimalmedium-Agarplatten übertragen. Dazu wurde ein mit sterilem Samt überzogener Stempel von etwas kleinerem Durchmesser als die Petrischale auf die bewachsene Agaroberfläche gedrückt. Dabei beluden sich die Samthärchen mit Impfmateriale. Der Stempel wurde nun auf unbeimpfte Minimalmedium-Agarplatten gedrückt und somit das gesamte Kolonienmuster übertragen.

### **2.12.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mittels Kochpräparation (SAMBROOK et al., 1989) und alkalischer Lyse (BIRNBOIM & DOLY, 1979). Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* DH5α für DNA-Sequenzierreaktionen wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) oder dem Nucleo Spin Kit (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt.

### 2.12.3 Isolierung von chromosomaler DNA

Die Isolierung von chromosomaler DNA bzw. von Gesamt-DNA sowohl von *E. coli* als auch aus Pseudomonaden wurde mit dem DNeasy™ Tissue Kit von Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.12.4 Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Pseudomonaden

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Pseudomonaden wurden verschiedene Methoden erprobt. Als einziges zuverlässiges und reproduzierbares Verfahren etablierte sich die Methode nach WHEATCROFT & WILLIAMS (1981).

Da bei diesem Verfahren keine vollständige Trennung der Plasmid-DNA von der genomischen DNA erreicht werden konnte, wurden für eine verbesserte Trennung der Plasmid-DNA geeignete Fraktionen des Saccharosegradienten mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt.

Dazu wurde 1,0 ml einer geeigneten Saccharosefraktion mit CsCl gesättigt und zu einer Lösung gegeben, die 8,0 g festes CsCl, gelöst in 10 ml Wasser, enthielt. Pro 10 ml DNA-Lösung wurden 0,8 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zur Probe gegeben. Nach der Versiegelung des Zentrifugenröhrchens mit Hilfe einer Crimp-Zange wurde bei 20°C für etwa 36-48 h bei 300.000 g in einer Ultrazentrifuge (Typ OTD-50B mit Winkelrotor TV-865B, Du Pont, Newton Connecticut, USA) ein CsCl-Gradient eingestellt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde das Röhrchen mit Hilfe einer Stativklemme gegen Herunterfallen gesichert und unter seitlicher Beleuchtung bei 354 nm mit einer UV-Lampe (UVKL-6U, Felter, Wiesloch) die erhaltenen DNA-Banden einzeln mit einer Spritze abgezogen in 50 ml Reagiergefäße überführt. Das Ethidiumbromid wurde durch Extraktion mit 1-Butanol (mit Wasser gesättigt) der DNA/CsCl Lösung entzogen. Nachdem die Lösung durch eine zweifach hintereinander ausgeführte, vierstündige Dialyse in jeweils 2 l Puffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) bei einer Temperatur von 4°C entsalzt wurde, konnte die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gefällt werden. Nach Waschen der DNA mit 80%igem (v/v) Ethanol in Wasser (-20°C) wurde die DNA in 500 µl Tris-Puffer (10 mM) aufgenommen.

### **2.12.5 *In vitro*-Manipulation von DNA**

Restriktionsendonukleasen, alkalische Phosphatase (CIP) und T4-DNA Ligase wurden gemäß der Empfehlungen der jeweiligen Hersteller verwendet. Gleiches galt für die Entfernung von 3'- oder 5'-Überhängen von DNA-Fragmenten mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I. Zur Inaktivierung der Enzyme wurden diese bei 65°C inkubiert.

### **2.12.6 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte horizontal in 0,7% - 2,0 % (w/v) Agarosegelen nach der bei SAMBROOK *et al.* (1989) beschriebenen Methode mit 1 x TAE-Puffer (0,5% Tris, 0,34% Essigsäure, 0,05 mM EDTA, pH 8,3) als Elektrophoresepuffer. Es wurden je nach Größe des Gels und je nach gewünschter Trennung die Gelkammern GNA-100 bzw. GNA-200 von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Als Längenstandard wurden „100 bp ladder“, „1 kbp ladder“ (beide Stratagene, Heidelberg), *EcoRI-HindIII*-hydrolysierte  $\lambda$ -DNA oder der 48 kbp-Marker (molecular weight marker XV) von Roche (Mannheim) verwendet. Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht (366 nm) enthielt die Agarose 0,1 $\mu$ g/ml Ethidiumbromid. Die Elektrophorese wurde bei kleinen Gelen mit Feldstärken von etwa 8-12 V/cm durchgeführt.

### **2.12.7 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Die Reinigung von *in vitro* manipulierter DNA erfolgte durch Trennung in Agarosegelen und anschließender Gelelution mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden), dem Nucleo Spin Extract 2 in 1 Kit (Macherey-Nagel, Düren) oder dem Jet-Sorb-Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Angaben der Hersteller.

### 2.12.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde nach ARNHEIM & ERLICH (1992) in Thermocyclern (Biometra, Göttingen) mit einer Heizrate von 2°C/s durchgeführt. Es wurden die DNA-Polymerasen Vent (New England Biolabs, Schwalbach) und *Taq* (Life Technologies, Karlsruhe) sowie das Advantage cDNA PCR Kit oder Advantage-GC cDNA PCR Kit (Clontech, Heidelberg) unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen verwendet. In Tabelle 2.5 sind die Standardzusammensetzungen der PCR-Ansätze für Vent und *Taq* Polymerase aufgeführt.

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung des Advantage cDNA PCR Kits bzw. des Advantage-GC cDNA PCR Kits entsprach der vom Hersteller angegebenen. Die PCR-Ansätze wurden mit jeweils 50 µl sterilem Mineralöl überschichtet. Die für die Amplifikation eines Zielgens entsprechenden optimalen Primerpaare wurden mit dem Programm PrimerFind 3.0 (Fröbel Labor Geräte, Lindau) ermittelt. Ausgehend von einem Standardprotokoll wurden die PCR-Bedingungen für jedes verwendete Primerpaar optimiert. Wurde mittels PCR eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsschnittstelle eingefügt, lag die Hybridisierungstemperatur innerhalb der ersten sechs Zyklen (Schritt 2 bis 4) entsprechend der Anzahl an auszutauschenden Basen unterhalb der Schmelztemperatur des mutagenisierenden Oligonukleotids. Wiesen die Primer keine Basenaustausche auf, so entfielen die Schritte 2 bis 4 der Standardreaktionsbedingungen. Die Verlängerungszeit betrug 1min/kbp Produktlänge. Vent oder *Taq* DNA-Polymerase wurden bei Schritt 2 des ersten Zyklus zugegeben, während bei Verwendung des Advantage cDNA PCR Kits oder des Advantage-GC cDNA PCR Kits die Polymerase bereits von Anfang an dem Reaktionsansatz zugefügt wurde.

**Tab. 2.5** Standardzusammensetzung für PCR mit Vent oder *Taq* Polymerase.

Zusammensetzung eines Standardreaktionsansatzes (100 µl)	Vent-DNA-Polymerase	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
Template-DNA	100 ng (chrom. DNA) bzw. 10 ng (Plasmid-DNA)	
Primer, je	0,5 µM	0,5 µM
dNTP, je	0,2 mM	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM	2,0 mM
DNA-Polymerasepuffer (10 x)	10 µl	10 µl
DMSO	10%	10%
DNA-Polymerase (Zugabe bei Schritt 2)	2,0 U	2,5 U

**Tab. 2.6** Standardreaktionsbedingungen für die PCR mit Vent oder *Taq* DNA-Polymerase

	Schritt	Temperatur	Dauer
	1	98°C	5 min (1 min)
5 x	2	95°C	1 min
	3	variabel	1 min
	4	72°C (68°C)	1 min/kbp
	5	95°C	1 min
30 x	6	variabel	1 min
	7	72°C (68°C)	1 min/kbp
	8	72°C (68°C)	1,5 min

Die Angaben in Klammern entsprechen den Bedingungen bei Verwendung des Advantage cDNA PCR Kits oder des Advantage-GC cDNA PCR Kits.

### 2.12.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die enzymatische Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte unter den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Inkubationsbedingungen. Die hydrolysierte DNA wurde direkt für die Gelelektrophorese verwendet oder für nachfolgende Experimente mit Hilfe eines Gel-Extraktions-Kits (GelEx, Stratagene, Heidelberg) gereinigt.

### 2.12.10 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit dem rediprime Random Primer Labelling Kit (Amersham, Pharmacia Biotech, Freiburg) und 50  $\mu\text{Ci}$   $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP (3000 Ci/mmol) nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert.

### 2.12.11 Southern Blotting und DNA-DNA-Hybridisierung

Zur Übertragung gelelektrophoretisch getrennter hydrolysiertes DNA auf positiv geladene Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde das Transfer-system nach CHOMCZNSKI (1992) mit 0,4 N NaOH als Transferpuffer gewählt. Die Transferzeit betrug 12 bis 16 h. Die Membran wurde anschließend bei 68°C in 2 X SSC (20 X SSC: 3 M NaCl, 300 mM Na-citrat, pH 7,2) für 4 h geschwenkt. Die DNA-DNA-Hybridisierung erfolgte in Plastikschrüsseln und temperierbaren Wasserbadschüttlern. Prähybridisierungs- und Hybridisierungstemperaturen waren immer identisch und lagen bei 66 bis 68°C, da in dieser Arbeit ausschließlich mit homologen Sonden gearbeitet wurde.

Bei DNA-DNA-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurde die Membran zunächst für etwa 4 h in Hybridierungslösung (6 X SSC, 0,5% SDS, 1% Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)) geschwenkt. Anschließend wurde die Hybridierungslösung erneuert und zu dieser die hitzedenaturierte (100°C, 5 min.) [<sup>32</sup>P]-markierte DNA-Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Nicht gebundene Sonde wurde anschließend durch mehrmaliges Waschen mit 6 X SSC, 0,5% SDS entfernt. Wenn nötig, wurde die Stringenz der Waschschriffe erhöht, (a) durch Erniedrigung der SSC-Konzentration oder (b) durch Erhöhung der Inkubationstemperatur. Die Detektion erfolgte mit Hybond MP Röntgenfilm unter Verwendung von „Quanta III“ Verstärkerfolien (Dupont) bei -80°C über Nacht.

### 2.12.12 Klonierungen

Durch PCR bzw. durch Hydrolyse erhaltene DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des pPCRscriptAmp SK+-Klonierungskits nach Anleitung des Herstellers (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt.

### 2.12.13 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Als transformationskompetente *E. coli*-Zellen wurden Epicurian Coli<sup>®</sup> Solopack<sup>®</sup> Gold Supercompetent Cells von Stratagene (Heidelberg) bezogen.

#### **2.12.14 Sequenzierung von DNA**

DNA-Sequenzierungen wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

#### **2.13 Chloridbestimmung**

Chlorid wurde photometrisch als Silberchlorid bei 546 nm gemessen. Die Ansätze enthielten verändert nach FREIER (1974) in einem ml:

100	µl	konz. HNO <sub>3</sub>
100	µl	wässrige AgNO <sub>3</sub> -Lösung (100 mM)
800	µl	Kulturüberstand

Die Messungen erfolgten nach etwa 10 Minuten. Die Eichgerade wurde mit Hilfe einer NaCl-Lösung erstellt. Direkt gemessen werden konnten Chloridkonzentrationen bis 1,0 mM. Höher konzentrierte Lösungen wurden vor der Messung entsprechend verdünnt.

#### **2.14 pH-Bestimmung**

Die H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-Ionenkonzentration wurde mit einer Mikro-pH-Einstabmesspipette (80 mm Länge, 6 mm Durchmesser, Ingold, Steinbach) bestimmt.

#### **2.15 Computergestützte Analyse von DNA- und Proteinsequenzen**

Die Entwicklung der Oligo-Nukleotid-Primer erfolgte mit dem Programm PrimFind 3.0 (Fröbel Labor-Geräte, Lindau). DNA- sowie Proteinsequenzanalysen wurden mit dem Programm Prophet 6.0 (AbTech Corporation, Charlottesville, USA, 1999; [www.prophet.abtech.com](http://www.prophet.abtech.com)) durchgeführt.

Multiple Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen Clustal V (HIGGINS *et al.*, 1991) und Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994; <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt. Paarweise Sequenzvergleiche mit den Datenbanken EMBL, GENBANK und SWISSPROT wurden mit dem Programmpaket FASTA 3 (PEARSON & LIPMAN, 1988; <http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>) und BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) erstellt.

## 3 Experimente und Ergebnisse

### 3.1 Stammunterscheidung - Etablierung eines Nachweisverfahrens zur Bestimmung der Übertragungsrichtung

Kürzlich wurde in der Arbeitsgruppe "Umweltmikrobiologie" in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe JANSSEN in Groningen nachgewiesen, dass der *Pseudomonas putida* GJ31 die erstaunliche Eigenschaft hat, sehr effektiv mit Chlorbenzol zu wachsen, obwohl er den Abbau über 3-Chlorcatechol und den *meta*-Weg betreibt (MARS et al., 1997).

Nähere Untersuchungen zeigten die Anwesenheit eines neuen Typs von Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase (KASCHABEK et al., 1998). Dieses Enzym (*cbzE*) ist offensichtlich gegenüber dem intermediär auftretenden 2-Hydroxymuconsäurechlorid unempfindlich. Eine Resistenz des katalytischen Zentrums gegenüber diesem Säurechlorid hebt die bisher postulierte Unvereinbarkeit des modifizierten *ortho*- und des *meta*-Weges auf. Stamm GJ31 besitzt demnach die Fähigkeit, mit Toluol und Chlorbenzol gleichzeitig zu wachsen.

Mit Hilfe dieses nun zur Verfügung stehenden Organismus erscheint die Konstruktion neuer Chloraromatenverwerter denkbar, die in der Lage sind, komplexe chlor- und methylsubstituierte Aromatengemische ohne die bislang beobachteten Einschränkungen zu verwerten.

Der obige Stamm GJ31 kann auch auf 4-Chlorcatechol wachsen. Durch Einkreuzung von genetischen Informationen, die für periphere Abbausequenzen codieren (z. B. das TOL-Plasmid als Träger der Xylol-Abbausequenz aus *Pseudomonas putida* PaW1), sollen schnell wachsende Organismen erzeugt werden. Da Stämme, die auf chlorierten Benzoaten wachsen, leichter handhabbar sind als solche, die mit Chlorcatecholen wachsen, besteht die Möglichkeit, sie durch Selektion mit anderen Chlorisomeren weiter zu entwickeln.

#### 3.1.1 Bildung von Hybridstämmen mit neuen Abbaueigenschaften

Kreuzungen von Stamm GJ31 mit PaW1 oder Derivaten wie PaW258 ( $XO^-$ ,  $C23O^-$ ) und Selektion auf neuen Substraten wie 3-Chlor- und 4-Chlorbenzoat sowie 3-Chlor- und 4-Chlor-

toluol waren erfolgreich. Neben der Klärung der Frage nach der Transferierbarkeit der Gene waren damit Stämme erzeugt worden, die leichter zu handhaben sind, da Wachstum auf chlorierten Benzoaten vorliegt.

Die Übertragungsrichtung ließ sich festlegen, da antibiotikaresistente Stämme für die Konjugationsexperimente erzeugt und eingesetzt wurden. Bei Stämmen aus Kreuzungen der Wildtypen lieferten Kultivierungsversuche mit verschiedenen Markersubstraten wie Nikotinsäure erste Anhaltspunkte bezüglich ihrer Funktion als Donor/Akzeptor innerhalb der Kreuzung. Dabei wurden beide Richtungen eines konjugativen Gentransfers festgestellt.

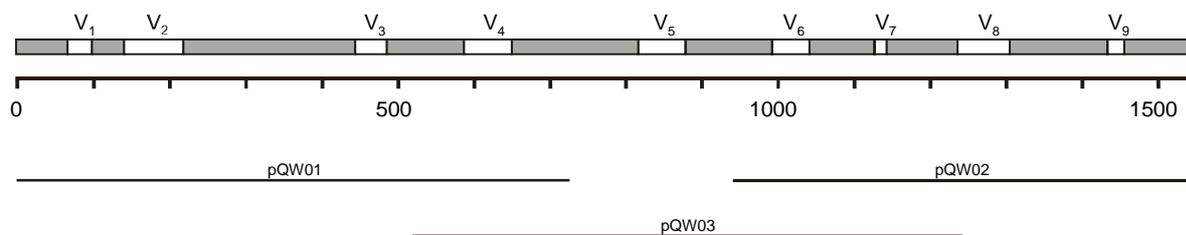
**Tab. 3.1.1** Eingesetzte Elternstämme, Transkonjuganten nach Kreuzungen mit *Pseudomonas putida* GJ31 sowie Spontanmutanten

Stämme	relevante Eigenschaften <sup>a)</sup>	Akzeptorstamm bzw. Ursprung	Literatur oder Methode
<i>Pseudomonas putida</i> GJ31	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , Tln <sup>+</sup> , Nic <sup>-</sup>	Wildtyp	Oldenhuis et al., 1989; Mars et al., 1997
<i>Pseudomonas putida</i> PaW1	TOL-Plasmid, 3MBA <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , Nic <sup>+</sup>	Wildtyp	Murray et al., 1972
<i>Pseudomonas putida</i> PaW258	TOL-Plasmid, C23O <sup>-</sup> , 3MBA <sup>-</sup> , Xyl <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	PaW1	Worsey et al., 1978
WR301	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>-</sup>	GJ31	über Nacht Kreuzung mit PaW258 auf NB-Agar; nach 2 Wochen 3CBA Selektion
WR303	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>-</sup>	GJ31	über Nacht Kreuzung mit PaW258 auf NB-Agar; nach 2 Wochen 3CBA Selektion
WR304	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>-</sup>	GJ31	über Nacht Kreuzung mit PaW258 auf NB-Agar; nach 2 Wochen 3CBA Selektion
MK133	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>-</sup>	GJ31	über Nacht Kreuzung mit PaW1 auf NB-Agar; nach 2 Wochen 3CBA Selektion
WR311	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>-</sup>	WR301	spontan nach 2-3 Wochen 4CBA Selektion
WR313	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>-</sup>	WR303	spontan nach 2-3 Wochen 4CBA Selektion
WR314	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>-</sup>	WR304	spontan nach 2-3 Wochen 4CBA Selektion
MK134	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	PaW1	über Nacht Kreuzung mit GJ31 auf NB-Agar; nach 2 Wochen 4CBA Selektion
MK314	CB <sup>-</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , Tln <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>+</sup>	PaW1	über Nacht Kreuzung mit GJ31 auf NB-Agar; nach 2 Wochen 4CBA Selektion
GJ31 <sup>*</sup>	CB <sup>+</sup> , 3CBA <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Tln <sup>+</sup> , 3CT <sup>+</sup> , 4CT <sup>-</sup> , Nic <sup>-</sup>	GJ31	spontan nach 2 Monaten 3CBA Selektion

<sup>a)</sup> Eigenschaften sind aufgeführt, die für die Konjugation oder die Beschreibung des Abbauverhaltens von Wichtigkeit sind; Abkürzungen für die getesteten Wachstumssubstrate sind die folgenden: CB, Chlorbenzol; 3CBA, 3-Chlorbenzoat; 4CBA, 4-Chlorbenzoat; 3MBA, 3-Methylbenzoat; 3CT, 3-Chlortoluol; 4CT, 4-Chlortoluol; Tln, Toluol; Xyl, *m*-Xylol; Nic, Nicotinat

### 3.1.2 Differenzierung der Stämme über 16S rDNA

Eine eindeutige Verifizierung der Übertragungsrichtung sollte dann mittels stammspezifischer Sonden auf der Basis von 16S rDNA für die Unterscheidung von PaW1 und GJ31 erfolgen (BONEN et al., 1979; GIOVANNI et al., 1988; NELISSEN et al., 1994; SCHMIDT et al., 1991; TURNER et al., 1989; URBACH et al., 1992). Die 16S rDNA besitzt neben mehreren hochkonservierten Bereichen auch bis zu neun variable Bereiche, von denen nach BARRY et al. (1990) die Regionen V2 und V6 besonders variabel sein sollen und in diesem Fall für eine Unterscheidung des genetischen Hintergrundes zwischen GJ31 und PaW1 herangezogen werden sollten (Abb 3.1.1). Dazu wurde die 16S rDNA der oben genannten Stämme kloniert, sequenziert und die Nukleotidsequenz zur Entwicklung geeigneter stammspezifischer Sonden gegenübergestellt.



**Abb. 3.1.1** Anordnung der variablen und konservierten Bereiche der 16S rRNA bzw. 16S rDNA sowie die PCR- und Klonierungsstrategie. Die konservierten Bereiche sind grau unterlegt, die neun variablen Bereiche sind gekennzeichnet

Da die 16S rDNA von Pseudomonaden etwa 1,5 kbp umfasst und aus mehreren hoch konservierten Bereichen besteht, wurde darauf verzichtet, diese Region durch PCR am Stück zu polymerisieren und dann anschließend zu subklonieren. Aufgrund der einfacheren Sequenzierbarkeit von kleineren Fragmenten wurden mit Primern, die in den hochkonservierten Bereichen liegen, direkt drei kleine, sich überlappende Abschnitte über PCR amplifiziert, die den ganzen Bereich der 16S rDNA abdecken. Die drei Fragmente pQW01, pQW02 und pQW03 wurden kloniert und sequenziert. Die PCR- und Klonierungsstrategie kann Abbildung 3.1.1 entnommen werden.

Aus der Gegenüberstellung der Sequenzen der 16S rDNA der Stämme PaW1 und GJ31 in Abbildung 3.1.2 (nächste Seite) wird ersichtlich, dass eine Stammunterscheidung mittels Sondenanalytik aus dem Bereich der 16S rDNA nicht sinnvoll erscheint, da sich die Nukleotidsequenzen der beiden Stämme über die 1,5 kbp lange Gesamtsequenz nur in genau neun Positionen unterscheiden. Dabei liegen in sieben Fällen Unterschiede in der Nukleotidsequenz

vor, in zwei Positionen fehlt der 16S rDNA von GJ31 im Vergleich zu der von PaW1 ein Nukleotid.

GJ31	41	GGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTGATTGAGCGGC	120
PaW1	41	GGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTGATTGAGCGGC	120
*****			
GJ31	121	GGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC	200
PaW1	121	GGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC	200
*****			
GJ31	201	CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCG	280
PaW1	201	CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCG	280
*****			
GJ31	281	TAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA	360
PaW1	281	TAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA	360
*****			
GJ31	361	TTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGACACTTTAAGTTGG	440
PaW1	361	TTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGACACTTTAAGTTGG	440
*****			
GJ31	441	GAGGAAGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCC	520
PaW1	441	GAGGAAGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCC	520
*****			
GJ31	521	GCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTG	600
PaW1	521	GCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTG	600
*****			
GJ31	601	AAAGCCCCGGCTCAACCTGGGAACGATCCAAAACGCGAGCTAGACTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTCTGTGT	680
PaW1	601	AAAGCCCCGGCTCAACCTGGGAACGATCCAAAACGCGAGCTAGACTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTCTGTGT	680
*****			
GJ31	681	AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGA	760
PaW1	681	AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGA	760
*****			
GJ31	761	AAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAG	840
PaW1	761	AAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAG	840
*****			
GJ31	841	ATTT-AGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGG	919
PaW1	841	ATTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGG	920
*****			
GJ31	920	GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAAC	999
PaW1	921	GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAAC	1000
*****			
GJ31	1000	TTTCCAGAGATGATGGTGCCTTCGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGCCTGAGATGTT	1079
PaW1	1001	TTTCCAGAGATGATGGTGCCTTCGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGCCTGAGATGTT	1080
*****			
GJ31	1080	GGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGCTCCTTAGTTACCAGCAGCTTATGGTGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGT	1159
PaW1	1081	GGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGCTCCTTAGTTACCAGCAGCTTATGGTGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGT	1160
*****			
GJ31	1060	GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATGTCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTCATAATGGTTCG	1239
PaW1	1061	GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATGTCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTCATAATGGTTCG	1240
*****			
GJ31	1240	GTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC	1319
PaW1	1241	GTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC	1320
*****			
GJ31	1320	TGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCG	1399
PaW1	1321	TGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCG	1400
*****			
GJ31	1400	TCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGAC-GGTTACCACGGTGTGATTCAATGAC	1478
PaW1	1401	TCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACAGGTTACCACGGTGTGATTCAATGAC	1480
*****			
GJ31	1479	TGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTA	1536
PaW1	1481	TGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTA	1538
*****			

**Abb. 3.1.2** Nukleotidsequenzvergleich der 16S rDNA von *Pseudomonas putida* GJ31 und *Pseudomonas putida* PaW1 über einen Bereich von 1536 bzw. 1538 bp. Konservative und semikonservative Bereiche sind grau hinterlegt, die variablen Bereiche sind nicht hinterlegt. Identische (\*) Nukleotide sind gekennzeichnet, voneinander abweichende Nukleotide sind mit einer Lücke versehen.

Die Unterschiede liegen bis auf eine Ausnahme in Position 252 (semikonservativer Bereich) alle innerhalb der variablen Bereiche, lassen aber aufgrund ihres seltenen Auftretens und ihrer Streuung über den gesamten Sequenzbereich der 16S rDNA keine geeignete Gensondenanalytik zu. Ferner ist in dem von BARRY et al. (1990) postulierten, besonders variablen Bereich V2 kein Unterschied zwischen der 16S rDNA von GJ31 und PaW1 zu beobachten, im V6-Bereich liegt nur ein einziger Basenunterschied vor.

### 3.1.3 Differenzierung der Stämme über Polymorphismen

Deshalb wurde die Eignung der Random Amplified Polymorphic DNA-Analyse (RAPD-Analyse) der Fa. Amersham Pharmacia Biotech erprobt.

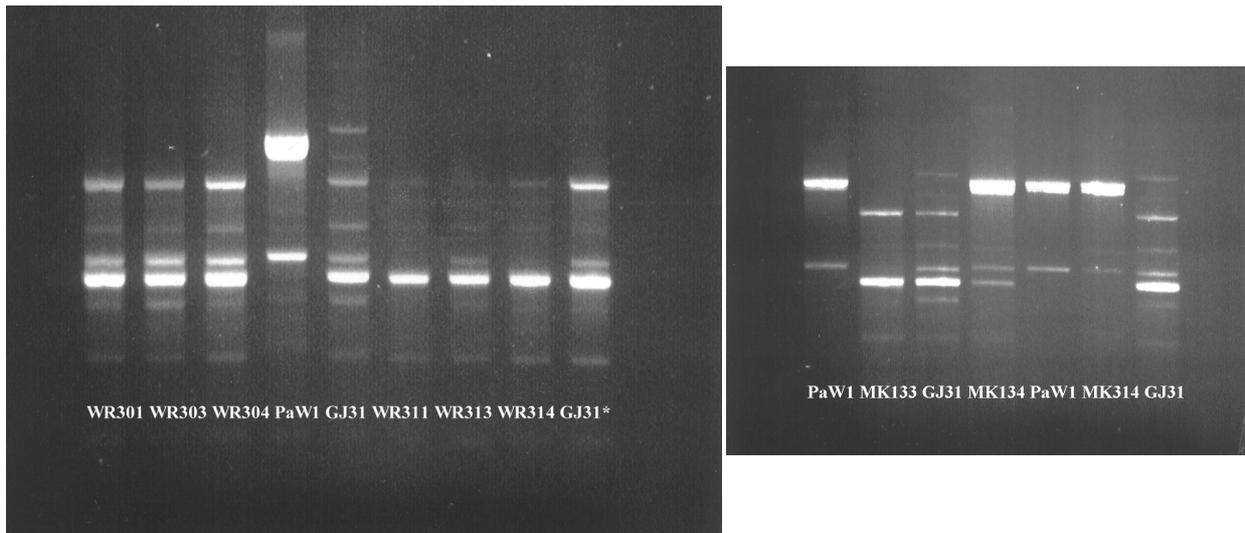
Bei der RAPD-Methode handelt es sich um eine abgewandelte Form der PCR, bei der in relativ kurzer Zeit genomische Polymorphismen (WILLIAMS et al., 1990) detektiert werden können. Bei dieser Methode wird mithilfe von PCR und unter Verwendung von kurzen Oligonukleotid-Primern unter wenig stringenten Bedingungen ein reproduzierbares und stammspezifisches Bandenmuster erzeugt, mit dem auch zwischen genetisch sehr ähnlichen Stämmen Unterschiede aufgezeigt und somit zur Differenzierung genutzt werden können.

Mit dem Random-Primer 5'-AAGAGCCCTGT-3' (AKOPYANZ et al., 1992 a und b) konnte eindeutig zwischen den beiden Elternstämmen der Kreuzungen unterschieden werden (Abb. 3.1.3 - nächste Seite).

Andere Primer zeigten ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den beiden Stämmen, aber ein weniger übersichtliches Bild. Aus Abbildung 3.1.3 -links- erkennt man, dass die dort aufgeführten Transkonjuganten WR301, WR303 und WR304, die durch Konjugation aus PaW1 und GJ31 nach Selektion auf 3-Chlorbenzoat entstanden sind, GJ31 als Hintergrund haben, es war also das TOL-Plasmid übertragen worden.

Die Spontanmutanten WR311, WR313 und WR314 waren durch mehrwöchige Selektion von WR301, WR303 und WR304 auf 4-Chlorbenzoat entstanden und besaßen ebenfalls GJ31 als Hintergrund (Abb. 3.1.3 - links).

Bei direkter Selektion der Transkonjugation auf Wachstum mit 3-Chlorbenzoat entstand der Stamm MK133, der wie die WR-Stämme auch, GJ31 als Akzeptor und PaW1 als Donor besitzt (Abb. 3.1.3 - rechts). Bei direkter Selektion auf 4-Chlorbenzoat ergaben sich Stämme wie MK134 und MK314, die PaW1 als Hintergrund hatten (Abb. 3.1.3 - rechts). Dort war also eine Information von GJ31 auf PaW1 übertragen worden.



**Abb. 3.1.3** RAPD-Analyse der Elternstämme *Pseudomonas putida* GJ31 und PaW1 sowie einiger in Tabelle 3.1.1 aufgeführte Transkonjuganten.

**links** - Die Transkonjuganten WR301, WR303 und WR304 entstanden nach Selektion von PaW258 und GJ31 auf 3-Chlorbenzoat; WR311, WR313 und WR314 sind die jeweiligen Spontanmutanten von WR301, WR303 und WR304 nach Selektion auf 4-Chlorbenzoat und besitzen ebenso ausschließlich GJ31 als Hintergrund.

**rechts** - Die Transkonjuganten MK133, MK134 und MK314 entstanden nach Selektion von PaW1 und GJ31 auf 3-Chlorbenzoat (MK133) und 4-Chlorbenzoat (MK134 und MK314). Während der auf 3-Chlorbenzoat selektierte Konjugantenstamm MK133 GJ31 als Hintergrund besitzt, ist bei den auf 4-Chlorbenzoat selektierten Transkonjuganten PaW1 der Akzeptor.

### 3.2 Isolierung des degradativen Plasmides pKW1 aus *Pseudomonas putida* GJ31

Aus der Literatur ist hinlänglich bekannt, dass eine erfolgreiche Trennung plasmidischer DNA von genomischer DNA besonders bei Plasmiden, deren Masse die von einigen zehntausend Basenpaaren weit überschreitet, große Probleme bereitet (CHAKRABARTY et al., 1976; DON & PEMBERTON, 1981; FRANKLIN et al., 1981; PIERCE et al., 1981; FUJIMOTO, 1991). Es stellte sich schnell heraus, dass klassische Methoden zur Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*, beispielsweise die „cleared lysate“-Methode nach BIRNBOIM & DOLY (1979), die „Kochpräparation“ nach HOLMES & QUIGLEY (1981) oder die Methode der Präzipitation durch Polyethylenglykol nach MANIATIS et al. (1989) nicht zwangsläufig auch auf Plasmide von Stämmen anderer Familien übertragen werden kann. Daraus lässt sich folgern, dass neben der Größe als einem Parameter auch die Herkunft des Plasmid-tragenden Stammes für das erfolgreiche Gelingen einer Plasmidpräparation eine entscheidende Bedeutung erlangen kann. Auffällig ist bei der Literaturrecherche, dass insbesondere für Pseudomonaden keine einheit-

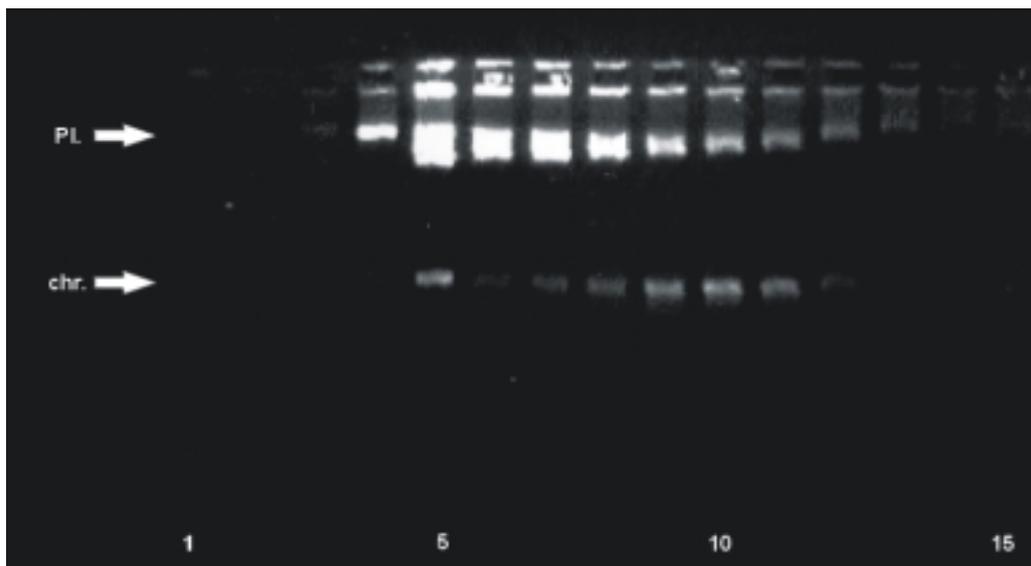
liche Strategie zur Plasmidisolierung und Aufreinigung zu erkennen ist. Statt dessen wurden für einzelne Arten (stamm-) spezifische Verfahren entwickelt, die allerdings nicht immer zu einer perfekten Trennung der Plasmid-DNA führen und bei denen oft ein Kompromiss zwischen Aufwand und Trennungsvermögen eingegangen werden muss (CASSE et al., 1979; WHEATCROFT & WILLIAMS, 1981; KADO & LIU, 1981).

Aus diesem Grunde soll hier kurz auf zwei Methoden eingegangen werden, bei denen auf den für die Isolierung großer Plasmide kritischen Schritt der Fällung mit sich anschließender Zentrifugation verzichtet wird.

Bei der Methode von KADO & LIU (1981) handelt es sich um ein Verfahren mit verhältnismäßig geringem technischem und zeitlichem Aufwand. Dabei macht man sich das unterschiedliche Verhalten zwischen zirkulärer, kovalent geschlossener und langkettiger, chromosomaler DNA zunutze. Chromosomale DNA wird im stark alkalischen Medium (pH 12,5) in Gegenwart von Sodiumdodecylsulfat bei Temperaturen zwischen 50 und 65°C denaturiert, während sich zirkuläre, kovalent geschlossene Plasmid-DNA unter diesen Reaktionsbedingungen gerade noch als stabil erweist. Der große Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nach einer erfolgreichen alkalischen Hitzebehandlung die chromosomale DNA vollständig abgebaut werden soll und das übrigbleibende klare Lysat nach Extraktion mit Phenol/Chloroform ohne eine sich daran anschließende Zentrifugation oder Fällung (durch Zugabe von Salzen) direkt für eine Restriktionsanalyse oder andere Untersuchungen zur Verfügung steht. Diese Methode wurde nach Anleitung von KADO & LIU (1981) durchgeführt. Für den Stamm GJ31 konnte damit trotz Variation sowohl von Temperatur und Inkubationszeit als auch durch leichte Veränderung des pH-Wertes keine befriedigende Plasmidisolierung erzielt werden. Vermutlich scheiterte die Methode daran, dass entweder die Plasmid-DNA von Stamm GJ31 unter den strengen Reaktionsbedingungen, ähnlich wie chromosomale DNA, nicht stabil ist oder dass beim Extraktionsschritt mit Phenol/Chloroform die Plasmid-DNA mit den Zellrückständen in die organische Phase übergegangen ist.

Schließlich führte die Methode nach WHEATCROFT & WILLIAMS (1981) als einzige mit einem relativ geringen Aufwand zu einem halbwegs befriedigenden Ergebnis. Hierbei handelt es sich um das einzige in der Literatur beschriebene Prinzip, bei der nach der alkalischen Lyse auf einen Neutralisationsschritt verzichtet wird und anstelle dessen das alkalische Lysat auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen wird. Die Trennung zwischen der kovalent geschlossenen ringförmigen Plasmid-DNA und der gescherten genomischen und teilweise gescherten Plasmid-DNA erfolgte dann innerhalb dieses Saccharose-Gradienten während einer einstündigen Zentrifugation bei etwa 100.000 g.

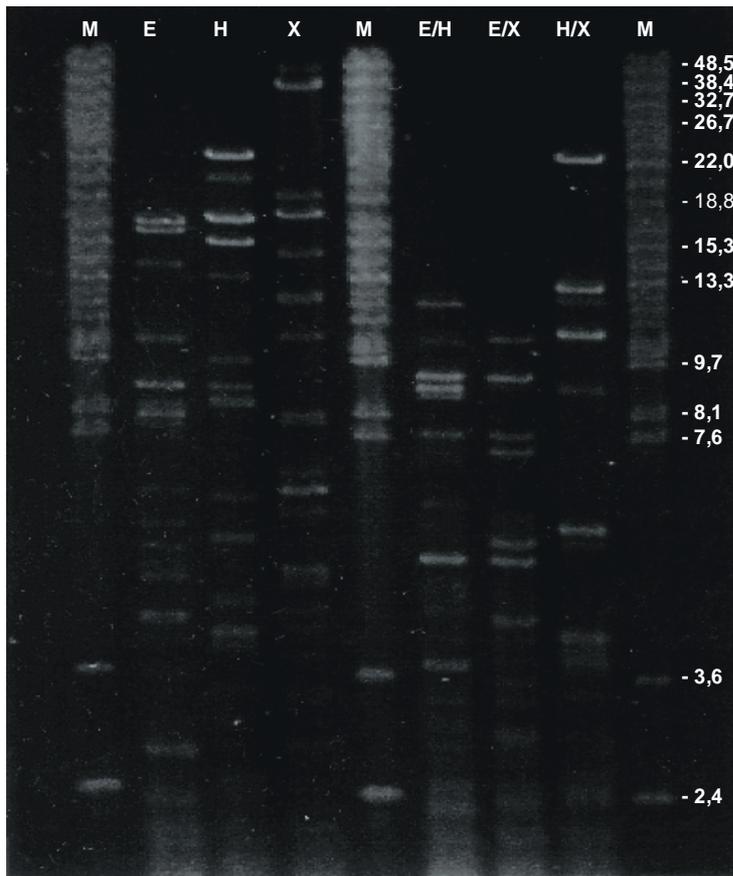
Wie aus der Auftragung der einzelnen Fraktionen des Saccharosegradienten auf einem Agarosegel in Abb. 3.2.1 zu entnehmen ist, konnte auch mit dieser Methode keine vollständige Trennung der Plasmid-DNA von der übrigen gescherten genomischen DNA erreicht werden. Da aber insgesamt sowohl eine befriedigende Trennung von Proteinen, RNA und anderen Zellbestandteilen als auch eine starke Anreicherung der Plasmid-DNA zu beobachten war, konnte letztere bequem in einem Cäsiumchlorid-Gradienten von der offenkettigen DNA getrennt werden.



**Abb. 3.2.1** Agarosegelbild zur Plasmidisolierung nach WHEATCROFT & WILLIAMS (1981). Aufgetragen sind die einzelnen Fraktionen 1 (höhere Dichte) bis 15 (niedrigere Dichte) des Saccharosegradienten nach einstündiger Zentrifugation bei 100.000 g. Plasmid-DNA (Pl.) und chromosomale DNA (chr.) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Unterschiedliches Einlaufverhalten der DNA ist auf die voneinander abweichenden Saccharosekonzentrationen in den einzelnen Fraktionen des Gradienten zurückzuführen.

Zur Überprüfung der Plasmidisolierung wurden einzelne Fraktionen sofort einer Restriktionsanalyse unterzogen. Abbildung 3.2.2 (nächste Seite) zeigt das Ergebnis einer Hydrolyse des Plasmids pKW1 aus *Pseudomonas putida* GJ31 mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *HindIII* und *XhoI*.

Da durch Gelelektrophorese und Restriktionsverdauung des Plasmides mit *EcoRI*, *HindIII* und *XhoI* von einer Größe weit über 150 kbp ausgegangen werden konnte, wurden im Hinblick auf die Erstellung einer Restriktionskarte für Einzel- und Doppelhydrolysen solche Restriktionsendonukleasen ausgewählt, die im Vergleich zu den oben genannten seltener schneiden. Da bei *Pseudomonaden* von einem GC-Gehalt über 60% ausgegangen werden kann, wurden Endonukleasen ausgewählt, die nur in AT-reichen Bereichen schneiden. Hierzu zählen unter anderem *AseI* (5'...ATTAAT...3'), *DraI* (5'...TTTAAA...3') und *SspI* (5'...AATATT...3').



**Abb. 3.2.2** Agarosegelbild einzelner und kombinierter Hydrolysen des Plasmides pKW1 aus *Pseudomonas putida* GJ31 mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI, *Hind*III und *Xho*I. Die Hydrolyse wurde direkt und ohne weitere Aufarbeitung mit einer geeigneten Rohfraktion aus dem Saccharosegradienten durchgeführt. Die Trennung erfolgte über ein 0,5%iges Agarosegel.

Als Längenmarker diente der 48 kb-Marker der Firma Boehringer.

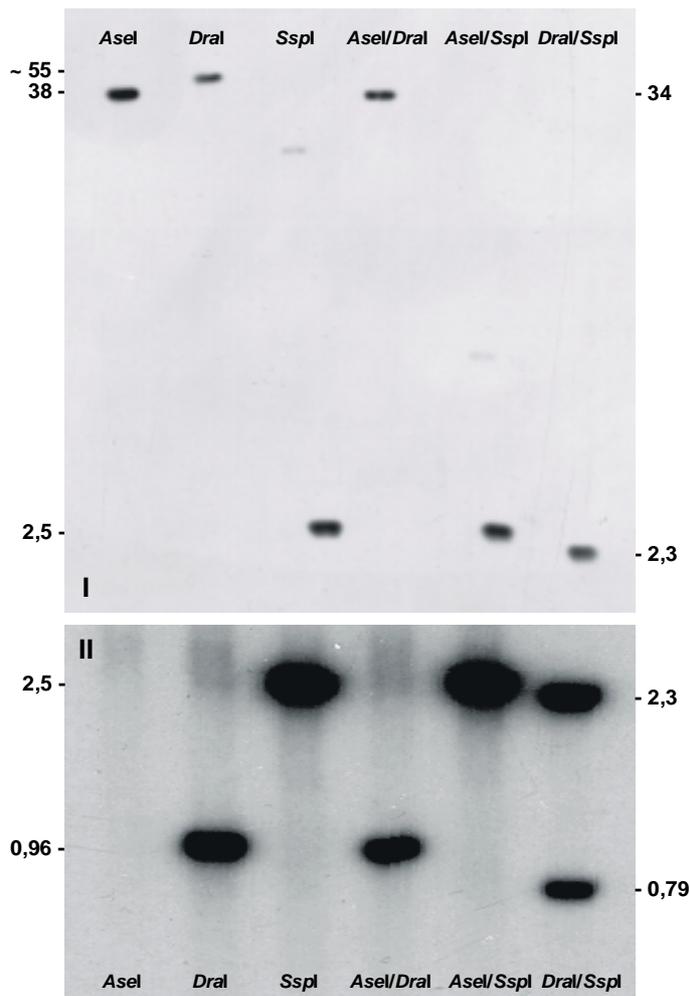
Die Zahlen am Rand geben die Größe der einzelnen Fragmente in [kbp] an.

E: *Eco*RI; H: *Hind*III; X: *Xho*I; M: Marker

Durch Hydrolyse des Plasmides mit diesen drei Enzymen sollte erreicht werden, dass eine weit geringere Anzahl an Restriktionsfragmenten entsteht, die somit im Hinblick auf die Erstellung einer Restriktionskarte zu einer größeren Vereinfachung führt. Ebenso sollte durch Hybridisierungsexperimente mit radioaktiv markierten Gensonden eine Zuordnung bekannter Gene zu entsprechenden Fragmenten erfolgen. Auf diese Untersuchungen, die auch zu einer näheren Kartierung der genetischen Umgebung von *cbzE* führen sollten, wird in den folgenden beiden Unterkapiteln näher eingegangen.

### 3.3 Der Transposonbereich um *cbzE*

Durch Hybridisierungsexperimente mit einem PCR-Fragment von *cbzE* als Sonde (Primer Qno22/23; Tab. 2.4) konnte gezeigt werden, dass sich das Gen für die 2,3-Dioxygenase auf einem etwa 2,3 kbp großen *DraI*-*SspI*-Fragment befindet (Abb. 3.3.1). Von Interesse waren nun die an dieses Fragment angrenzenden Restriktionsfragmente. Da der Bereich upstream von *cbzE* und damit auch upstream von der *DraI*-Schnittstelle zum Teil schon durch MARS (1997) sequenziert worden war (siehe Abb. 1.4 und 3.3.3), konnte über PCR eine homologe Sonde generiert werden (Primerpaar Qno24/Qno25), die einen Teil der schon ansequenzierten Transposase *tnpA*(1) und der Ferredoxin-Reduktase *cbzT* enthielt und damit auch den Bereich upstream von der *DraI*-Erkennungssequenz. Durch Hybridisierungsexperimente ergab sich, dass mit dieser Sonde zwei gleichstarke Signale erhalten wurden und dieses Fragment folglich mindestens zweimal auf dem Plasmid vorhanden sein muss (Abb. 3.3.2).



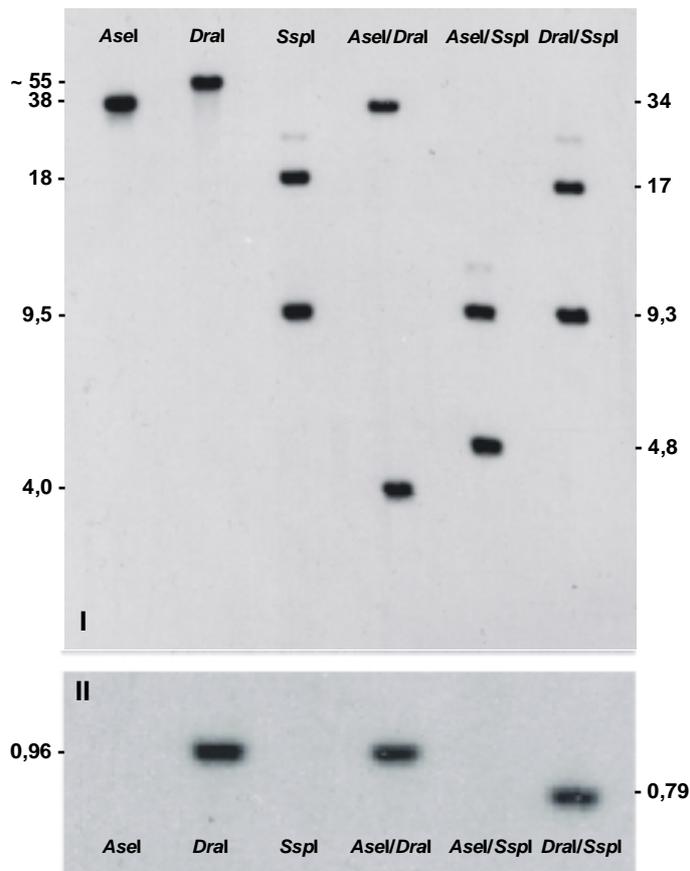
**Abb. 3.3.1** Autoradiogramm der Hybridisierung hydrolysierter Plasmid-DNA von pKW1 aus *Pseudomonas putida* GJ31. Die Hydrolyse erfolgte jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *AseI*, *DraI* und *SspI* sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander. Als homologe, radioaktiv markierte Sonde diente ein PCR-Fragment (Primer Qno22/23), welches einen Teil der Sequenz von *cbzE* codiert.

Die ungefähre Größe der hybridisierenden Fragmente ist jeweils auf gleicher Höhe in der Größenordnung [kbp] angegeben.

Da nicht gleichzeitig eine ausreichende Auftrennung großer Fragmente und eine vollständige Erfassung von Fragmenten mit einer Größe unter 2 kbp gewährleistet werden konnte, wurden zwei Hybridisierungen mit Gelen unterschiedlicher Konzentration vorgenommen.

(I) Die Auftrennung großer Fragmente erfolgte über ein 0,4%iges Agarosegel.

(II) Die Auftrennung kleiner Fragmente erfolgte über ein 1,2%iges Agarosegel.



**Abb. 3.3.2** Autoradiogramm der Hybridisierung hydrolysiertes Plasmid-DNA von pKW1 aus *Pseudomonas putida* GJ31. Die Hydrolyse erfolgte jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *AseI*, *DraI* und *SspI* sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander. Als homologe, radioaktiv markierte Sonde diente ein PCR-Fragment (Primer Qno24/25), welches für einen Teil der downstream-Sequenz von *tnpA(1)* und einen Teil der upstream-Sequenz von *cbzT* codiert.

Die ungefähre Größe der hybridisierenden Fragmente ist jeweils auf gleicher Höhe in der Größenordnung [kbp] angegeben.

Da nicht gleichzeitig eine ausreichende Auftrennung großer Fragmente und eine vollständige Erfassung von Fragmenten mit einer Größe unter 2 kbp gewährleistet werden konnte, wurden zwei Hybridisierungen mit Gelen unterschiedlicher Konzentration vorgenommen.

(I) Die Auftrennung großer Fragmente erfolgte über ein 0,4%iges Agarosegel.

(II) Die Auftrennung kleiner Fragmente erfolgte über ein 1,2%iges Agarosegel.

Abb. 3.3.2 zeigt, dass sich die Transposase oder ein Teil davon noch ein weiteres mal auf dem Plasmid befindet, und zwar weiter unterhalb von *cbzG* auf einem 7,7 kbp-*PstI*-*SspI*-Fragment. Aus den Hybridisierungsergebnissen der Einzel- und Doppelhydrolysen konnten somit die an *cbzE* angrenzenden Restriktionsfragmente ermittelt und kartiert werden. Die Beobachtung, dass eine zweite Transposase *tnpA(2)* etwa 3 - 10 kbp weiter upstream von der ersten Transposase *tnpA(1)* vorhanden sein könnte, legt die Vermutung nahe, dass sich der Gencluster *cbzTEXG* auf einem transponierbaren Element befindet, welches sich bei unspezifischerem Wachstum auf Benzoat heraustrennt.

Diese Vermutung wurde dadurch gestützt, dass durch sogenanntes „Benzoat-Curing“ ein Chlorbenzol-negatives Derivat QM1 von Stamm GJ31 erhalten werden konnte. Hybridisierungsexperimente mit einer Sonde, die einen Teil der Sequenz von *cbzE* enthielt (Primer Qno22/23), machten deutlich, dass *cbzE* in der Gesamt-DNA von QM1 nicht mehr vorhanden ist, wohingegen mit Gesamt-DNA aus Stamm GJ31 ein Hybridisierungssignal beobachtet wurde. PCR-Experimente mit Gesamt-DNA aus QM1 und mit den Primern Qno22/23 aus *cbzE* und Qno32/33 aus *traG* auf der einen Seite sowie mit den Primern Qno17/18 aus *cbzG*

auf der anderen bestätigten diesen Befund. Während mit Gesamt-DNA aus Stamm GJ31 als Positiv-Kontrolle die gewünschten PCR-Produkte erhalten werden konnten, wurden mit diesen Primern und Gesamt-DNA aus QM1 keine PCR-Produkte gebildet, folglich fehlt dieses Stück DNA in den CB<sup>-</sup>-Derivaten.

Das Fragment bis zur zweiten Transposase wurde mittels PCR erhalten. Dazu wurde ein Startprimer aus der schon bekannten Sequenz von *cbzG* und den Gegenprimern aus dem Endstück der schon bekannten und auch schon als Gensonde eingesetzten Transposase *tnpA(1)* ausgewählt. Es wurden für die zwei möglichen Orientierungen der zweiten Transposase *tnpA(2)* zwei unterschiedliche Gegenprimer eingesetzt, sowohl für die gleichgerichtete (*syn*-) als auch für die entgegengerichtete (*anti*-) Orientierung. Beim Einsatz des *syn*-Primers konnte ein PCR-Produkt mit einer Größe von 3,4 kbp amplifiziert werden. Nachfolgende Subklonierung und Sequenzierung ergab die in Abbildung 3.3.3 gezeigte Genanordnung. Beide Transposasen weisen nicht nur dieselbe Nukleotidsequenz auf, sondern haben auch die gleiche Orientierung im Cluster, wobei die zweite Transposase *tnpA(2)* nicht vollständig vorhanden ist, es fehlen die ersten 140 Nukleotide.

Durch die vollständige Sequenzierung des 3,4 kbp großen PCR-Fragmentes konnte auch der von MARS (1997) schon ansequenzierte offene Leserahmen *cbzG* vervollständigt werden. Die Region zwischen *cbzG* und *tnpA* hat sehr große Ähnlichkeit mit dem Gen *bphK* des Biphenylabbau-Genclusters aus *Pseudomonas* sp. LB400 (X76500), welches für eine Glutathion S-Transferase codiert.

Für die Sequenzbereiche upstream und downstream von den beiden *cbzE* flankierenden Transposasengen *tnpA(1)* und *tnpA(2)* wurde mit dem Universal GenomeWalker™ Kit von Clontech (Heidelberg) weitergearbeitet.

Dabei handelt es sich um eine simple, aber effektive Methode, um genomische DNA-Sequenzen, die benachbart zu einer schon bekannten Sequenz liegen, mithilfe von PCR zu amplifizieren, zu klonieren und schließlich zu sequenzieren.

Der erste Schritt besteht in der Herstellung von verschiedenen Gen-Bibliotheken, also ungeklonten, Adapter-ligierten Plasmid-DNA-Fragmenten. Dazu wird die gereinigte Plasmid-DNA durch *blunt end* schneidende Restriktionsendonukleasen (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII* und *StuI*) hydrolysiert. Um die Trefferquote bei dieser Methode zu erhöhen, wurden noch zusätzliche Restriktionsverdauungen mit *AseI*, *HincII*, *HpaI*, *NruI* und *SmaI* durchgeführt und an die daraus entstehenden Restriktionsfragmente ein für die genspezifischen Primer passender Adapter ligiert.

Die „Gen-Bibliotheken“ entstehen dadurch, dass der Adapter an beide Enden der mit den oben erwähnten Restriktionsendonukleasen hydrolysierten Plasmid-DNA ligiert wird.

Mit dieser Methode gelang es, Bereiche von etwa 6,3 kbp upstream und 11 kbp downstream vom durch MARS et al. (1997) sequenzierten 3,1 kbp großen *PstI*-Fragment sukzessive zu klonieren und zu sequenzieren.

### **Der Bereich upstream von *tnpA*(1)**

Im Bereich upstream von *tnpA*(1) bzw. *cbzE* liegt eine invertierte Sequenzwiederholung von 262 bp, wie sie auch schon von HEINARU et al. (1997) auf dem Plasmid pAM10.6 aus *Pseudomonas fluorescens* Cb36 und von HERRMANN et al. (1999) auf dem Plasmid pPGH2 aus *Pseudomonas putida* H beobachtet worden ist. Im weiteren upstream-Bereich folgen dann fünf offene Leserahmen, die in ihrer Aminosäuresequenz eine hohe Ähnlichkeit mit den Transfer-Genen *traN*, *traE*, *traO*, *traF* und *traG* besitzen. Auf einen weiteren „Gen-walk“ upstream von *traN* wurde verzichtet, da die bisher gefundenen *tra*-Gene vorwiegend in Clustern angeordnet sind, zu einem Konglomerat von mindestens 12 bis etwa 25 Genen gehören, für den DNA-Transfer zwischen Donor und Rezipient notwendig sind und somit nicht in den degradativen Abbau involviert sind.

Diese Transferegene sind unter anderem für die Synthese sogenannter Pili und anderer Oberflächenkomponenten der Zelle verantwortlich, die den physischen Kontakt zwischen Donor- und Rezipientenzelle ermöglichen. Die Anwesenheit dieser *tra*-Gene auf dem Plasmid kann als ein Anhaltspunkt dafür gewertet werden, dass es sich bei diesem um ein konjugatives Plasmid handelt.

### **Der Bereich downstream von *tnpA*(2)**

Im downstream-Bereich von *tnpA*(2) führte die Genome-Walk-PCR-Methode anfangs nicht zum Erfolg, was vermutlich auf den hohen GC-Gehalt bzw. auf Sekundärstrukturen der zu amplifizierenden DNA zurückzuführen ist. Erst durch Zugabe von 5% DMSO zum PCR-Ansatz bzw. durch den Einsatz des Advantage-GC cDNA PCR Kit (Clontech, Heidelberg) gelang es, PCR-Fragmente downstream von *tnpA*(2) zu generieren.

An *tnpA*(2) schließt sich ein offener Leserahmen an, der im Aminosäuresequenzvergleich mit Datenbanken große Ähnlichkeit mit Sequenzen besitzt, die sowohl für eine 2-Hydroxy-6-ke-tonona-2,4-dienoat-Hydratase als auch für eine 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase codieren,

zwei Gene unterschiedlicher Funktion mit einer sehr ähnlichen Aminosäuresequenz. An diesen Leserahmen schließt sich dann eine 106 bp große invertierte Sequenzwiederholung an, auf die dann der Beginn einer Transposase *tnpA(3)* folgt. Diese Transposase wird nach 165 bp durch eine weitere Transposase *tnpA(4)* abgelöst, welche vermutlich für die Unterbrechung von *tnpA(3)* verantwortlich ist. Die Transposase *tnpA(4)* besitzt im bisher ansequenzierten Teil eine hundertprozentige Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz mit einer Transposase aus dem Transposon Tn5501 (HERRMANN et al., 1999).

Die Anordnung und die Orientierung der ermittelten Gene und offenen Leserahmen (ORF) ist in Abbildung 3.3.3 zusammengefasst.

### 3.3.1 Analyse des plasmidisch codierten Transposonbereiches von *Pseudomonas putida* GJ31

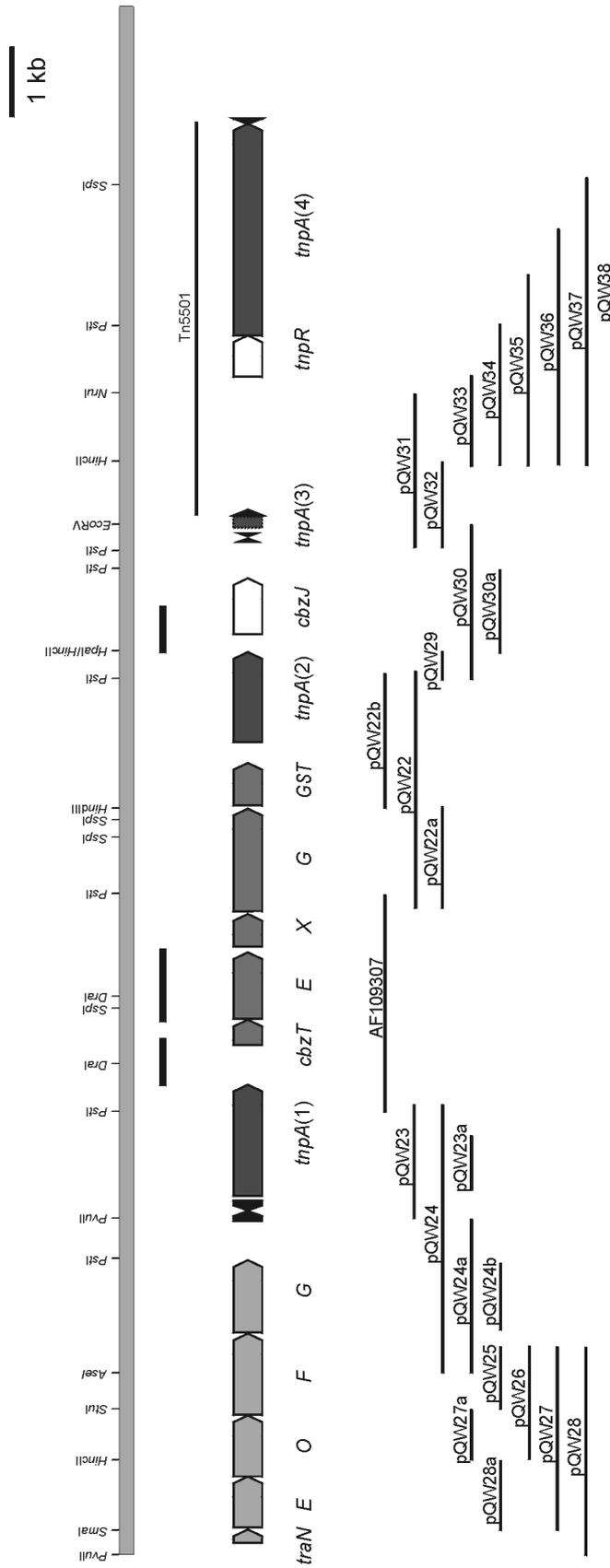
Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun die Bereiche untersucht, die zu dem durch MARS et al. (1997) sequenzierten 3103 bp umfassenden *PstI*-Fragment benachbart sind. Dafür wurden 6298 bp upstream und 10964 bp downstream von diesem *PstI*-Fragment sequenziert. Insgesamt steht somit ein Bereich von 20365 bp Plasmid-DNA als Nukleotidsequenz zur Verfügung. Die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen, bzw. die gefundenen offenen Leserahmen sind im Anhang (8.1) dargestellt. Der durchschnittliche GC-Gehalt von 60,2% entspricht der für Pseudomonaden zu erwartenden Zusammensetzung der DNA.

Unter Berücksichtigung der für Pseudomonaden typischen Kodonverwendung (KAZUSA et al., 1988) wurden in dem 6298 bp großen Bereich upstream des von MARS et al. (1997) sequenzierten *PstI*-Fragment die sechs offenen Leserahmen *traN*, *traE*, *traO*, *traF*, *traG*, *tnpA(1)* identifiziert. In dem Bereich zwischen *traG* und *tnpA(1)* konnte eine 262 bp große Region mit terminalen invertierten Repetitionen ausgemacht werden, auf die im weiteren Verlauf näher eingegangen wird.

Wahrscheinlich bilden die Leserahmen für *traNEOFG* ein durchgehendes Transkript, da mit Ausnahme von *traF* und *traG* die Start- und Stopcodons benachbarter Gene überlappen.

Im downstream-Bereich des von MARS et al. (1997) identifizierten *PstI*-Fragmentes wurden die sieben offenen Leserahmen *cbzG*, *GST*, *tnpA(2)*, *cbzJ*, *tnpA(3)*, *tnpA(4)* und *tnpR* identifiziert.

Die Anordnung und die Transkriptionsrichtung aller auf diesem 20365 bp großen Fragment identifizierten offenen Leserahmen ist in Abbildung 3.3.3 schematisch dargestellt.



**Abb. 3.3.3** Organisation der Gene upstream und downstream von *cbzE* auf dem Plasmid pKW1 aus *Pseudomonas putida* GJ31 und die zur vollständigen Sequenzierung benutzte Klonierungsstrategie; *traN*, *traE*, *traO*, *traF*, *traG* als Bestandteil eines Transfer-Operons; *cbzT*: Ferredoxin-Reduktase; *cbzE*: 2,3-Dioxygenase; *cbzX*: Funktion unbekannt; *cbzG*: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase; *GST*: Glutathion S-Transferase; *cbzJ*: 2-Hydroxyphenyl-2,4-dienoat-Hydratase; *tnpA*: Transposase, *tnpR*: Resolvase; die zum *cbzTEXG*-Operon gehörenden Gene sind mittelgrau, die zum *tra*-Operon gehörenden Gene hellgrau und Abschnitte, die mit Transposasen Ähnlichkeiten aufweisen, dunkelgrau schraffiert. IR-Elemente sind durch kurze schwarze Pfeile gekennzeichnet; die schwarzen Balken kennzeichnen die zur Lagefeststellung der Restriktionsfragmente (relativ zu *cbzE*) benutzten radioaktiven Sonden. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die für die Klonierung und Subklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen angegeben. Die gesamte Darstellung ist maßstabgetreu.

### 3.3.2 Analyse nichtcodierender Bereiche

Eine potentielle Ribosomenbindestelle in dem für *Pseudomonas putida* typischen Abstand zum Startcodon konnte sowohl für alle Transfer-Gene *traN*, *traE*, *traO*, *traF*, *traG* als auch für die Gene *tmpA(1)*, *cbzT*, *cbzE*, *cbzX*, *cbzG*, *GST* und *cbzJ*, nicht aber für die Transposase *tmpA(2)* ermittelt werden (Tab. 3.3.1).

**Tab. 3.3.1** Gegenüberstellung der postulierten Ribosomenbindestellen der offenen Leserahmen *traNEOFG*, *tmpA(1)*, *cbzTEXG*, *GST*, *tmpA(2)* und *cbzJ*.

Leserahmen	Sequenz der Ribosomenbindestelle
<i>traN</i>	CTTTTTCTCATCTGAGGTAATTCACATG
<i>traE</i>	CAGGCCACGAATGGAGAACGTAAAGAATG
<i>traO</i>	TCTGTTGCCAGTGTGGGGCCGATAATG
<i>traF</i>	AAGCGCGTGTGGAAAGGGGTGAGGAATG
<i>traG</i>	AAATGGTGGAGTGAGGGAGGCACATATG
<i>tmpA(1)</i>	ATACTGTGTATTTGCACAGTATTCATG
<i>cbzT</i>	TCAAGCGGGTTTGAAGGGGAATAAGCATG
<i>cbzE</i>	TTATTAACAAATGAAGGAGACACACATG
<i>cbzX</i>	TGTTTCAATAACGGATAACCACCCATG
<i>GST</i>	CCCATTTTTTTATAAGAAACTCCTATG
<i>cbzG</i>	ATTACCACTTCAAGAGAGAGAAAATG
<i>tmpA(2)</i>	GCCCCTCATGCAACACCCGGCGCATG
<i>cbzJ</i>	TCAACCTTTCCAGGCGGAGCCCCCATG
16S-rRNA	3' - UCUU <u>UCCUCC</u> ACUA - 5'

Die Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz sind grau hinterlegt, weitere außerhalb der grau hinterlegten Konsensussequenz liegende und zur 16S rRNA komplementäre Basen sind fett gedruckt, das jeweilige Startcodon mit einer Welle unterstrichen. Bei *tmpA(2)* handelt es sich um Bereich des verkürzten Leserahmens.

### Potentielle Promotorregion $P_t$ für das *tra*-Operon

Im Promotorbereich des *tra*-Operons konnte mithilfe des Programms Neural Network Promoter Prediction (REESE, 1998) ein *E. coli*-ähnlicher  $\sigma^{70}$ -Faktor abhängiger Promotor  $P_t$  ermittelt werden.



GGGGTTTGGGGAGCAATGGAACCGAAAACCAACGTAAGCACGAATTAGAGTTCGCTTTACTCGTATGTGACTGT  
 TGATTGGAGAACTCTGATTGTGAAACGAGTTTATCGAACCGCTTTTTCGGATGTTTACGGTCCTTCCTGATGTTT  
 GTTAAAGCGGTTTCATAAAACGGTGGTTTTATCGTACTCCCAGACAGAGCGCTGGTTTTCGGGGCAGGTACTGGG  
 CTTAAGTGCCTTACTGTTCCATTGCTCCCCGAACCCC

**Abb. 3.3.6**  $\Delta$ -x-IS-Element mit 262 bp und (32/38) inverted repeat. Die zum IR gehörenden Nukleotide sind grau hinterlegt. Zueinander revers komplementäre Nukleotide sind dabei weiß, die restlichen schwarz gedruckt.

Aufgrund der Nukleotidabfolge der 38 bp-Sequenzwiederholung und aufgrund der charakteristischen Länge wird dieses Element in die Tn3-Familie eingeordnet (Tab. 3.3.2).

**Tab. 3.3.2** Terminale inverted repeats (IR) von Vertretern der Tn3-Familie.

Tn3	GGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAG
Tn1000L	GGGGTTTGAGGGCCAAATGGAAACGAAAACGTACGTTAAG
Tn1000R	T T
Tn501	GGGGGAACCGCAGAATTCCGGAAAATAATCGTACGCTAAG
Tn4430	GGGGTACCGCCAGCATTTCGGAAAATAAACACGCTAAG
Tn1721L	GGGGGAACCGCAGAATTCCGGAAAATAATCGTACGCTAAG
Tn1721R	AGC
Tn21R	GGGGTCGTCTCAGAAAAACGGAAAATAAAGCACGCTAAG
Tn21L	G AC
$\Delta$ x-ISR	GGGGTTTGGGGAGCAAATGGAAACCGAAAACCAACGTAAG
$\Delta$ x-ISL	C A T GC T

Die konservierten Motive sind grau hinterlegt. L steht für linkes IR, R für rechtes IR. Bei dem mittleren Motiv handelt es sich um PyGGAA.

Interessanterweise liegt auf dem Plasmid pPGH2 upstream von diesem Element (wie auch auf dem Plasmid pKW1) das Transfer-Gen *traG*. Allerdings beträgt der Abstand vom Stopcodon von *traG* bis zum Beginn des  $\Delta$ -x-IS-Elementes auf pPGH2 195 bp gegenüber 625 bp in dieser Arbeit.

Bei einer Insertion dieses Fragmentes an einer bestimmten Erkennungssequenz im Nukleotidstrang sollte das Insertionselement gewöhnlich von einer mehrere Basenpaare langen Sequenzwiederholung flankiert sein, wie sie auch von HEINARU et al. (1997) mit einer 5 bp Sequenzwiederholung beobachtet worden ist. Allerdings lässt sich diese 5 bp lange direkte Se-

quenzwiederholung sowohl bei dem Insertionselement auf pPGH2 (HERRMANN et al., 1999, AF130439) als auch auf dem Plasmid pKW1 nicht beobachten.

Auf dem von den 38 bp-IRs eingerahmten Bereich mit 186 bp konnten durch Nukleotidsequenzvergleiche mit Datenbanken keine Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen oder Protein- bzw. Nukleotidmotiven, die in die Transposition bzw. Integration von DNA-Fragmenten eingebunden sind, ermittelt werden. Ebenso konnte aus der zentralen Nukleotidsequenz kein Leserahmen abgeleitet werden, dessen Länge zehn Aminosäuren überschreitet.

### **Unterschiede zwischen *tnpA(1)* und *tnpA(2)***

Beim Nukleotidsequenzvergleich von *tnpA(1)* und *tnpA(2)* fällt auf, dass dem Transposase-Gen *tnpA(2)* im upstream-Bereich genau 140 bp fehlen, die beiden Transposase-Gene allerdings über die restlichen 1441 bp zu 100% identisch sind. Ein offener Leserahmen lässt sich durch die fehlenden 140 bp erst weitere 164 bp ermitteln. Somit besitzt der Leserahmen für *tnpA(2)* eine um 303 bp verkürzte Nukleotidsequenz und damit auch eine um 101 Aminosäuren verkürzte Aminosäuresequenz.

Auffallend ist, dass die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz der beiden im downstream-Bereich vollkommen identischen Transposasen *tnpA(1)* und *tnpA(2)* etwa 195 Nukleotide nach dem Stopcodon abrupt abbricht. Kurz vor dem Abbruch der Sequenzen konnte ein 38-bp-Motiv ausgemacht werden, welches ebenso im downstream-Bereich von sequenz-ähnlichen Transposasen zu beobachten ist. Interessanterweise ist die Sequenz zwischen Stopcodon und 38 bp-Motiv in den untersuchten Stämmen (Tab. 3.3.3) unterschiedlich.

Ebenso fällt auf, dass dieses Element bisher ausschließlich nur im downstream-Bereich von Transposasen auftritt und bei den Beispielen aus der Literatur, mit Ausnahme von *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* NRRLB-12227 (AF086815), genau 148 bp nach dem Stopcodon der vorausgehenden Transposase beginnt. Im Vergleich dazu beginnt bei *Pseudomonas putida* GJ31 das 38 bp-Motiv 157 bp nach dem Stopcodon.

Die durch Nukleotidsequenzvergleich gefundenen 38 bp-Motive sind in der folgenden Tabelle 3.3.3 gegenübergestellt.



destens aber 11 Genen, welche für eine erfolgreiche Mobilisierung und den interzellulären Transfer von DNA benötigt werden (POHLMAN, 1994).

**Tab. 3.3.4** Zusammenstellung der Identitäten [%] auf Basis der vollständigen Aminosäuresequenz der in dieser Arbeit identifizierten Leserahmen *traN*, *traE*, *traO*, *traF* und *traG* mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen aus Transfer-Operons ausgewählter Stämme.

Spezies	Identische Aminosäuren in [%] mit					Accession-Nr.
	TraN	TraE	TraO	TraF	TraG	
<i>Salmonella typhimurium</i>	58	46	46	43	47	AY046276
<i>Escherichia coli</i>	58	39	46	43	47	U09868
<i>Escherichia coli</i>	47	39	36	35	43	X81123
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36	23	25	35	34	NC_003064
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	-	33	32	37	32	NC_003122
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	31	34	28	33	AF447808
<i>Xylella fastidiosa</i>	-	26	32	30	35	AE003851
<i>Mesorhizobium loti</i>	-	21	28	25	30	AP003015

Bei den vier letztgenannten Stämmen ist das Protein TraN zwar vorhanden, zeigt allerdings keine bemerkenswerte Identität mit TraN aus Stamm GJ31.

Aus dem Aminosäuresequenzvergleich ergibt sich, dass in den in Tab. 3.3.4 aufgeführten Stämmen bezüglich Länge und Aminosäuresequenz nicht nur ähnliche Proteine vorhanden sind, sondern dass diese ausnahmslos auch in derselben Abfolge im *tra*-Operon vorliegen.

### Das Genprodukt TraN

Beim offenen Leserahmen *traN* handelt es sich um ein verhältnismäßig kleines Gen, das für 63 Aminosäuren codiert. Aus Aminosäuresequenzvergleichen ergibt sich, dass Ähnlichkeiten zu anderen, ebenfalls in der Größe korrespondierenden Proteinen besteht, die zur Gruppe der Transfer-Proteine gezählt werden.

Vertreter dieser Proteinfamilie sind in der äußeren Membran lokalisiert und werden bei der Konjugation für eine Verbindung von Donor- und Rezipientenzelle verantwortlich gemacht (KLIMKE & FROST, 1998).

### Das Genprodukt TraE

Der offene Leserahmen *traE* codiert 240 Aminosäuren und korrespondiert in seiner Länge und seiner Aminosäuresequenz ebenso mit Proteinen, die zur Gruppe der Transfer-Proteine

gezählt werden. Nach LI et al. (1997) handelt es sich bei Vertretern dieser Proteinfamilie um DNA-Topoisomerasen III, wie sie auch in *E. coli* beobachtet worden sind. Vertreter dieser noch nicht lange bekannten Familie von Topoisomerasen kann nicht nur negative superhelicale Windungen entspannen (ohne ATP) sondern auch negative Supercoils in ringförmige DNA einführen (mit ATP).

Nebenbei besitzen diese Enzyme auch eine ausgeprägte Decatenase-Funktion. Aufgrund dieser Eigenschaften vermutet man, dass TraE in die Auflösung von Replikations-Intermediaten der Plasmid-DNA sowohl während der vegetativen Replikation als auch beim konjugativen DNA-Transfer eingebunden ist.

### **Das Genprodukt TraO**

Der offene Leserahmen *traO* codiert 292 Aminosäuren und korrespondiert in seiner Länge und seiner Aminosäuresequenz mit Proteinen, die zur Gruppe der Transfer-Proteine gezählt werden. Über seine Funktion ist allerdings noch nichts bekannt.

### **Das Genprodukt TraF**

Der offene Leserahmen *traF* codiert 385 Aminosäuren und korrespondiert in seiner Länge und seiner Aminosäuresequenz ebenso mit Proteinen, die zur Gruppe der Transfer-Proteine gezählt werden. Über seine Funktion ist allerdings noch nichts bekannt.

### **Das Genprodukt TraG**

Der offene Leserahmen *traG* codiert für 343 Aminosäuren und korrespondiert in seiner Länge und seiner Aminosäuresequenz ebenso mit Proteinen, die zur Gruppe der Transfer-Proteine gezählt werden. Beim F-Plasmid von *E. coli* ist das Protein TraG in zwei Schritte der Konjugation involviert. Das Genprodukt TraG liegt in der Cytoplasmamembran und ist in die Pilus-Biosynthese eingebunden. Zum anderen beteiligt es sich an der Stabilisierung des Paarungskomplexes, der bei der Konjugation zwischen Donor und Rezipient gebildet wird (FIRTH & SKURRY, 1992).

### 3.3.3.2 Die Genprodukte TnpA(1) und TnpA(2)

Die offenen Leserahmen *tnpA(1)* und *tnpA(2)* codieren für 526 und 425 Aminosäuren und weisen in ihrer Sequenz große Ähnlichkeiten mit Transposasen auf. Dabei stimmen die 425 Aminosäuren von *tnpA(2)* vollständig mit dem carboxyterminalen Bereich von *tnpA(1)* überein. Wie zuvor unter Punkt 3.3.2 erwähnt, fehlen dem mit *tnpA(1)* übereinstimmenden Bereich von *tnpA(2)* vermutlich durch ein Deletionsereignis die ersten 140 Nukleotide, so dass erst weitere 164 Nukleotide später ein geeigneter Leserahmen im selben Leseraster beginnt und *tnpA(2)* dadurch um 303 Nukleotide bzw. 101 Aminosäuren verkürzt vorliegt.

Hinweise darauf, ob durch den verkürzten Leserahmen von *tnpA(2)* überhaupt eine Transposaseaktivität zu erwarten ist, liegen nicht vor. Interessanterweise gibt es jedoch in *Pseudomonas pavonaceae* eine Transposase (AJ250371), deren Leserahmen mit 381 Aminosäuren mit dem von *tnpA(2)* in der Länge korrespondiert und die ebenfalls einen um 101 Aminosäuren verkürzten aminoterminalen Bereich besitzt.

In der folgenden Tabelle 3.3.5 sind einige Vertreter von Transposasen aufgeführt, die mit den in dieser Arbeit ermittelten Leserahmen Übereinstimmungen aufzeigen. Hierunter befindet sich auch die Transposase aus *Pseudomonas pavonaceae* mit dem um 101 Aminosäuren verkürzten aminoterminalen Bereich.

**Tab. 3.3.5** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten der beiden Transposasen TnpA(1) und TnpA(2) vom Plasmid pKW1 mit denen von ähnlichen Transposasen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit TnpA in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	TnpA	identische	homologe	
<i>Pseudomonas huttiensis</i>	1-515	1-526	72	79	AF342828
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	1-515	1-526	72	79	AF028594
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	1-515	1-526	72	79	U66917
<i>Pseudomonas pavonaceae</i>	1-381	102-526	52	63	AJ250371
<i>Escherichia coli</i>	17-488	9-489	31	42	AF231986
<i>Salmonella typhimurium</i>	9-499	3-490	31	42	AJ310778

Die Werte für Identität und Homologie beziehen sich auf die vollständig vorhandene Transposase TnpA(1).

### 3.3.3.3 Die Genprodukte der Leserahmen CbzT, CbzE und CbzX

Ausführliche Analysen der Genprodukte CbzT, CbzX und vor allem der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase CbzE finden sich bei MARS et al. (1997).

### 3.3.3.4 Das Genprodukt CbzG

Der offene Leserahmen *cbzG* codiert für 486 Aminosäuren und bildet das Genprodukt CbzG. Durch Vergleiche mit Proteinmotivdatenbanken kann CbzG der sehr großen Familie der Aldehyd-Dehydrogenasen (pfam00171) zugeordnet werden. Vertreter dieser Gruppe kommen nicht nur in Bakterien sondern auch in Säugetieren, Pflanzen und Pilzen vor.

Dabei handelt es sich um Enzyme, die in der Lage sind, eine breite Palette von aliphatischen und aromatischen Verbindungen mit NADP<sup>+</sup> als Co-Faktor zu oxidieren. So wandeln Aldehyd-Dehydrogenasen in *E. coli* beispielsweise Succinatsemialdehyd in Gegenwart von NADP<sup>+</sup> zu Succinat um und katalysieren in Pflanzen den letzten Schritt in der Betain-Biosynthese, indem sie Betinaldehyd zu Betain oxidieren (WERETILNYK & HANSON, 1990). Bei Pseudomonaden sind Aldehyd-Dehydrogenasen ebenfalls häufig in den Metabolismus von aliphatischen und aromatischen Aldehyden involviert.

**Tab. 3.3.6** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von CbzG mit denen von ähnlichen 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenasen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit CbzG in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	CbzG	identische	homologe	
<i>Pseudomonas putida</i>	1-486	1-486	73	82	D85415
<i>Comamonas testosteroni</i>	1-483	1-485	63	75	AB029044
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1-485	1-485	62	73	AF039534
<i>Acinetobacter</i> sp.	1-485	1-485	61	73	AB008831
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1-485	1-485	61	73	JW0056
<i>Pseudomonas putida</i> pWW0	1-485	1-485	56	68	M64747

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

So werden in *Pseudomonas putida* verschiedene 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenasen beispielsweise beim Abbau von Phenolen, Cresolen oder Catecholen über den *meta*-Weg beobachtet (NORDLUND et al., 1990).

Aus Untersuchungen mit Aldehyd-Dehydrogenasen aus Säugetierzellen konnte gezeigt werden, dass für die katalytische Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenasen sowohl ein Glutaminsäurerest als auch ein Cystein verantwortlich ist. Es konnten somit zwei Sequenzmuster für diese Familie ermittelt werden, die auch für die bakteriellen Vertreter verbindlich zu sein scheinen. Bei dem einen Sequenzmuster handelt es sich um das folgende Motiv: [LIVMFGA]-E-[LIMSTAC]-[GS]-G-[KNLM]-[SADN]-[TAPFV] Dabei stellt die Glutaminsäure E-254 die katalytisch aktive Stelle dar.

Das andere Motiv liegt etwas weiter zum carboxyterminalen Ende hin und besteht aus der Konsensussequenz [FYLVA]-x<sub>3</sub>-G-[QE]-x-C-[LIVMGSTANC]-[AGCN]-x-[GSTADNEKR], wobei hier die Aminosäure Cystein C-284 als aktive Stelle fungiert.

		↓		↓		
CbzG	244	GADGIRPVSL	ELGGKNA	AVVFADCDFENALATVTRSA	FENCGQVCLGTERVYVERPIFDKFV	305
TdnE	244	AADGVRPVSL	EMGGKNA	AVVFADCDFQVTIDTLTRSC	FENAGQVCLGTERVYVERPIFDKVV	305
CdoG	244	AAKGARPVSL	EMGGKNA	AIVFADCDFDAAIEGTLRSA	FVNCGQVCLGTERVYVERPIFDKFV	305
AphC	244	AAKGARPVSL	EMGGKNA	AIVFADCDFDAAIDGTLRSA	FVNSGQVCLGTERVYVERPIYERFV	305
NahI	244	AAKGVRQVSL	ELGGKNA	GIVFADCDLKAIEGTLRSA	FANCGQVCLGTERVYVERPIFDAFV	305
AtdC	244	AAKGIRDISL	ELGGKNA	ALVFADCDMDKAIEGTMRSA	FANCGQVCLGTERVYVERSIFDEFV	305
DmpC	244	AAKGVRPVSL	FELGGKNA	GIVFADCDLKAIEGSMRSV	FANGGQVCLGTERLYVERPIFDEFV	305
XylG <sup>1</sup>	244	AAKGVRQVSL	ELGGKNA	GIVFADCDMDKAIEGTLRSA	FANCGQVCLGTERVYVERPIFDAFV	305
XylG <sup>2</sup>	264	AAIGVRDISL	FELGGKNA	AIVFADADLDKAVEGLSRSV	FLNTGQVCLGTERVYVERPIFDAFV	325
PhnG	243	AATGVRDISL	FELGGKNA	AIVFADADLDKAVEGLSRSV	FLNTGQVCLGTERVYVERPIFDAFV	304
		. * * * :	***** :	***** :	***** :	***** :

**Abb. 3.3.8** Gegenüberstellung der zu CbzG ähnlichsten 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenasen im Bereich der beiden für die Katalyse wichtigen Motive. Die zu den Motiven gehörenden Aminosäuren sind grau hinterlegt und weiß gedruckt. Identische Aminosäuren (\*), strukturell ähnliche (:), und strukturell bedingt ähnliche (.) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren Glutaminsäure E-254 und Cystein C-284 sind zusätzlich mit Pfeilen gekennzeichnet. Die miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen stammen von TdnE aus *Pseudomonas putida* UCC22 Plasmid pTDN1 (D85415); CdoG aus *Comamonas* sp. JS765 (AF190463); AphC aus *Comamonas testosteroni* TA441 (AB029044); NahI aus *Pseudomonas stutzeri* An10 (AF039534); AtdC aus *Acinetobacter* sp. YAA (AB008831); DmpC aus *Pseudomonas putida* CF600 (X52805); XylG<sup>1</sup> aus *Pseudomonas putida*, PaW1 Plasmid pWW0 (M64747); XylG<sup>2</sup> aus *Novosphingobium aromaticivorans* F199 Plasmid pNL1 (AF079317); PhnG aus *Sphingomonas chungbukensis* DJ77 (AF023839).

Zur Überprüfung der Aktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase wurde *cbzG* (Primer *cbzG*-XP-1/2), wie unter 2.10 beschrieben, in den Expressionsvektor pJOE2702 kloniert und das entstandene Plasmid pXPG im Stamm *E. coli* XL1-Blue exprimiert. Enzymtests mit Rohextrakt aus einem Klon mit Plasmid pXPG ergaben mit 1811 Units/mg Protein eine starke Aktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, während mit einer Negativ-Kontrolle (pJOE2702 ohne Insert) keine Aktivität gemessen werden konnte.

### 3.3.3.5 Das Genprodukt GST

Der offene Leserahmen GST codiert für 204 Aminosäuren. Seine Aminosäuresequenz zeigt im Datenbankvergleich hohe Ähnlichkeit zu Glutathion S-Transferasen (GST), wie sie auch in Pseudomonaden, Enterobacteriaceen und Salmonellen anzutreffen sind.

**Tab. 3.3.7** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von GST mit denen von ähnlichen Glutathion S-Transferasen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit GST in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	GST	identische	homologe	
<i>Pseudomonas</i> sp.	1-202	1-202	69	81	X76500
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	1-202	1-202	69	81	D85853
<i>Pseudomonas</i> sp.	1-196	1-196	69	81	AJ145982
<i>Ralstonia</i> sp.	1-187	10-196	67	80	AJ145984
<i>Escherichia coli</i>	1-200	1-200	48	63	AP002558
<i>Salmonella typhimurium</i>	1-200	1-200	46	61	AE008763

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

Glutathion S-Transferasen gehören zu einer ubiquitär vorhandenen Enzymfamilie, welche nicht nur in Prokaryonten sondern ebenso in Eukaryonten, Pflanzen und Säugetierzellen angetroffen werden. Vertreter dieser Enzymfamilie katalysieren die Reaktion von Glutathion mit einer großen Palette von in erster Linie hydrophoben Substanzen (MANNERVIK, 1985; HAYES & PULFORD, 1995). Gerade diese Reaktion spielt bei der Metabolisierung und der anschließenden Eliminierung von Xenobiotika eine wichtige Rolle.

Durch Abgleich der Aminosäuresequenz von GST mit Proteinmotivdatenbanken konnten zwei für Glutathion S-Transferasen wichtige Domänen gefunden werden. Die eine liegt im aminoterminalen Bereich, erstreckt sich über etwa 90 Aminosäuren und agiert als Bindestelle für das Glutathion (G-site). Aus Röntgenstrukturuntersuchungen fanden NISHIDA et al. (1998), dass für die katalytische Aktivität die Aminosäurereste Cystein C-10 und Histidin H-106 (siehe Abb. 3.3.9) essentiell sind.

Die zweite Domäne befindet sich im carboxyterminalen Bereich, erstreckt sich über etwa 60 Aminosäuren und bildet eine Bindestelle für hydrophobe Substrate (H-site). Die carboxyterminale Domäne zeigt auch gegenüber Isoenzymen eine größere Variabilität, was sich folglich

in Unterschieden der Substratspezifität widerspiegelt. Da über die Substratspezifitäten der verglichenen prokaryontischen Glutathion S-Transferasen wenig gesicherte Erkenntnisse vorliegen, konnte mit Hilfe des Aminosäuresequenzvergleichs des carboxyterminalen Abschnittes keine weiteren Rückschlüsse auf die Substratspezifität des Genproduktes GST vom Plasmid pKW1 gezogen werden.

GST	1	MKLYYSPGAC	SLSPHIALR . . . LNFISTEIH	HKSFSPLFNP	DAS	118
BphX0	1	MKLYYSPGAC	SLSPHIALR . . . LNFISSEL	HKSFSPLFNP	PASS	118
NagJ	1	MKLYYSPGAC	SSSPHIILR . . . LNFISTEL	HKSFALFSPV	FVP	118
XylK	1	MKLYYSPGSC	SLSPHIAIH . . . LNFLSTEL	HKGLAPLFNP	PALS	120
RSc0817	1	MKLYYFPGAC	SLSPHIVAR . . . LGWINSEL	HKSYSPLFNS	SSTP	118
BphK	1	MKLFISPGAC	SLAPHIALR . . . LSFLGSEF	HKAFVPLFTP	PGTS	118
YP02367	1	MKLFYKPGAC	SLSPHIVLR . . . LNFIATEL	HKGFSPLFNP	NTP	118
PhnC	1	MKLFISPGAC	SLAPHIALR . . . LSFLGSEF	HKAFVPLFTP	GSS	118
		***:	**:*	:***	:	*.: : :***. .** . .

**Abb. 3.3.9** Gegenüberstellung der zu GST ähnlichsten Glutathion S-Transferasen im Bereich der beiden für die Katalyse wichtigen Motive C-10 und H-106. Die zu den Motiven gehörenden Aminosäuren sind grau hinterlegt und weiß gedruckt. Identische Aminosäuren (\*), strukturell ähnliche (:), und strukturell bedingt ähnliche (.) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen stammen von BphX0 aus *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (D85853); Ralstonia sp. U2 Plasmid pWWU2 (AF036940); XylK aus *Cycloclasticus oligotrophus* RB1 (U51165); RSc0817 aus *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (AL646061); BphK aus *Novosphingobium aromaticivorans* F199 Plasmid pNL1 (AF079317); YP02367 aus *Yersina pestis* C092 (AJ414152); PhnC aus *Pseudomonas* sp. DJ77 (AJ001103).

### 3.3.3.6 Das Genprodukt CbzJ

Der sich an *tnpA(2)* anschließende Leserahmen *cbzJ* codiert für 264 Aminosäuren und kann anhand von Datenbankvergleichen (pfam01689) einer Familie zugeordnet werden, die sowohl

**Tab. 3.3.8** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von CbzJ mit denen von ähnlichen ausgewählten Vertretern aus der Familie der Hydratasen und Decarboxylasen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit CbzJ in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	CbzJ	identische	homologe	
<i>Comamonas testosteroni</i>	7 - 245	3 - 245	35	49	AB029044
<i>Pseudomonas putida</i>	36 - 248	32 - 246	35	50	D85415
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	7 - 234	6 - 233	33	49	AF039534
<i>Pseudomonas putida</i>	7 - 231	7 - 233	32	49	AF319593
<i>Escherichia coli</i>	5 - 244	4 - 244	30	44	Y09555
<i>Pseudomonas putida</i> pWW0	40 - 250	34 - 246	30	49	AJ344068

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

2-Keto-4-pentenoat-Hydratasen (4-Oxalocrotonat-Hydratasen) als auch 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen in sich vereint.

Bei der Analyse der Aminosäuresequenz konnten in den hochkonservierten Regionen mehrere Motive ermittelt werden, die für 2-Keto-4-pentenoat-Hydratasen charakteristisch sind (POLLARD & BUGG, 1998). Neben einem G-x-K-x-G-Motiv in Position 56-60 ist das P-D-x-G-Motiv in Position 75-78 zwar bei den meisten Hydratasen vorhanden, bei CbzJ ist die saure Aminosäure Asparaginsäure (D) allerdings durch das strukturell ähnliche aber chemisch unterschiedlich wirkende Asparagin (N) substituiert. Durch Aminosäuresequenzvergleich bekannter 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen wurde ersichtlich, dass bei diesen Enzymen aus dem P-D-x-G-Motiv der Hydratasen das Motiv P-x<sub>2</sub>-G resultiert. Die beiden weiteren bei den Hydratasen notwendigen und somit hochkonservierten Motive P-x<sub>2</sub>-E-x-E und D-T-x<sub>2</sub>-D-N-A in den Positionen 99-104 und 155-161 finden sich nur zum Teil wieder. Während das P-x<sub>2</sub>-E-x-E-Motiv vollständig vorhanden ist, liegt das D-T-x<sub>2</sub>-D-N-A-Motiv nur unvollständig vor.

CbzJ	(H)	55	GRRLVGRKIGL	TNPKVQAQLGVDQ	PDFGCLFAD	MAYGDNEVI	PFE-RVLQPKIEAEIALIL	114
MhpD <sup>1</sup>	(H)	55	GRRVVGRKVGL	THPKVQQQLGVDQ	PDFGTLFAD	MCYGDNEIIPFS-RVLQPRIEAEIALVL	114	
MhpD <sup>2</sup>	(H)	55	GRRIVGRKIGL	TSIAVQRQLGVDQ	PDFGTLFAD	MLYGDDEAVPLS-RTLQPKVEAEVALVL	114	
XylJ <sup>1</sup>	(H)	55	GRRLVGRKIGL	TSIAVQRQLGVDQ	PDYGMFL	FADMDVPEGIPVSLD-QVIQPKVEAEIAIVV	114	
AmnF	(H)	51	GRRVTGRKIGL	TSAAVQQLGVDQ	PDFGTLFDS	MAVNDGEEIAWS-RTLQPKCEAEVALVI	110	
XylJ <sup>2</sup>	(H)	53	GERVICGKKIG	VTSKAVQNMLGVHQ	PDFGYLTD	AMVYNSGEAMPISEKLIQPRAEGETIAFIL	113	
TdnK	(D)	55	GARVVGLKAGL	TSHAKMRQMGVTD	PVFGFLV	DEYVVEGATVNTA-ELIHPKVEPEIAFVL	114	
AphH	(D)	55	GARVVGLKAGL	TSHAKMKQMGVTD	PVFGFLV	DYFVSPDGGTVKTS-ELIHPKVEPEIAFVL	114	
CdoK	(D)	55	GARVVGLKAGL	TSHAKMQMGVTD	PVFGFLV	DDYVAEAGAAVDTK-ALIHHPKVEPEIAFVL	114	
OrfA	(D)	57	GNRVTGLKML	GLTSWAKMAQMGVET	PIYGF	LADYFVSPDGGTVDCS-KLIHPKIEAEISVVT	116	
			* * * * *	: : * : * *	.	: : * * * * *		
CbzJ	(H)	103	QPKIEAEIALI	LIERDLPSASTTFAD	VIAATGWV	PALEVVGSRIEGWN-IKFADTVADNAS	162	
MhpD <sup>1</sup>	(H)	103	QPRIEAEIALV	LNRDLPATDITFDE	LYNAIEWV	PALEVVGSRIEDWS-IQFVDTVADNAS	162	
MhpD <sup>2</sup>	(H)	103	QPKVEAEVALV	LAKDLERPDTTLVD	VISATAYV	PAIEIVGSRIADWN-IRFIDTVADNAS	162	
XylJ <sup>1</sup>	(H)	103	QPKVEAEIAIV	GRDLPHDPMTTAEM	IRAVEYV	PAIEIVDSRVANWD-IKIWDTIADNAS	162	
AmnF	(H)	99	QPKCEAEVALV	IERDLHENITLIDL	IGATAYAL	PAIEVVGSRIANWD-INILDTVADNAS	158	
XylJ <sup>2</sup>	(H)	102	QPRAEGETIAF	ILKDLKMGPGVTN	ADVLAATEC	VIPCFFVVDSDRIQDWK-IKIQDTVADNAS	161	
TdnK	(D)	103	HPKVEPEIAF	VLKHALKGPGCH	IGAVLAAT	DFVLPGLIEVIDSRYNFK-FDLKSVVADNTS	162	
AphH	(D)	103	HPKVEPEIAF	VLKHALKGPGCH	IGAVLAAT	DFVMPGLIEVIDSRYRDFK-FDLKSVVADNTS	162	
CdoK	(D)	103	HPKVEPEIAF	VLKHALKGPGCH	IGAVLAAT	DFVMPGLIEVIDSRYRDFK-FDLKSVVADNTS	162	
OrfA	(D)	102	HPKIEPEIAF	RRTARELRGT-V	TRDEVLD	ACESVFAAMEILDSRYRDFKYFSLPVDVADNAS	161	
XylI	(D)	105	HPKIEAEISV	VTKAPLTGPGCH	IGDVIAAV	DYVIPTVEVIDSRYENFK-FDLISVVADNAS	164	
			: * : * * : .	*	:	* . . . * : : * * . : . : . : * * * * *		

**Abb. 3.3.10** Vergleich der Aminosäuresequenz von CbzJ im Bereich der katalytischen Domänen sowohl mit den sequenzähnlichen 4-Oxalocrotonat-Hydratasen MhpD<sup>1</sup>, MhpD<sup>2</sup>, XylJ<sup>1</sup>, AmnF und XylJ<sup>2</sup> (markiert mit H) als auch mit den 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen TdnK, AphH, CdoK, OrfA und XylI (markiert mit D). Die hochkonservierten Aminosäuren der katalytischen Domänen G-x-K-x-G, P-x<sub>2</sub>-G und P-x<sub>2</sub>-E-x-E sind grau hinterlegt und weiß gedruckt. Die zu den Motiven gehörenden Aminosäuren sind grau hinterlegt und weiß gedruckt. Identische Aminosäuren (\*), strukturell ähnliche (:), und strukturell bedingt ähnliche (.) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen stammen von MhpD<sup>1</sup> aus *E. coli* K-12 W3110 (D86239); MhpD<sup>2</sup> aus *Comamonas testosteroni* TA441 (AB024355); XylJ<sup>1</sup> aus *Novosphingobium aromaticivorans* F199 Plasmid pNL1 (AF079317); AmnF aus *Pseudomonas* sp. AP-3 (AB020521); XylJ<sup>2</sup> aus *Pseudomonas putida* Plasmid pWW0 (64747); TdnK aus *Pseudomonas putida* UCC22 Plasmid pTDN1 (D85415); AphH aus *Comamonas testosteroni* TA441 (AB029044); CdoK aus *Comamonas* sp. JS765 (AF190463); ORFA aus *Myxococcus xanthus* DZ2 (AF163841); XylI aus *Pseudomonas putida* PaW630 Plasmid pDK1 (AF134348).

Ebenso liegen die beiden hochkonservierten Aminosäurereste Tryptophan (W), die eigentlich in den Positionen W-149 und W-212 beobachtet werden, etwas versetzt in den Positionen W-143 und W-255. Bei den anderen vergleichbaren Oxalocrotonat-Decarboxylasen konnten diese konservierten Tryptophanreste nicht beobachtet werden.

Zur Überprüfung der Aktivität der 4-Oxalocrotonat-Hydratase wurde *cbzJ* (Primer *cbzJ*-XP-1/2), wie unter 2.10 beschrieben, in den Expressionsvektor pJOE2702 kloniert und das entstandene Plasmid pXPJ im Stamm *E. coli* XL1-Blue exprimiert. Enzymtests mit Rohextrakt aus einem Klon mit Plasmid pXPJ ergaben mit 1124 Units/mg Protein eine starke Aktivität der 4-Oxalocrotonat-Hydratase, während mit einer Negativ-Kontrolle (pJOE2702 ohne Insert) keine Aktivität gemessen werden konnte. Eine Decarboxylase-Aktivität konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

### 3.3.3.7 Die Genprodukte TnpA(3), TnpR und TnpA(4)

Downstream von *cbzJ* folgt mittelbar ein 106 bp langes Element, welches beim Vergleich der Nukleotidsequenz mit Datenbanken Bestandteil einer terminalen Sequenzwiederholung des IS-Elementes *IS1071* (, 19) ist. Diesem schließt sich unmittelbar ein zu *IS1071* gehörender offener Leserahmen für die Transposase von *IS1071* an, der nach 53 Aminosäuren abrupt unterbrochen wird. Die Unterbrechung wird durch eine 38 bp lange invertierte Sequenzwiederholung vom Transposon *Tn5501* verursacht. Die Nukleotidsequenz (insgesamt 304 bp) vom Beginn der 106 bp langen IR-Sequenz bis zum Abbruch durch die linke 38 bp lange IR-Sequenz von *Tn5501* ist vollkommen identisch mit denen von transponierbaren Elementen aus *Pseudomonas* sp. Plasmid pADP-1 (U66917), *Burkholderia cepacia* IS1471 (U67938), *Comamonas testosteroni* BR60 (M65135), *Ralstonia* sp. U2 Plasmid pWWU2 (AF036940) und *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (X78823).

*Tn5501* besitzt eine Länge von 5,5 kbp, gehört zur Tn3-Familie und wird aufgrund seiner charakteristischen IR-Sequenzen zu den Transposons der Klasse II gezählt. Neben einer Transposase beinhaltet es noch eine Resolvase, weitere offene Leserahmen sind nicht vorhanden (HERRMANN et al., 1998).

Da sich bei mehreren beidseitigen Ansequenzierungen (siehe Klonierungsstrategie in Abb. 3.3.3) jeweils vollkommene Übereinstimmungen der Nukleotidsequenz der klonierten Fragmente mit der für *Tn5501* aus Datenbanken ergaben, wurde auf eine vollständige, durchgängige Sequenzierung von *Tn5501* in dieser Arbeit abgesehen.

### 3.4 Lokalisierung, Klonierung und Sequenzierung eines *meta*-Weg-Operons auf Plasmid pKW1 aus *Pseudomonas putida* GJ31

In Abschnitt 3.3 konnte gezeigt werden, dass die von MARS et al. (1997) entdeckte Chlorbenzol-2,3-Dioxygenase in *Pseudomonas putida* GJ31 plasmidisch codiert ist. Da zahlreiche Beispiele aus der Natur bekannt sind, bei denen die degradativen Folgeenzyme, meist in Form von Clustern, ebenfalls plasmidisch codiert sind, wurde mithilfe von Sequenzvergleichen zwischen *meta*-Weg-Enzymen aus anderen Pseudomonaden nach weiteren Genen des *meta*-Weges sowohl mit Plasmid- als auch mit chromosomaler DNA von Stamm GJ31 als Matrize gesucht.

Mit Primern, die aus verschiedenen Nukleotidvergleichen aus Pseudomonaden generiert wurden, konnten keine PCR-Produkte amplifiziert und sequenziert werden, deren Sequenzen mit denen der üblichen degradativen Gene ausreichende Übereinstimmung aufweisen. Erst mit dem Primerpaar Qno26 und Qno27 (Tab. 2.4), die aus Sequenzvergleichen von 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolasen aus diversen *meta*-Weg-Clustern von *Escherichia coli* generiert wurden, ließ sich ein 730 bp großes Fragment amplifizieren, das nach anschließender Klonierung und Sequenzierung große Ähnlichkeit mit Genen aufwies, die für den aminoterminalen Teil von 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolasen aus *meta*-Weg-Clustern von *E. coli*-Stämmen codieren. Dieser Leserahmen soll im Folgenden in Anlehnung an die 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase *xylK* aus dem *xyl*-Operon mit *cbzK* bezeichnet werden.

Von diesem Startpunkt ausgehend wurden Primer für Acetaldehyd-Dehydrogenasen und für den carboxyterminalen Teil der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase aus anderen *meta*-Wegen generiert, die auf vergleichbaren Clustern upstream bzw. downstream von solchen Aldolasen liegen. Dabei wurde jeweils ein Primer aus dem bereits sequenzierten Bereich von *cbzK* gewählt. Dadurch wurde gewährleistet, dass nur benachbarte Regionen der bisher neu identifizierten 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase und nicht eine möglicherweise weitere Acetaldehyd-Dehydrogenase bzw. 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase an anderer Position erfasst wird. Für den Bereich downstream von *cbzK* wurde kein PCR-Produkt erhalten, das nach anschließender Sequenzierung Ähnlichkeit mit einer 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase aufwies. Mit den Primern Qno28 und Qno29 konnte ein 1,13 kbp großes Fragment amplifiziert werden, dessen Sequenz den upstream-Bereich von *cbzK* darstellt. Die Nukleotidsequenz wies eine hohe Ähnlichkeit mit denen von Acetaldehyd-Dehydrogenasen der zuvor erwähnten *meta*-Wege aus *Escherichia coli*-Stämmen auf und wurde ebenfalls in Anlehnung an die Acetaldehyd-Dehydrogenase *xylQ* aus dem *xyl*-Operon mit *cbzQ* bezeichnet.

Da ein weiteres „Abtasten“ der benachbarten Region mit Hilfe von Sequenzvergleichen erfolglos blieb, wurde ab hier mit dem GenomeWalking Kit weitergearbeitet.

Mit den genspezifischen Primerpaaren GSPB1 und AP1 sowie GSPB2 und AP2 (Tab. 2.4) konnten mehrere Fragmente amplifiziert, kloniert und sequenziert werden, so dass eine weitere 2,8 kbp große Nukleotidsequenz im downstream-Bereich von *cbzK* gewonnen werden konnte.

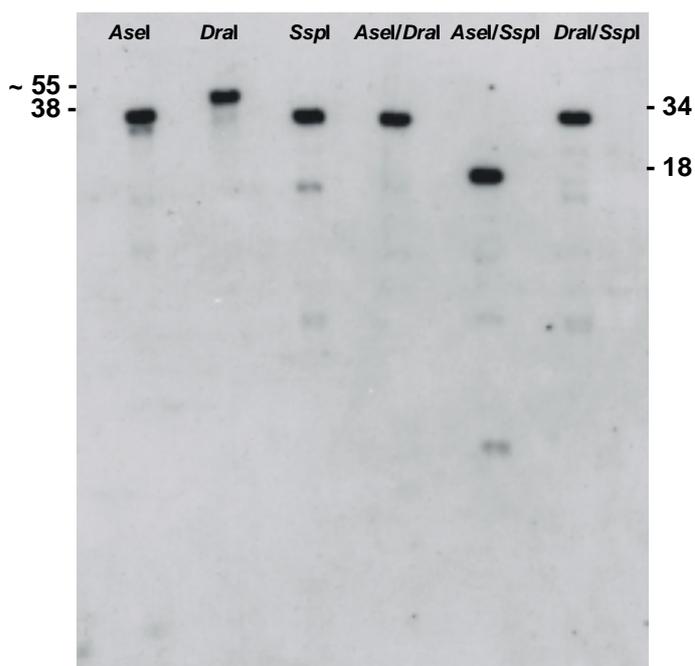
Dabei stellte sich heraus, dass das gefundene *meta*-Operon mit der Aldolase *cbzK* endet. Vergleichbare *meta*-Wege, wie das *xyl*-Operon oder das *dmp*-Operon für den Abbau von Phenol und 3,4-Dimethylphenol (SHINGLER et al., 1992), werden noch durch die 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase ergänzt. An Stelle dieses Oxalocrotonat-Zweiges schließt sich im weiteren Bereich downstream von *cbzK* eine Nukleotidsequenz an, die den offenen Leserahmen ORF2 und partiell den offenen Leserahmen ORF1 enthält.

Im upstream-Bereich von *cbzQ* konnten mit den genspezifischen Primern GSPE1 und GSPE2 sukzessive mehrere bis zu 1,3 kbp, sowie daran anschließend mit den Primern GDPG1 und GSPG2 bis zu 1,45 kbp große Fragmente amplifiziert, subkloniert und sequenziert werden.

Durch Sequenzvergleich mit Gendatenbanken ergab sich, dass in Nachbarschaft zur Acetaldehyd-Dehydrogenase CbzQ noch die Gene für eine 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase (im Folgenden CbzJ(2) genannt), eine 2-Hydroxy-6-ke-tonon-2,4-dienoat-Hydrolase (CbzF) und eine 2,3-Dihydroxyphenylpropionat-1,2-Dioxygenase (CbzE(2)) liegen. Vor der Dioxygenase konnte ein Regulatorgen aus der *gntR*-Familie (im Folgenden *gntR* genannt) identifiziert werden, zusätzlich ein offener Leserahmen ORF3 mit bisher unbekannter Funktion und ein offener Leserahmen ORF4, der wie *gntR* Ähnlichkeiten mit Regulatorgenen aufweist.

Insgesamt handelt es sich bei dem bisher durchsequenzierten 9632 bp großen Bereich um ein *meta*-Cluster, dem vermutlich ein entgegengesetzt orientiertes Operon-Regulator-Gen vorangestellt ist.

Um eine Zuordnung des *meta*-Operons bezüglich seiner Lage auf dem Plasmid machen zu können, wurde ein Amplifikat der Aldolase *cbzK*, wie zuvor das der Transposase, als radioaktiv markierte Gensonde in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt. Die bisher sequenzierten Gene konnten so einem etwa 18 kbp großem *AseI*-*SspI*-Fragment zugeordnet werden (Abb. 3.4.1), das sich direkt downstream vom 9,5 kbp-*SspI*-Fragment mit der zweiten Transposase *mpA(2)* befindet (siehe auch Abb. 3.3.2).



**Abb. 3.4.1** Autoradiogramm der Hybridisierung hydrolysierter Plasmid-DNA von pKW1 aus *Pseudomonas putida* GJ31. Die Hydrolyse erfolgte jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *AseI*, *DraI* und *SspI* sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander. Als homologe, radioaktiv markierte Sonde diente ein PCR-Fragment (Primer Qno26/27), welches einen Teil der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase *cbzK* codiert.

Die ungefähre Größe der hybridisierenden Fragmente ist jeweils auf gleicher Höhe in der Größenordnung [kbp] angegeben. Die Auftrennung erfolgte über ein 0,4%iges

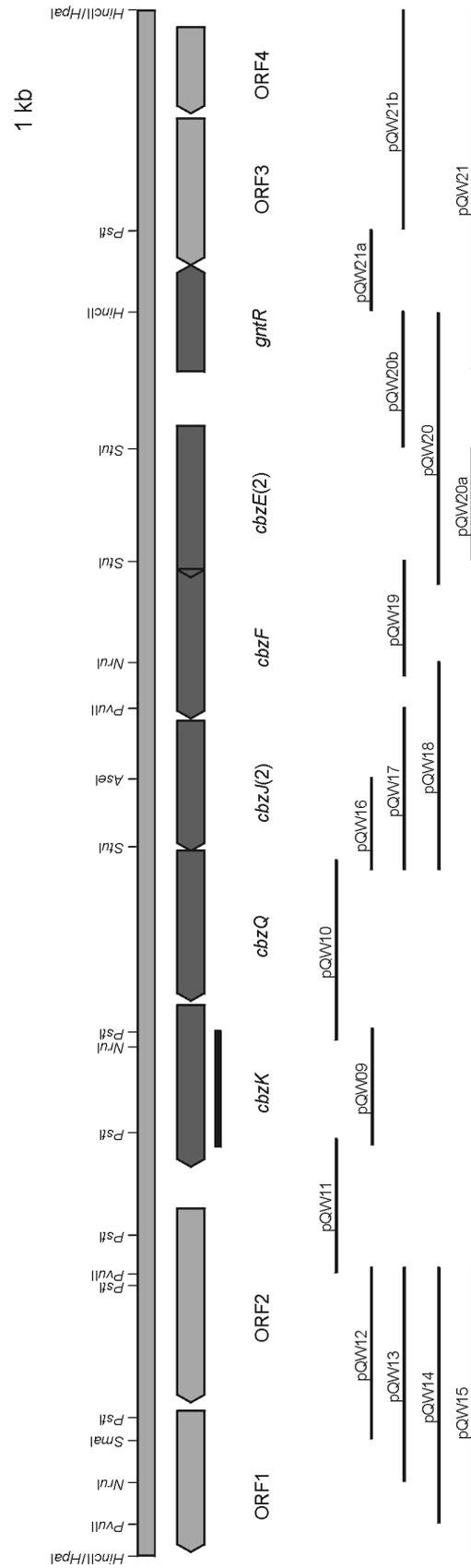
### 3.4.1 Analyse des plasmidisch codierten *meta*-Weges von *Pseudomonas putida* GJ31

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierte und auf dem Plasmid vorliegende 9632 bp DNA sowie die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Anhang (8.2) dargestellt. Der durchschnittliche GC-Gehalt von 55,3% entspricht nicht der für Pseudomonaden zu erwartenden Zusammensetzung der DNA, sondern kann eher *Escherichia coli* zugeordnet werden, womit die Ergebnisse der Sequenzvergleiche im Einklang stehen.

Unter Berücksichtigung der für Pseudomonaden und *E. coli* typischen Codonverwendung (KAZUSA et al., 1988) wurden in diesem 9632 bp großen Bereich die zehn offenen Leserahmen ORF1, ORF2, *cbzK*, *cbzQ*, *cbzJ*, *cbzF*, *cbzE(2)*, *gntR*, ORF3 und ORF4 identifiziert.

Die Anordnung und die Transkriptionsrichtung der Leserahmen ist in Abbildung 3.4.2 schematisch dargestellt. Abweichend von den übrigen Leserahmen ist ORF1 nur partiell vorhanden und codiert für 293 Aminosäuren.

Wahrscheinlich bilden die Leserahmen für *cbzE(2)FJ(2)QK* ein durchgehendes Transkript, da mit Ausnahme sowohl von *cbzF* und *cbzJ(2)* als auch von *cbzQ* und *cbzK* die Start- und Stop-codons benachbarter Gene überlappen (Tab. 3.4.1).



**Abb. 3.4.2** Organisation des *meta*-Operons vom Plasmid pKW1 aus *Pseudomonas putida* GJ31 und die zur vollständigen Sequenzierung benutzte Klonierungsstrategie; ORF1: 4-Hydroxy-benzoat-Transporter; ORF2: Porin; *gntR*: vermutlich Transkriptionsregulator; *cbzE(2)*: 2,3-Dioxygenase; *cbzF*: 2-Hydroxy-6-ketona-2,4-dienoat-Hydrolase; *cbzJ(2)*: 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase; *cbzQ*: Acetaldehyd-Dehydrogenase; *cbzK*: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase; ORF3 und ORF4: Funktion unbekannt; die zum *meta*-Operon gehörenden Gene sind dunkelgrau, alle anderen hellgrau schraffiert. Der schwarze Balken kennzeichnet die zur Lagefeststellung des Operons (relativ zu *cbzE*) benutzte radioaktive Sonde. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die für die Klonierung und Subklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen angegeben. Die gesamte Darstellung ist maßstabgetreu.

### 3.4.1.1 Analyse nichtcodierender Bereiche

In den nichtcodierenden Bereichen konnten potentielle Ribosomenbindestellen in dem für *Escherichia coli* typischen Abstand zum Startcodon für die offenen Leserahmen ORF1, ORF2, *gntR*, *cbzE(2)*, *cbzF*, *cbzJ(2)*, *cbzK*, ORF3 und ORF4 identifiziert werden (Tab. 3.4.1). Dabei beginnt der offene Leserahmen *cbzF* abweichend von den anderen Leserahmen als einziger mit dem Startcodon GTG.

Tab. 3.4.1 Gegenüberstellung der postulierten Ribosomenbindestellen der offenen Leserahmen ORF1, ORF2, *gntR*, *cbzE(2)*, *cbzJ(2)*, *cbzK*, ORF3, ORF4.

Leserahmen	Sequenz der Ribosomenbindestelle
ORF1	CAAGAACA <b>AAA</b> <b>AG</b> <b>AG</b> ACACGACATG
ORF2	GAGAGCTTT <b>GGA</b> <b>AGGG</b> <b>GT</b> TGCTATG
<i>gntR</i>	AACCGACCT <b>GGG</b> <b>AATTC</b> GACTCGAATG
<i>cbzE(2)</i>	GCATCGACGT <b>AA</b> <b>AGG</b> TTCCGTACCGATG
<i>cbzJ(2)</i>	TTTACCCACT <b>GACC</b> <b>GAGG</b> TCACGCATG
<i>cbzK</i>	GAGCCAGGCCTG <b>AGGAG</b> CGCAGTTATG
<b>ORF3</b>	TAGACATT <b>ACAT</b> <b>AGGA</b> TAATA <b>AAAA</b> ATG
<b>ORF4</b>	CGCTGCTTT <b>CAGT</b> <b>GGAG</b> CCTGATCATG
16S-rRNA	3' - UCUU <b>UCCUCC</b> ACUA - 5'

Die Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz sind grau hinterlegt, weitere außerhalb der grau hinterlegten Konsensussequenz liegende und zur 16S rRNA komplementäre Basen sind fett gedruckt, das jeweilige Startcodon mit einer Welle unterstrichen.

### Potentielle Promotor-Regionen $P_r$ von *gntR* und $P_m$ vom *meta*-Cluster

Sowohl für das Transkriptionsregulatorgen *gntR* als auch für das anschließende Gencluster konnten in den intergenischen Regionen mithilfe des Programmes Neural Network Promoter Prediction (REESE, 1998) *E. coli*-ähnliche  $\sigma^{70}$ -Faktor abhängige ermittelt werden.

Der Promotor des Regulatorgens *gntR* wird im Folgenden mit  $P_r$ , der von *cbzE(2)* bzw. des *meta*-Clusters mit  $P_m$  bezeichnet. In der folgenden Abb. 3.4.3 ist der potentielle Promotorbereich von *gntR* eingetragen. Der Transkriptionsstartpunkt liegt dabei 184 Nukleotide vor dem Beginn des Startcodons ATG.

-35-Region -10-Region    ↗  
 ATAACGCCATGCAGGTAGATTTGTT**TTTGTCT**GCCCAATCATCATGCACGCT**TAGAAT**GCTAGCAT  
 GCAAGTACAACAAGGCCCGCTCATCGCTCTGTGATCGACCGCCAGCACCAGAACGAGAGCAGCC  
 CGCCGACGAGCGACAACAGCGAAAATGACTGAAATCTGGTTTACTATCAGAAATGCTAGAATGTA  
 AGCCTGATCCTGACATCAATTCGCAACAACCGACCTGGGAATTCGACTCGAATG  
gntR ⇒

**Abb. 3.4.3** Promotorbereich  $P_r$  für das Regulorgen upstream von *gntR*. Die potentielle -35-Region und die -10-Region sind fett gedruckt. Der durch Neural Network Promoter Prediction errechnete Transkriptionsstartpunkt liegt 184 bp vor dem Startcodon, ist fett gedruckt und zusätzlich durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Startcodon gehört zu *gntR* und ist mit einer Welle unterstrichen.

Der upstream-Bereich von *cbzE(2)* ist mit dem upstream-Bereich von *gntR* identisch, da die Gene entgegengesetzt (divergent) transkribiert werden. Somit überschneiden sich die Promotorregionen von *gntR* und von *cbzE(2)* bzw. dem *meta*-Cluster.

Die für den upstream-Bereich von *cbzE(2)* identifizierte potentielle Promotorregion  $P_m$  kann aus Abb. 3.4.4 entnommen werden. Der Transkriptionsstartpunkt liegt in diesem Fall 269 Nukleotide vor dem Beginn des Startcodons ATG.

-35-Region -10-Region    ↗  
 TTGTTGCGAAT**TTGATGT**CAGGATCAGGCTTACATTCT**TAGCAT**TTCTGATAGTAAACCAGATTTC  
 ATCATTTCGCTGTTGTGCTCGCTCGTCGGCGGGCTGCTCTCGTTCTGGTGCTGGGCGGTTCGATCACA  
 GAGCGATGAGCGGGCCTTGTGTACTTGATGCTAGCATTCTAGCGTGCATGATGATTGGGCAGA  
 CAACAACAAATCTACCTGCATGGCGTTATCCCGCCGCTCATGGGCGTATCAGGGTTCCGCTCAT  
 GCCGTCCCAGTGCGAGGCGGCCTGCACTGGGGCATCGACGTAAAGGTTCCGTACCGATG  
cbzE(2) ⇒

**Abb. 3.4.4** Promotorbereich  $P_m$  upstream vom *meta*-Cluster. Die -35-Region und die -10-Region sind fett gedruckt. Der durch Neural Network Promoter Prediction errechnete Transkriptionsstartpunkt liegt 269 bp vor dem Startcodon, ist fett gedruckt und zusätzlich durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Startcodon gehört zu *cbzE(2)*, dem ersten Gen im *meta*-Cluster.

### Potentielle Repressor-Bindestellen in den Promotorbereichen $P_r$ und $P_m$

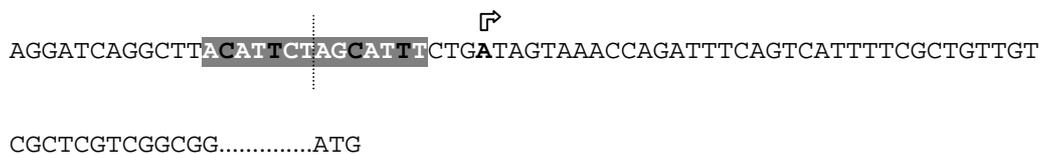
Weiterhin wurde die intergenische Region zwischen *gntR* und *cbzE(2)* nach Operatoren, also nach Regulator-Protein-Bindestellen untersucht. Nach OHTSUBO et al. (2001) liegt die Operator-Sequenz für Repressor-Proteine der *gntR*-Familie zum einen in einem A/T-reichen Bereich. Zum anderen befindet sich diese gewöhnlich im Nahbereich des Transkriptionsstartpunktes, bildet ein perfektes oder annähernd perfektes Inverted Repeat (IR) und besitzt die Konsensussequenz AN<sub>12</sub>T. Diese durch 12 Basenpaare getrennten konservierten Nukleotide scheinen laut ANDERSON et al. (1987) essentiell für DNA-bindende Proteine zu sein, die zur



GntR	TATCATACTTGTATACAAGTATACTC
HutR	TTGTTAACTTGTATATACATAATACA
BphS <sup>1</sup>	ATGCATAAATAACGTTATTTATAAAA
BphS <sup>2</sup>	TTAGAAAAATGTCGTTTTTTTCTAA
ORF0 <sup>1</sup>	GTCGATAATAATATCAACATTATGAC
ORF0 <sup>2</sup>	CGATAAATATAAATATCGATTATCGA
GJ31	AGGCTTACATTCTAGCATTCTGATA

**Abb. 3.4.7** Gegenüberstellung von experimentell ermittelten Repressor-Bindestellen in den Promotorbereichen des sich jeweils downstream anschließenden Operons für GntR (*Bacillus subtilis* Marburg 168 (J02584); HutR (*Pseudomonas putida*) ATCC 12633 (M33922); BphS<sup>1</sup> (*Pseudomonas* sp.) KKS102 (BAB64312); BphS<sup>2</sup> (*Ralstonia eutropha*) A5 auf Tn4371 (AJ012075); ORF0<sup>1</sup> (*Burkholderia cepacia*) LB400 (P37335); ORF0<sup>2</sup> (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) KF707 (BAA12882) und der potentiellen Bindestelle für GntR (*Pseudomonas putida*) GJ31. Die hochkonservierten Nukleotide des AN<sub>12</sub>T-Motivs sind grau hinterlegt, weitere zueinander revers komplementäre Basen sind fett gedruckt, die Symmetrieachse der invertierten Sequenzwiederholungen ist durch eine gestrichelte Linie angedeutet.

In der Promotor-Region von *cbzE(2)* konnte nur ein Bereich in der -10-Region ermittelt werden, der aufgrund der oben genannten Kriterien eine mögliche Repressor-Bindestelle darstellen und somit in die Transkriptionsregulation involviert sein könnte. Dabei handelt es sich um eine ebenfalls nicht perfekte Sequenzwiederholung (10/14).



**Abb. 3.4.6** AN<sub>12</sub>T-Motive aus dem Promotorbereich von *cbzE(2)*. Die zum IR gehörenden Nukleotide sind grau hinterlegt. Zueinander revers komplementäre Nukleotide sind darin weiß gedruckt, die restlichen schwarz. Die Symmetrieachse des IR wird durch eine gepunktete Linie angedeutet. Der Transkriptionsbeginn ist fett gedruckt und durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Aufgrund der Abweichung vom perfekten IR muss laut OHTSUBO et al. (2001) davon ausgegangen werden, dass sich die daraus folgende geringere Symmetrie auch in einer schwächeren Bindungsaffinität des Genproduktes GntR an den Nukleotidstrang bemerkbar machen kann.

### Terminationssignal downstream von *cbzK*

Im downstream-Bereich von *cbzK* ist etwa 40 Basenpaare nach dem Stopcodon eine durch eine GC-reiche invertierte Sequenzwiederholung (18/22) bestehende Haarnadelstruktur er-

kennbar, der sich eine T-Box anschließt. Vermutlich handelt es sich dabei um ein Terminationsignal für die RNA-Polymerase.



**Abb. 3.4.8** Carboxyterminaler Bereich von *cbzK* mit abgeleiteter Translation und Stopcodon, nachfolgendem inverted repeat und sich direkt daran anschließender T/A-Spur. Das Stoppsignal (\*) von *cbzK* ist mit einer Welle unterstrichen, die zum IR gehörenden Nukleotide sind grau hinterlegt, revers komplementäre Nukleotide darin weiß gedruckt, die übrigen schwarz. Die T/A-Spur ist fett gedruckt.

### 3.4.1.2 Analyse codierender Bereiche

#### 3.4.1.2.1 Das Genprodukt ORF1

Der offene Leserahmen ORF1 ist auf dem 9632 bp großen Fragment nur partiell vorhanden und codiert 293 Aminosäuren. Das Genprodukt dieses bisher unvollständig vorhandenen offenen Leserahmens konnte aufgrund des Vergleichs der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Proteindatenbanken der Gruppe der Porine (zwischen 397 und 431 Aminosäuren) zugeordnet werden. Vertreter dieses Typs liegen in der äußeren Membran. Man vermutet, dass sie sich in die Membran einlagern und einen tunnelähnlichen Kanal bilden (OLIVERA et al., 1998). Aufgrund dessen wird ihnen eine Funktion beim Transport von unterschiedlich substituierten Benzoatderivaten zugeschrieben.

Innerhalb der Gruppe der Porine wies ORF1 mit seinen bisher bekannten 293 N-terminalen Aminosäuren die höchsten Übereinstimmungen mit Vertretern aus *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas aeruginosa* auf.

**Tab. 3.4.2** Vergleich von Porinen mit ORF1 auf Basis der bisher vorhandenen Aminosäuresequenz.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit ORF1 in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	ORF1	identische	homologe	
<i>Pseudomonas putida</i>	8 - 294	1 - 293	45	60	AF029714
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15 - 305	2 - 293	43	62	AE004510
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9 - 327	2 - 293	41	56	AE004467
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27 - 295	34 - 293	45	62	AE004830
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27 - 299	34 - 293	43	61	AE004728
<i>Pseudomonas putida</i>	1 - 292	1 - 290	41	59	AF218267

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

### 3.4.1.2.2 Das Genprodukt ORF2

Der offene Leserahmen ORF2 ist gegenüber ORF1 vollständig vorhanden und steht für 403 Aminosäuren. Dieses Genprodukt besitzt durch den Vergleich der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Proteinsequenz große Übereinstimmung mit Enzymen, die der sehr heterogenen Gruppe von Transporter-Proteinen angehören und in den Transport einer breiten Produktpalette wie 3-Hydroxyphenylpropionat, 4-Hydroxybenzoat, *cis,cis*-Muconsäure oder Vanillat involviert sind.

**Tab. 3.4.3** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von ORF2 mit denen von ähnlichen Transporterproteinen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit ORF2 in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	ORF2	identische	homologe	
<i>Escherichia coli</i>	20 - 407	2 - 393	60	75	AP002551
<i>Escherichia coli</i>	5 - 392	2 - 393	59	74	P77589
<i>Escherichia coli</i>	20 - 407	2 - 393	59	74	AE000142
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10 - 386	12 - 388	51	70	L49465
<i>Ralstonia solanacearum</i>	35 - 424	13 - 399	45	63	AL646085
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31 - 382	14 - 334	33	51	AE004461

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

### 3.4.1.2.3 Das Genprodukt CbzK

Der offene Leserahmen *cbzK* codiert 336 Aminosäuren. Seine Aminosäuresequenz stimmt bei einem Abgleich mit den Datenbanken mit denen von 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolasen aus Enterobacteriaceen aber auch zahlreichen Pseudomonaden zu etwa 70 bis 80% überein. Aldolasen dieses Typs spalten 4-Hydroxy-2-oxovalerat zu Pyruvat und Acetyl-CoA (SHINGLER et al., 1992). Interessanterweise bestehen auch Sequenzhomologien zu einer größeren Anzahl von Synthasen, welche eine Kondensationsreaktion in Gegenwart von Acetyl-CoA ausführen. So katalysiert beispielsweise die *leuA*-codierte *iso*-Propylmaleinsäure-Synthase von *Salmonella typhimurium* (FRIEDBERG et al., 1985) die Kondensation von Acetyl-CoA mit  $\alpha$ -Keto-*iso*-valerat als erstem Schritt in der Leucin-Biosynthese.

**Tab. 3.4.4** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von CbzK mit denen von ähnlichen 2-Oxovalerat-Aldolasen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit CbzK in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	CbzK	identische	homologe	
<i>Escherichia coli</i>	1 - 333	1 - 333	84	89	AE000142
<i>Escherichia coli</i>	1 - 333	1 - 333	84	89	AE005214
<i>Pseudomonas</i> sp.	1 - 335	1 - 335	79	88	D16407
<i>Comamonas testosteroni</i>	5 - 337	4 - 336	80	88	AB024335
<i>Pseudomonas putida</i>	1 - 336	1 - 336	79	87	AF180147
<i>Pseudomonas putida</i>	5 - 336	4 - 335	77	86	AF319593
<i>Pseudomonas</i> sp.	6 - 337	4 - 335	76	86	AB020521
<i>Pseudomonas putida</i>	1 - 336	1 - 336	78	86	Y18245
<i>Pseudomonas putida</i>	6 - 337	3 - 34	79	87	M94186

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

Desgleichen katalysiert die Homocitrat-Synthase, codiert durch *nifV* aus *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii* oder *Rhodobacter capsulatus* (MASEPOHL et al., 1993) die Kondensation von Acetyl-CoA mit 2-Oxoglutarat zu Homocitrat. Letztere Verbindung ist in die Biosynthese von Eisen-Molybdän-Cofaktoren zur Bildung von Molybdän-Nitrogenase-komplexen erforderlich (HOOVER et al., 1987). Durch Untersuchungen von POWLOWSKI & SHINGLER (1994) geht hervor, dass der Reaktionsmechanismus der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-

Aldolasen ähnlich zu dem der *nifV*-codierten Synthesen verläuft. Aus Sequenzvergleichen der Aminosäurereste wurden im aminoterminalen Bereich das Motiv D-V-T-L-R-D-G und zum carboxyterminalen Ende hin zwei alternierende Histidin- und Glycin-reiche Regionen identifiziert. Dieses sogenannte alternierende His/Gly-Motiv findet sich auch in Teilen der Sequenz von Phosphinomethyl-maleinsäure-Synthase wieder, welche in die Biosynthese von Phosphino-thricin-tripeptid durch *Streptomyces vitridochromogenes* involviert ist (ALJAH et al., 1992).

CbzK	1	----MNGKKLYIS	DVTLRDGMHAIRHQYSLDQVQAIARALDAAKVDSIEVAHGDGLQGSS	56
MhpE <sup>1</sup>	1	----MNGKKLYIS	DVTLRDGMHAIRHQYSLDQVQAIARALDAAKVDSIEVAHGDGLQGSS	56
BphF	1	----MTTKKIYIS	DVTLRDGSHAIRHQYSVEQVRTIAKELDEAKVDSIEVAHGSGLQGSS	56
MhpE <sup>2</sup>	1	---MTQTKKIYIS	DVTLRDGSHAIRHQYSVEQARQIAQALDEARVDSIEVAHGDGLQGSS	57
XylK	1	-MTFNP	GKKLYISDVTLRDGSHAIRHQYSIQNVQDIARALDKARVDSIEVTHGDGLQGSS	59
TodH	1	----MTQQKLYIS	DVTLRDGSHAIRHQYTVEQVKQIARALDDAKVDSIEVAHGDGLQGSS	56
CarE	1	MRLTMSN	KKLYISDVTLRDGSHAIRHQYSLDHVRKISKALDDARVDSIEVAHGDGLAGAS	60
DmpE	1	-MTFNP	SKKLYISDVTLRDGSHAIRHQYTLDDVRAIARALDKAKVDSIEVAHGDGLQGSS	59
NbzH	1	---MTADKKIYVS	DVTLRDGMHAIRHRYSLAQASQIAKALDDAGVDSIEVAHGDGLQGSS	57
			:*	
CbzK	177	IRARFRAVKAVLDPATH	TGIHAHHNLSLGVANSIVAVEQRCRIDVSLSGMGAGAGNAPL	236
MhpE <sup>1</sup>	177	IRDRFRALKAEKLPETQT	GMHAHHNLSLGVANSIAAVEEGCDRIDASLAGMGAGAGNAPL	236
BphF	177	VRMRFRAFKDVLPKPE	TETGIHAHHNLSLGVANSIVAIIEEGCDRVDASLAGMGAGAGNAPL	236
MhpE <sup>2</sup>	178	VRDRFRAFKDILKPE	TQTMHAHHNLSLGVANSIVAVEEGCDRVDASLAGMGAGAGNAPL	237
XylK	180	IRDRMRAFKAVLNPQT	QTMHAHHNLSLGVANSI IAVEEGCDRIDASLAGMGAGAGNAPL	239
TodH	177	VRDRFRAFKDVLPKPE	TQTMHAHHNLSLGVANSIVAVENGCDRVDASLAGMGAGAGNAPL	236
CarE	181	VRDRFRAFREVLKPE	TELGMHAHHNLSLGVANSIVAVEEGCDRIDASLAGMGAGAGNAPL	240
DmpE	180	IRDRMRAFKAVLKPE	TQVGMHAHHNLSLGVANSIVAVEEGCDRVDASLAGMGAGAGNAPL	239
NbzH	178	IAERFKAMKDVLPN	STQTMHAHHNLSLGVANSI VALEHGCDRIDASLTMGAGAGNAPL	237
			: *:**	
CbzK	297	VASARYGIKAVDII	VELGKRRMVGQEDMIVDVALDLLKR-----	336
MhpE <sup>1</sup>	297	TAAARYGLSAVDII	VELGKRRMVGQEDMIVDVALDLRNNK-----	337
BphF	297	AAQKYGLKTM	DIIIVELGRRRMVGQEDMIVDVALDLLKSLEHERIHAQPVSSEAG	352
MhpE <sup>2</sup>	298	AAAAYGLKAVDII	VELGKRRMVGQEDMIVDVALDLLRQREAAASL-----	342
XylK	300	VAAAYGLKTL	DIIIVELGRRRMVGQEDMIVDVALDLLAARKEQQA-----	344
TodH	297	MAASKYGLKTV	DIIIVELGRRRMVGQEDMIIDVALDLLKQEQEHERIRSEPVSREAN	352
CarE	301	AASAKYGIKT	VDIIVELGRRRMVGQEDMIVDVALDLANK-----	340
DmpE	300	IAAAKYNL	KTLDIIVELGHRRMVGQEDMIVDVALDLLAAHKENRA-----	345
NbzE	298	VAAKKYGLSA	FDIIVELGKRRMVGQEDMIVDVALDLIKSK-----	338
			*: *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:**	

**Abb. 3.4.9** Aminosäuresequenzvergleich von CbzK mit ähnlichen 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolasen. Die zu den Motiven gehörenden hochkonservierten Aminosäuren D-V-T-L-R-D-G im aminoterminalen Bereich und V-E-L-G-R-R-G-M-V-G-G-Q-E-D-M-I-E-D-A-A im carboxyterminalen Bereich sowie die alternierenden His/Gly-Anordnungen sind grau hinterlegt und weiß gedruckt. Identische Aminosäuren (\*), strukturell ähnliche (:) und strukturell bedingt ähnliche (.) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen stammen von MhpE<sup>1</sup> aus *E. coli* O157:7 (AE005214); BphF aus *Pseudomonas putida* KKS102 (D16407); MhpE<sup>2</sup> aus *Comamonas testosteroni* TA441 (AB024335); XylK aus *Pseudomonas putida* Plasmid pWW0 (M94186); TodH aus *Pseudomonas putida* DOT-T1 (Y18245); CarE aus *Pseudomonas* sp. CA10 (AB047548); DmpE aus *Pseudomonas putida* CF600 (X60835); NbzH aus *Pseudomonas putida* HS12/pNB1 (AF319593).

Interessanterweise wies im Zuge von Sequenzvergleichen mit den BLAST-Programmen (GISH & STATES, 1993) ein Teil einer 208 bp langen intergenischen Region von *bphC* (codiert

für eine 2,3-Dihydroxybiphenyl-Dioxygenase) und *bphD* (codiert für 2-Hydroxy-6-phenylhexa-2,4-dienoat-Hydrolase) aus *Pseudomonas putida* KF715 (HAYASE et al., 1990) eine Aminosäuresequenz auf (V-E-L-G-R-R-G-M-V-G-G-Q-E-D-M-I-E-D-A-A), welche 90% Identität mit dem carboxyterminalen Bereich von CbzK besitzt (Aminosäuren 311-330). Vermutlich handelt es sich bei dem intergenischen Fragment in Stamm KF715 um den Überrest eines Aldolase-Gens oder um eine Stelle, an der eine genetische Rekombination erfolgt ist. Das ist insofern bemerkenswert, da im verwandten Stamm KF707 das für die Aldolase codierende Gen dem der 2-Hydroxy-6-phenylhexa-2,4-dienoat-Hydrolase *bphD* vorausgeht, letzteres allerdings etwa 3,0 kbp downstream von *bphC* liegt (HAYASE et al., 1990).

#### 3.4.1.2.4 Das Genprodukt CbzQ

Das Genprodukt CbzQ wird durch 312 Aminosäuren gebildet und besitzt über seine ganze Länge mit über 80% identischen und teilweise mit über 90% homologen Aminosäuren sehr große Ähnlichkeiten zu Acetaldehyd-Dehydrogenasen aus Enterobacteriaceae und Pseudomonaden. Es wird dort ausschließlich integriert in *meta*-Operons vorgefunden.

**Tab. 3.4.5** Vergleich der Aminosäuresequenz von CbzQ mit denen von anderen Acetaldehyd-Dehydrogenasen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit CbzQ in [%]		Accession-Nummer
	Spezies	CbzQ	identische	homologe	
<i>Pseudomonas putida</i>	1 - 312	1 - 312	82	90	M94186
<i>Escherichia coli</i>	2 - 310	3 - 311	81	91	AE000142
<i>Pseudomonas putida</i>	1 - 312	1 - 312	83	90	X60835
<i>Escherichia coli</i>	2 - 310	3 - 311	81	91	AE005214
<i>Pseudomonas putida</i>	1 - 310	1 - 309	75	86	AF180147
<i>Pseudomonas putida</i>	1 - 301	1 - 309	74	85	U09250
<i>Comamonas testosteroni</i>	1 - 308	1 - 309	77	87	AB024335
<i>Pseudomonas</i> sp.	1 - 310	1 - 309	75	84	D16407
<i>Pseudomonas</i> sp.	2 - 308	2 - 308	71	86	AB047548

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

Durch Abgleich mit den Proteinmotivdatenbanken konnte ein Motiv (pfam02396) ausfindig gemacht werden, welches in Acetaldehyd-Dehydrogenasen beobachtet wird. Ihm kommt für die Bildung von Acetyl-CoA aus Acetaldehyd im 3-Hydroxyphenylpropionat-Abbau eine entscheidende Bedeutung zu. Das Motiv lautet G-x-G-(x)<sub>3-4</sub>-G.

CbzQ	239	PGYRLKQKVQFEVIPDTAPLNIP	GHGE	-FSGLKTSV	FIEVEGA	AHYLPAY	AGNLDIM	TSA	297
DmpF	239	PGYRLKQQVQFDVIPESAPLNIP	GLGR	-FSGLKTSV	FLEVEGA	AHYLPAY	AGNLDIM	TSA	297
XylQ	239	PGYRLKQKVQFDVIPESAPLHIP	GLGT	-FSGLKTSI	YLEVEGA	AHYLPAY	ASSLDIM	TSA	297
MhpE	238	PGYRLKQRVQFEVIPQDKPVNLP	GVGQ	-FSGLKTAV	WLEVEGA	AHYLPAY	AGNLDIM	TSS	296
MhpF	239	PGYRLKQQVQFDRI--DTPIRIP	GVGNALT	GLKTSIF	FLEVEGA	AHYLPAY	AGNLDIM	TSA	296
TodI	239	PGYRLKQRVQFDRIEADCP	PIRIP	GVCDRMN	GLKTSIF	FLEVEGA	AHYLPAY	AGNLDIM	TSA
BphG	239	PGYRLKQRVQFDRIEADRP	PIRIP	GVCDRLT	GLKTSV	FLEVEGA	AHYLPAY	AGNLDIM	TSA
CarF	239	PGYRLKQKVQFDIFDEKNALNLP	GLGR	-KAGLKTSV	FLEVEGA	AHYLPAY	AGNLDIM	TSA	297
		*****:***: :	.:.*	*	****:::*****	*****	*****:		

**Abb. 3.4.10** Aminosäuresequenzvergleich von CbzQ mit ähnlichen Acetaldehyd-Dehydrogenasen. Die zum Motiv gehörenden hochkonservierten Aminosäuren G-x-G-(x)<sub>2-3</sub>-G im carboxyterminalen sind grau hinterlegt und weiß gedruckt. Identische Aminosäuren (\*), strukturell ähnliche (:) und strukturell bedingt ähnliche (.) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen stammen von DmpF aus *Pseudomonas* sp. CF600 (X60835); XylQ aus *Pseudomonas putida* Plasmid pWW0 (M94186); MhpE aus *E. coli* K-12 W3110 (D86239); MhpF aus *Comamonas testosteroni* TA441 (AB024335); TodI aus *Pseudomonas putida* DOT-T1 (Y18245); BphG aus *Pseudomonas* sp. KKS102 (D16407); CarF aus *Pseudomonas* sp. CA10 (AB047548).

Zur Überprüfung der Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase wurde *cbzQ* (Primer *cbzQ*-XP-1/2), wie unter 2.10 beschrieben, in den Expressionsvektor pJOE2702 kloniert und das entstandene Plasmid pXPQ im Stamm *E. coli* XL1-Blue exprimiert. Enzymtests mit Rohextrakt aus einem Klon mit Plasmid pXPQ ergaben mit 345 Units/mg Protein eine starke Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase, während mit einer Negativ-Kontrolle (pJOE2702 ohne Insert) keine Aktivität gemessen werden konnte.

### 3.4.1.2.5 Das Genprodukt CbzJ(2)

Der offene Leserahmen *cbzJ(2)* codiert für 270 Aminosäuren und besitzt über die ganze Aminosäuresequenz eine Identität von 67% zur 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase (4-Oxalocrotonat-Hydratase) MhpD aus *Escherichia coli*, 59% zu MhpD aus *Comamonas testosteroni*, sowie 35% zu XylJ bzw. 30% Identität zur 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase XylI aus *Pseudomonas putida*.

Durch Abgleich der Proteinsequenz mit der Pfam-Datenbank konnte eine konservierte Domäne identifiziert werden (pfam01689), mit der das Genprodukt CbzJ(2) einer Familie zugeordnet werden kann, die sowohl 2-Keto-4-pentenoat-Hydratasen (4-Oxalocrotonat-Hydratasen) als auch 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen in sich vereint.

Ein typischer Vertreter einer 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase dieser Familie ist das Enzym MhpD aus *Escherichia coli*, welches in den Abbauweg von Phenylpropionsäure involviert ist und die Umwandlung von 2-Hydroxypentadienoat zum 4-Hydroxy-2-keto-pentenoat in Gegenwart des Cofaktors  $Mn^{2+}$  katalysiert.

**Tab. 3.4.6** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von CbzJ(2) mit denen von 4-Oxalocrotonat-Hydratase- bzw. 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit CbzJ(2) in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	CbzJ(2)	identische	homologe	
<i>Escherichia coli</i>	2 - 260	4 - 262	67	80	AP002551
<i>Escherichia coli</i>	1 - 262	1 - 262	66	79	AE000142
<i>Comamonas testosteroni</i>	10 - 261	8 - 261	59	74	AB024335
<i>Ralstonia solanacearum</i>	1 - 260	1 - 262	56	67	AL646081
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	1 - 264	1 - 264	54	69	AF079317
<i>Pseudomonas</i> sp.	7 - 258	10 - 262	54	69	AB020521
<i>Pseudomonas putida</i>	3 - 257	6 - 261	54	69	AF319593
<i>Pseudomonas putida</i>	4 - 266	1 - 262	52	67	AF180147
<i>Sphingomonas chungbukensis</i>	1 - 264	1 - 264	52	66	U97697
<i>Pseudomonas putida</i>	6 - 263	4 - 261	38	52	AJ344068

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

In den hochkonservierten Regionen konnten mehrere Motive ermittelt werden, die für 4-Oxalocrotonat-Hydratase charakteristisch sind (POLLARD & BUGG, 1998). Neben einem G-x-K-x-G-Motiv in Position 60-64 und einem P-D-x-G-Motiv in Position 79-82 sind auch zwei weitere Motive P-x<sub>2</sub>-E-x-E und D-T-x<sub>2</sub>-D-N-A in den Positionen 104-109 und 155-161 notwendig. Vermutlich fungieren die in den konservierten Regionen gehäuft vorkommenden Aminosäuren Aspartat (D) und Glutamat (E) als Liganden für den Co-Faktor  $Mn^{2+}$ .

Darüber hinaus können bei allen Sequenzen noch zwei hochkonservierte Aminosäurereste Tryptophan in den Positionen W-149 und W-212 identifiziert werden.



### 3.4.1.2.6 Das Genprodukt CbzF

Das Genprodukt CbzF umfasst 308 Aminosäuren und besitzt mit seiner Aminosäuresequenz eine Identität von 74% zur 2-Hydroxy-6-ketonona-2,4-dienoat-Hydrolase MhpC aus *E. coli* (PERNA et al., 2001) und 56% zu BphD aus *Pseudomonas* sp. (HOFER et al., 1994).

Hydrolasen gehören mit der EC-Klassifizierung von 3.1.1.3 zur Enzymklasse 3. Die durch diese Enzyme katalysierten hydrolytischen Reaktionen greifen u.a. Ester-, Glykosyl-, Peptid- und Säureanhydridbindungen an.

**Tab. 3.4.7** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von CbzF mit denen von ähnlichen 2-Hydroxy-6-ketonona-2,4-dienoat-Hydrolasen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit CbzF in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	CbzF	identische	homologe	
<i>Escherichia coli</i>	28 - 306	28 - 306	74	89	AE005214
<i>Pseudomonas</i> sp.	1 - 285	24 - 308	56	73	X66123
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	1 - 283	24 - 306	56	73	D85851
<i>Pseudomonas</i> sp.	1 - 281	24 - 306	56	76	D44550
<i>Comamonas testosteroni</i>	1 - 283	24 - 306	55	73	L34338
<i>Pseudomonas azelaica</i>	5 - 282	28 - 306	52	72	U73900
<i>Burkholderia</i> sp.	12 - 272	38 - 306	37	55	U78099
<i>Ralstonia</i> sp.	15 - 272	41 - 306	37	55	AJ006307
<i>Pseudomonas</i> sp.	18 - 269	48 - 305	35	55	AF285864
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	18 - 269	48 - 305	35	55	D83955

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

Als Reaktionsprodukte entstehen Fettsäuren, Diacylglyceride, Monoacylglyceride und Glycerin. Das katalytische Zentrum dieser Hydrolasen besteht aus einem nukleophilen Aminosäurerest (Ser oder Asp), einem Histidinrest und einer sauren Aminosäure (Asp oder Glu) und wird als "katalytische Triade" bezeichnet. Daneben gibt es eine hochkonservierte Sequenz, ein Pentapeptid (G-x-S-x-G), welches das Serin aus der Triade beherbergt. Bei diesem Pentapeptid handelt es sich um einen Teil des aktiven Zentrums, das in der gesamten Gruppe der Serin-Hydrolasen gefunden wird. Das Substrat wird im aktiven Zentrum durch die drei Ami-

nosäuren der zuvor erwähnten katalytischen Triade - in diesem Fall Serin (S-135), Aspartat (D-260) und Histidin (H-288) - katalytisch umgesetzt (BRADY et al., 1990).

Die Übertragung von Acylresten findet unter Bindung kovalenter Enzym-Acylrest-Intermediate in einem Zwei-Schritt-Mechanismus statt. Dabei wird zunächst der Acylrest an das Serin (S-135) des aktiven Zentrums gebunden und im zweiten Schritt auf ein Nukleophil übertragen. Wird der Acylrest auf Wasser übertragen, handelt es sich um eine Hydrolyse, bei einer Übertragung auf einen Alkohol um eine Umesterung.

Auffallend ist, dass der offene Leserahmen als einziger mit dem Startcodon GTG und daraus folgernd mit Valin beginnt und zusammen mit *mhpC* aus *Escherichia coli* einen um 23 Aminosäuren verlängerten aminoterminalen Bereich besitzt.

Nach Abgleich der Aminosäuresequenz mit der Pfam-Datenbank ergibt sich eine katalytische Domäne, die sich über fast 230 Aminosäuren erstreckt und die als  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungstyp (pfam00561) bezeichnet wird. Dieses Motiv findet sich in einer großen Anzahl von hydrolytischen Enzymen unterschiedlichstem phylogenetischen Ursprung. Das Enzym besteht aus einem  $\alpha/\beta$ -sheet (ähnlich einem Zylinder) und enthält acht durch Helices verbundene Stränge (OLLIS, 1992; MARTINEZ et al. 1992; DEREWENDA & DEREWENDA, 1991).

		↓		
CbzF	120	LVDKLDLDDKIHLGNSMGGHTAVAFSLTWPERVGLKLVLMGGGTGGVSPFVPMPSSEGIKLL	179	
MhpC	120	VVDQLDIAKIHLLGNSMGGHSSVAFTLKWPERVGLKLVLMGGGTGGMSLFTPMPTTEGIKRL	179	
PcbD	96	VMDKLGIKRAHMIGNSMGGATAMRMAVDYPEMVGKLVMMGGGSGVGGSTTTTPMPTTEGLKLL	155	
BphD <sup>1</sup>	97	LMDALGIDRAHLVGNMGGGATALNFAIEYPDRIGKLIILMGPGLGSPMFAPMPLEGIKLL	156	
BphD <sup>2</sup>	97	LMDALGIERAHLVGNMGGGATALNFAIEYPERLGKMILMGPGLGASHFAPMPMEGIKLL	156	
BphD <sup>3</sup>	97	MMDVLGIEKAHLVGNMGGGAGALNFALEYPERTGKLIILMGPGLGNSLFTAMPMEGIKLL	156	
HbpD	97	LMDGLSIEKAHLVGNMGGGATALNFALEFPDRLDRLVLMGPAGMGKSLQLQPNPQK-LRHM	156	
BphD <sup>4</sup>	97	MMDVLGIEKAHLVGNMGGGAGALNFALEYPERTGKLIILMGPGLGNSLFTAMPMEGIKLL	156	
		::* *.: : *::***** : : : : :* : . : : : :* . * * . * : : : :		
		↓		↓
CbzF	240	DFGHRLEGEINAETLVIWGRNDRFVPLDTGLRLVAGISNSQLHVFNKCQGHWAQWEHADTFN	299	
MhpC	240	DFGPRLAEIKAQTLIVWGRNDRFVPM DAGLRLLSGIAGSELHIFRDCGHWQWEHADAFN	299	
PcbD	235	NYAHLPTLTPTMI IWGRD DRFVPLDLGLRMLWGMPDAELHVF SKCGHWQWEHADKFN	294	
BphD <sup>1</sup>	237	DVTARLGEIKAKTFITWGRD DRFVPLDHGLKLLWNIDDARLHVFSKCGHWQWEHADEFN	296	
BphD <sup>2</sup>	237	DVSPRLGEIKAKTLVTWGRD DRFVPLDHGLKLVWIGIDARLHVFSQCGHWQWEKADEFN	296	
BphD <sup>3</sup>	237	DVSPRMGEIKAKTLVTWGRD DRFVPLDHGLKLVANMPDAQLHVFP RCGHWQWEHADAFN	296	
HbpD	237	DVVDQVHKIPNKT LVTWGRD DRFVPLDNGLKLI NFMPDAQLHVFSRCGHWQWEHADAFN	296	
BphD <sup>4</sup>	237	DVSARLGEIKAKTLVTWGRD DRFVPLDHGLKLI ANMQDAHVHVFP RCAHGRSGSTRTPST	296	
		: : : *::***:***** * *::: : . : : : * * * * . . . .		

**Abb. 3.4.12** Vergleich der Aminosäuresequenz von CbzF mit denen ausgewählter Vertreter von 2-Hydroxy-6-ketonon-2,4-dienon-Hydrolasen im Bereich der katalytischen Domänen. Neben dem G-x-S-x-G-Motiv ist auch die aus den Aminosäureresten S-135, D-260 und H-288 bestehende katalytische Triade grau hinterlegt und weiß gedruckt und zusätzlich durch Pfeile gekennzeichnet. Identische Aminosäuren (\*), strukturell ähnliche (:) und strukturell bedingt ähnliche (.) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen stammen von MhpC aus *E. coli* O157:H7 (AE005214); PcbD aus *Pseudomonas* sp. DJ-12 (D44550); BphD<sup>1</sup> aus *Pseudomonas putida* KF715 (M33813); BphD<sup>2</sup> aus *Comamonas testosteroni* B-356 (L34338); BphD<sup>3</sup> aus *Pseudomonas* sp. SY5 (AF190707); HbpD aus *Pseudomonas azelaica* HBP1 (U73900); BphD<sup>4</sup> aus *Pseudomonas* sp. KS102 (M26433). Man beachte, dass sowohl CbzF als auch MhpC aus *E. coli* einen um 23 Aminosäuren verlängerten aminoterminalen Bereich besitzen.

Zur Überprüfung der Aktivität der 2-Hydroxy-6-ketonona-2,4-dienoat-Hydrolase wurde *cbzF* (Primer *cbzF*-XP-1/2), wie unter 2.10 beschrieben, in den Expressionsvektor pJOE2702 kloniert und das entstandene Plasmid pXPF im Stamm *E. coli* XL1-Blue exprimiert. Enzymtests mit Rohextrakt aus einem Klon mit Plasmid pXPF ergaben mit 1110 Units/mg Protein eine starke Aktivität der 2-Hydroxy-6-ketonona-2,4-dienoat-Hydrolase, während mit einer Negativ-Kontrolle (pJOE2702 ohne Insert) keine Aktivität gemessen werden konnte.

### 3.4.1.2.7 Das Genprodukt CbzE(2)

Der offene Leserahmen *cbzE(2)* beinhaltet 315 Aminosäuren und zeigt durch Abgleich seiner Aminosäuresequenz mit Gendatenbanken große Ähnlichkeiten zur Gruppe der *meta*-Pyrocatechasen, welche eine extradiole Ringöffnung von Catechol und artverwandter Verbindungen katalysieren. Zu weiteren Mitgliedern dieser Familie zählen die 3,4-Dihydroxyphenylacetat-2,3-Dioxygenase aus *E. coli* (ROPER et al., 1990), die Catechol-2,3-Dioxygenase aus *Alcaligenes eutrophus* (KABISCH et al., 1990) und die 2,3-Dihydroxyphenylpropionat-1,2-Dioxygenase aus *E. coli* (BURLINGAME et al., 1983).

**Tab. 3.4.8** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von CbzE(2) mit denen von ähnlichen 2,3-Dioxygenasen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit CbzE(2) in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	CbzE(2)	identische	homologe	
<i>Pseudomonas putida</i>	1 – 314	1 - 314	95	98	AF176355
<i>Escherichia coli</i>	1 - 313	1 - 313	72	83	AE000142
<i>Rhodococcus</i> sp.	1 - 309	1 - 310	49	66	AF274045
<i>Rhodococcus globerulus</i>	1 - 309	1 - 310	45	63	U89712
<i>Rhodococcus</i> sp.	1 - 310	1 - 310	47	60	AJ006125
<i>Comamonas testosteroni</i>	16 - 320	8 - 311	42	59	AB024335
<i>Burkholderia</i> sp.	48 - 268	44 - 306	26	38	AF061751
<i>Arthrobacter keyseri</i>	195 - 351	43 - 190	34	49	AF331043
<i>Comamonas testosteroni</i>	49 - 198	43 - 180	36	47	AF305325

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.



tive Domäne besitzen, weisen Vertreter der zweiten Klasse jeweils eine Domäne im carboxy- und im aminoterminalen Bereich auf, von denen allerdings nur die Domäne im carboxyterminalen Bereich katalytisch aktiv ist (HAN et al., 1995). Enzyme der dritten Klasse weisen die gleiche Anordnung der Domänen auf, wie die Vertreter der zweiten Klasse, mit dem Unterschied, dass hier nur die Domäne im aminoterminalen Bereich katalytische Aktivität besitzt.

Aus dem Aminosäuresequenzvergleich von CbzE(2) mit anderen *meta*-Pyrocatechasen erkennt man im aminoterminalen Bereich mehrere hoch konservierte Bereiche, welche in ihrer Nachbarschaft die Aminosäure Histidin beherbergen (H-10, H-53, H-115, H-179) und die bei allen Vertretern dieser Familie zu beobachten sind.

Aus Röntgenstrukturuntersuchungen (HAN et al., 1995) geht hervor, dass H-10 als Fe<sup>2+</sup>-Ligand fungiert, während H-53 und H-115 in der direkten Umgebung des Eisen-(II)-Cofaktors angeordnet sind (SPENCE et al., 1996).

Zur Überprüfung der Aktivität der 2,3-Dioxygenase wurde *cbzE(2)* (Primer *cbzE(2)*-XP-1/2), wie unter 2.10 beschrieben, in den Expressionsvektor pJOE2702 kloniert und das entstandene Plasmid pXPE(2) im Stamm *E. coli* XL1-Blue exprimiert. Enzymtests mit Rohextrakt aus ei-

Substrat	CbzE	CbzE(2)
Catechol	+	+
3-Chlorcatechol	+	-
4-Chlorcatechol	+	+
3-Methylcatechol	+	+
4-Methylcatechol	+	+
4-Fluorcatechol	+	+
4-Ethylcatechol	(+)	+
4- <i>cyclo</i> -Hexylcatechol	+	(+)
3- <i>iso</i> -Propylcatechol	+	+
3-Methoxycatechol	+	+
3,4-Dichlorcatechol	-	-
3,5-Dichlorcatechol	(+)	-
3,6-Dichlorcatechol	+	-
4,5-Dichlorcatechol	(+)	-
3,5-Dimethylcatechol	(+)	(+)
3,6-Dimethylcatechol	+	(+)
3-Phenylcatechol	+	+
4-Phenylcatechol	-	-

**Tab. 3.4.9** Gegenüberstellung der Substratverwertungsmuster der 3-Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase CbzE und der neu identifizierten Catechol-2,3-Dioxygenase CbzE(2) aus dem neu identifizierten *meta*-Weg von GJ31. Die Umsetzung der Substrate erfolgte mit Rohextrakt des jeweiligen Expressionsstammes unter den in Kapitel 2 erläuterten Bedingungen. Erfolgte Umsetzung (+) und nicht erfolgte Umsetzung (-) sind gekennzeichnet. Die Umsetzungen für Substrate, für die entweder eine nur sehr geringe Aktivität vorhanden war oder die unmittelbar nach ihrer Zugabe zunächst messbar erfolgte und deren Umsatz allerdings sehr schnell wieder zum Erliegen kam, sind in Klammern gesetzt.

nem Klon mit Plasmid pXPE(2) ergaben mit 1830 Units/mg Protein eine starke Aktivität der 2,3-Dioxygenase, während mit einer Negativ-Kontrolle (pJOE2702 ohne Insert) keine Aktivität gemessen werden konnte.

Ein Vergleich der 3-Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase CbzE mit der neu identifizierten Catechol-2,3-Dioxygenase CbzE(2) aus dem *meta*-Weg von Stamm GJ31 ergab, dass weder auf Nukleotidbasis noch auf Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenzen eine Übereinstimmung vorhanden ist. Abgesehen von der relativ geringen Sequenz-Homologie dieser beiden 2,3-Dioxygenasen, zeigt das Substratverwertungsmuster keine besonderen Abweichungen. Ausnahmen bilden die in 3-Position chlorierten Catechole 3-Chlorcatechol und 3,6-Dichlorcatechol, die zu einer Inaktivierung des Enzyms CbzE(2) führen. Untersuchungen zeigen, dass nicht nur nach Zugabe von in 3-Position chlorierten Catecholen keine Umsetzung erfolgte, sondern dass auch nach sich daran anschließender Zugabe von Catechol das Enzym nicht mehr für eine erfolgreiche Umsetzung des Catechols zur Verfügung stand. Diese Beobachtung steht ganz im Gegensatz zu denen, die mit den alkylierten Catecholen 4-*cyclo*-Hexylcatechol, 3,5-Dimethylcatechol und 3,6-Dimethylcatechol gemacht wurden. Bei diesen scheint das Enzym nicht irreversibel geschädigt zu sein, da nach anschließender Zugabe von Catechol ein Abbau desselben beobachtet werden konnte.

#### 3.4.1.2.8 Das Genprodukt GntR

Genau 339 bp downstream von *cbzE*(2) befindet sich ein Leserahmen *gntR*, der als einziger auf dem sequenzierten Fragment gegenüber den anderen Leserahmen entgegengesetzt transkribiert wird. Er besitzt eine Größe von 666 Nukleotiden und die daraus abgeleitete 221 Aminosäuren lange Proteinsequenz ist aufgrund des Vergleichs leicht einer noch jungen Proteinfamilie zuzuordnen. Sie beinhaltet vorwiegend negative Transkriptionsregulatoren, die sogenannte *gntR*-Familie. Neben dem Repressor für das Gluconat-Operon, nach dem diese Familie benannt worden ist, zählen auch Repressoren für die Histidin-Nutzbarmachung (HutR) aus *Pseudomonas putida* bzw. *Klebsiella aerogenes* sowie ein Repressor für den Fettsäureabbau FadR aus *Escherichia coli* zu dieser Familie.

**Tab. 3.4.10** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von GntR mit denen von Regulatoren.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit GntR in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	GntR	identische	homologe	
<i>Rhodococcus</i> sp.	26 - 189	4 - 165	38	54	AF274045
<i>Mesorhizobium loti</i>	10 - 217	4 - 214	23	41	AP003010
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	17 - 144	18 - 147	29	48	AE007202
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	8 - 183	11 - 190	27	48	AE006739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22 - 235	10 - 221	22	41	AE004515
<i>Mesorhizobium loti</i>	21 - 202	9 - 192	25	44	AP003008
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	13 - 215	9 - 213	22	41	AL603643
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5 - 202	7 - 201	23	42	AE009326

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

Alle Proteine der *gntR*-Familie zeigen innerhalb eines sich über etwa 60-65 Aminosäuren erstreckenden aminoterminalen Bereiches Ähnlichkeit in ihrer Sequenz. Diese zum Teil hochkonservierte Region bildet ein HTH-Motiv, welches vergleichbar mit dem Cro-Protein des Bakteriophagen  $\lambda$  als bekanntestem Vertreter der mit DNA in Wechselwirkung tretenden Proteinen ist. Untersuchungen durch ANDERSON et al. (1981) und OHLENDORF et al. (1983) zeigten, dass dieses Motiv eine Bindung mit einer geeigneten Repressor-Bindungsstelle des Nukleotid-Stranges, dem Operator, bevorzugt in der Nähe Transkriptionsstartpunktes des Operons eingehen kann und somit die Transkription der darauffolgenden Nukleotidsequenz unterbindet.

		Helix-Turn-Helix		
GntR	31	VKEIGEETG <b>V</b> SRQPIM <b>TALN</b>	50	(221)
BphS	63	LET <b>LK</b> SSLG <b>V</b> SGSTL <b>REALT</b>	82	(243)
ORF0 <sup>1</sup>	56	IED <b>LK</b> SRYE <b>V</b> SGGT <b>VREALS</b>	75	(245)
ORF0 <sup>2</sup>	56	VED <b>LK</b> SRYE <b>V</b> SGGT <b>MREALS</b>	75	(245)
GntR	44	ENTIAAE <b>F</b> S <b>V</b> SRSP <b>VREALK</b>	63	(243)
Konsensus		E LKS <b>V</b> SG T <b>REAL</b>		

**Abb. 3.14** Vergleich der Aminosäuresequenzen des mutmaßlichen HTH-Motivs des Genproduktes GntR aus *Pseudomonas putida* GJ31 mit ausgewählten Sequenzen von HTH-Motiven aus Transkriptionsregulatoren der GntR-Familie. Hochkonservierte Aminosäuren sind fett gedruckt. Die Anzahl der Aminosäuren im jeweiligen Protein ist in Klammern angegeben. Die miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen stammen von BphS aus *Pseudomonas* sp. KKS102 (AB047328) und *Ralstonia eutropha* A5 Tn4371 (AJ012075); ORF0<sup>1</sup> aus *Pseudomonas* sp. B4 (AJ251217) und *Burkholderia* sp. LB400 (M86348) und *Comamonas testosteroni* TA441 (AB008787); ORF0<sup>2</sup> aus *Pseudomonas* sp. B4 (AJ251217) und *Burkholderia* sp. LB400 (M86348), identisch mit AphS aus *Comamonas testosteroni* TA441 (AB008787); GntR aus *Bacillus subtilis* BGSC 1A1 (AB005554).

### 3.4.1.2.9 Das Genprodukt ORF3

Dem offenen Leserahmen ORF3, der 305 Aminosäuren codiert, konnte aufgrund fehlender signifikanter Übereinstimmung zu anderen Proteinen keine Funktion zugewiesen werden.

Es lassen sich nur gewisse Ähnlichkeiten mit Proteinen aus *Pseudomonas aeruginosa* (NC\_002516, AE004945) mit einer Länge von 316 Aminosäuren und mit Proteinen aus *Ralstonia solanacearum* mit einer Länge von 297 (AL646067), 311 (AL646085) bzw. 319 (AL646077) Aminosäuren finden, bei denen es sich vermutlich um Signalproteine handelt.

Bei den anderen in Tabelle 3.4.11 aufgeführten Proteinen mit einer zu ORF3 korrespondierenden Identität und Länge handelt es sich um solche mit noch unbekannter Funktion. Vergleiche mit Proteindomänen bzw. Proteinmotivdatenbanken führten ebenfalls zu keiner eindeutigen Funktionszuordnung. Daher muss das Protein ORF3 als ein Mitglied einer noch unbekannteren Proteinfamilie eingestuft werden.

**Tab. 3.4.11** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von ORF3 mit denen von ähnlichen Proteinen korrespondierender Länge.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit ORF3 in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	ORF3	identische	homologe	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	118 - 313	115 - 304	35	50	AE004945
<i>Ralstonia solanacearum</i>	24 - 82	25 - 83	28	45	AL646067
<i>Ralstonia solanacearum</i>	26 - 309	26 - 303	24	41	AL646085
<i>Ralstonia solanacearum</i>	165 - 315	157 - 301	23	43	AL646077
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	173 - 329	149 - 303	35	53	AL603646
<i>Mesorhizobium loti</i>	125 - 316	115 - 302	25	43	AP003006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42 - 300	49 - 302	23	40	AE004675

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an.

### 3.4.1.2.10 Das Genprodukt ORF4

Der offene Leserahmen ORF4 codiert 179 Aminosäuren und besitzt eine geringe Ähnlichkeit zum Protein Mlr1279 aus dem Stickstoff-fixierenden Bakterium *Mesorhizobium loti* (AP002997), bei dem es sich laut KANEKO et al. (2000) vermutlich um einen Transkriptions-

regulator handelt. Mlr1279 weist mit 180 Aminosäuren eine fast identische Länge auf und besitzt im carboxyterminalen Bereich zu ORF4 33% identische und 55% homologe Aminosäuren.

Vergleiche mit Proteindomänen bzw. Proteinmotivdatenbanken ergeben, dass es sich bei dem Bereich zwischen den Aminosäuren 119 und 166 des Genproduktes ORF4 um ein charakteristisches Sequenzmotiv handelt. Diese Motiv wird als DSBH (double stranded  $\beta$ -helix domain) bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine doppelsträngige  $\beta$ -Helix-Domäne, die in die Bindung an Kohlenhydrate und in Protein-Protein-Wechselwirkung involviert ist. Die Möglichkeit der Protein-Protein-Wechselwirkung und die Tatsache, dass diese Domäne auch in positiven Regulatorgenen vertreten ist, legt die Vermutung nahe, dass es sich beim Genprodukt ORF4 um einen Induktor für die Transkription des *meta*-Clusters handeln könnte.

Die Proteindomäne DSBH findet sich auch in anderen Proteinen, die allerdings in ihrer Größe und in ihrer Funktion stark variieren. So wird sie nicht nur in zahlreichen positiven und negativen Regulatoren, sondern ebenfalls in einer Oxalat-Decarboxylase aus *Flammulina velutipes* (KESAWARI et al., 2000), in einem bifunktionellen Protein aus *Methanothermobacter thermotrophicus*, bestehend aus einer Biotin-Acetyl-CoA-Carboxylase-Ligase und einem Biotin-Operon-Repressor (SMITH et al., 1997), als auch in einem Protein aus *Arabidopsis thaliana* beobachtet, dass in die Reparatur von DNA-Schäden eingebunden ist (DANY et al., 2001).

ORF4	119	PTIDYGVVVKGPLILELDDGEVRELSSGD-VVVQQGNVHAWRNPGEPA	166
Mlr1279	123	PTEEAGYLA SGVFEIEIA-GVWHLGEGD-SFRFEGKPYRWRNPGTEPA	169
DSBH	17	DADEILYVLEGEAEVTVGDNERFLLEPGDSIYIPAGVPHRFRNLSDEPL	66
		: : : . * : : . * ** * : : ** . **	

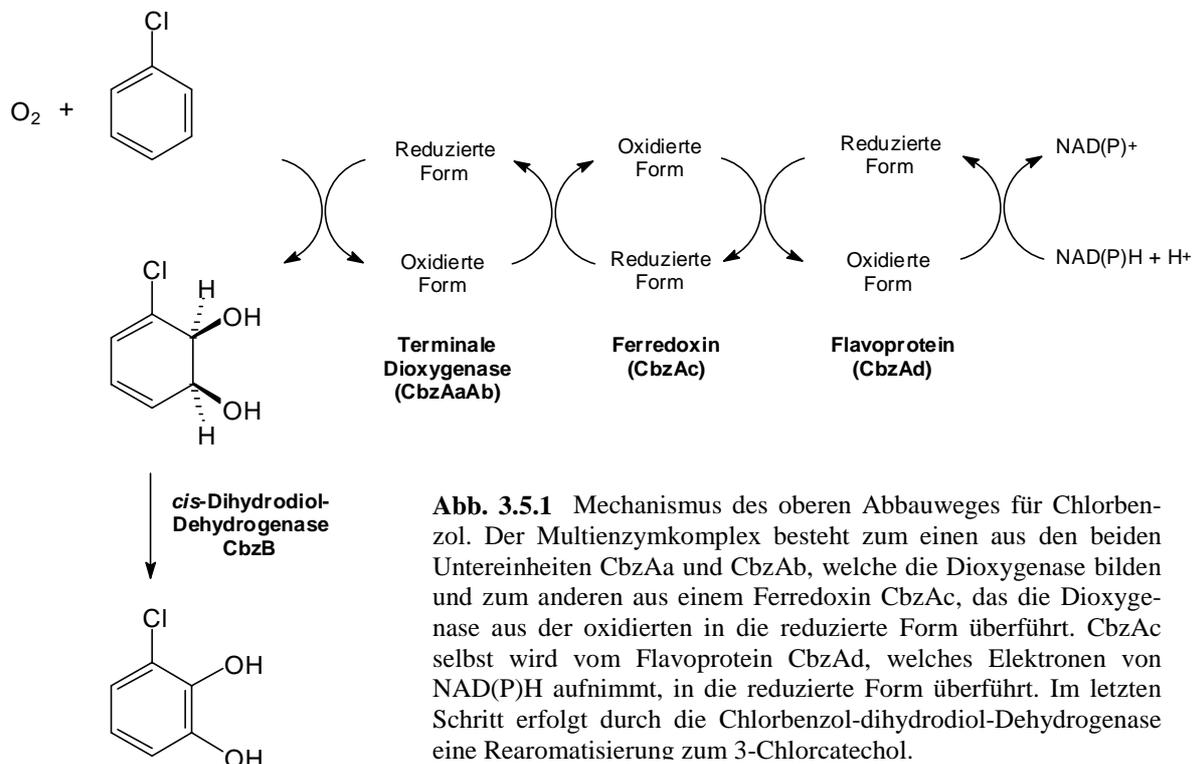
**Abb. 3.15** Aminosäuresequenzvergleich des C-terminalen Bereiches der vermuteten Protein-Domäne von ORF4 aus *Pseudomonas putida* GJ31 mit der aus dem Protein Mlr1279 aus *Mesorhizobium loti* (AP002997) und der Standard-DSBH-Domäne (Double stranded beta helix domain) aus der Pfam-Datenbank. Identische (\*) sowie homologe (:) Aminosäuren sind gekennzeichnet.

### 3.5 Identifizierung, Klonierung und Sequenzierung eines peripheren Abbauweges aus *Pseudomonas putida* GJ31

Ein peripherer oder oberer Abbauweg führt beispielsweise vom Biphenyl, Toluol oder Benzol bis zur Bildung des entsprechenden Catechols und geht ab dort mit der oxidativen Ringspaltung durch die Dioxygenase in den unteren Abbauweg über. Ein Bestandteil eines peripheren Abbauweges ist der Multienzymkomplex der Chlorbenzol-Dioxygenase, welcher sich aus der Dioxygenase selbst, einer Reduktase und einem Flavoprotein zusammensetzt. Dioxygenasen und Monooxygenasen oberer Abbauwege bestehen aus den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  und lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Größe dieser Untereinheiten in zwei Klassen einteilen.

Zur ersten Klasse gehören Oxygenasen mit zwei unterschiedlichen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , welche je nach Enzym in einer  $\alpha_2\beta_2$  oder einer  $\alpha_3\beta_3$ -Konformation vorliegen. Zu dieser Klasse werden Dioxygenasen für Toluol (SUBRAMANIAN et al., 1979), Naphthalin (ENSLEY & GIBSON, 1983), Biphenyl (ERICKSON & MONDELLO, 1992; HADDOCK & GIBSON, 1995), Benzol (ZAMANIAN & MASON, 1987) und Benzoat (YAMAGUCHI & FUJISAWA, 1982) gezählt.

Die zweite Klasse besteht aus terminalen Oxygenase-Komponenten, die aus identischen Untereinheiten ( $\alpha$ )<sub>n</sub> (mit n = 2, 3, 4) bestehen, wie sie in der Phthalat-4,5-Dioxygenase (BATIE et al., 1987), 4-Methoxybenzoat-Monooxygenase (BILL et al., 1981), 4-Chlorphenylacetat-3,4-



**Abb. 3.5.1** Mechanismus des oberen Abbauweges für Chlorbenzol. Der Multienzymkomplex besteht zum einen aus den beiden Untereinheiten CbzAa und CbzAb, welche die Dioxygenase bilden und zum anderen aus einem Ferredoxin CbzAc, das die Dioxygenase aus der oxidierten in die reduzierte Form überführt. CbzAc selbst wird vom Flavoprotein CbzAd, welches Elektronen von NAD(P)H aufnimmt, in die reduzierte Form überführt. Im letzten Schritt erfolgt durch die Chlorbenzol-dihydrodiol-Dehydrogenase eine Rearomatisierung zum 3-Chlorcatechol.

Dioxygenase (MARKUS et al., 1986) und in der 3-Chlorbenzoat-3,4-Dioxygenase (NAKATSU et al., 1995) anzutreffen sind. Der zweite Bestandteil des oberen Abbauweges wird durch die Chlorbenzol-dihydrodiol-Dehydrogenase gebildet, welche durch eine Rearomatisierung das entsprechende Catechol als Vorstufe für den sich anschließenden *meta*- bzw. den (modifizierten) *ortho*-Weg bildet.

### 3.5.1 PCR-Strategie

Mithilfe von PCR-Methoden konnten Gene für den oberen Abbauweg von Chloraromaten in *Pseudomonas putida* GJ31 gefunden werden. Die dazu verwendeten Bezugssequenzen stammten vorwiegend von Pseudomonaden. Mit den daraus abgeleiteten Primern Qno13 und Qno14 (Tab. 2.4) wurde ein etwa 2,8 kbp großes Fragment pQW04 amplifiziert, welches von beiden Seiten ansequenziert wurde (siehe Abb. 3.5.2 auf der nächsten Seite). Aus dieser Ansequenzierung gingen dann die Primer Qno09 und Qno10 (Tab. 2.4) hervor, deren Produkt das noch verbleibende etwa 1,52 kbp umfassende Fragment pQW04a lieferte. Die Sequenz zeigte, dass es sich um das erwartete Fragment handelte, welches einen Teil der  $\alpha$ -Untereinheit einer Chlorbenzol-1,2-Dioxygenase, die  $\beta$ -Untereinheit einer Chlorbenzol-1,2-Dioxygenase, ein Ferredoxin und einen Teil einer Chlorbenzol-Dioxygenase-NADH-Ferredoxin-Reduktase codiert.

Durch das Primerpaar Qno07/Qno08 (1,03 kbp; pQW06) konnte die noch unvollständige Sequenz für die  $\alpha$ -Untereinheit der Chlorbenzol-1,2-Dioxygenase und somit der Bereich upstream vom 2,8 kbp-Fragment pQW04 ergänzt werden.

Das Primerpaar Qno11/Qno12 (Tab. 2.4) lieferte ein etwa 1,3 kbp großes Fragment pQW07, welches nicht nur das Ende der schon ansequenzierten NADH-Ferredoxin-Reduktase sondern auch die vollständige Sequenz einer Chlorbenzol-dihydrodiol-Dehydrogenase enthielt.

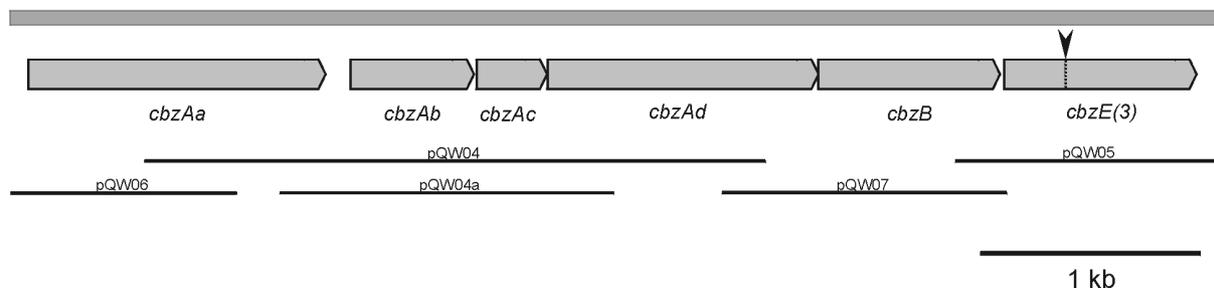
Durch die Primer Qno43/Qno44 konnte downstream von pQW07 das Fragment pQW05 amplifiziert werden. Die Nukleotidsequenz von pQW05 ähnelt sehr stark der von Catechol-2,3-Dioxygenasen.

Alle identifizierten offenen Leserahmen besitzen Sequenzhomologien von weit über 80% mit Genen anderer peripherer Abbauwege. Die identifizierten Gene für den oberen Abbauweg in Stamm GJ31 werden im weiteren Verlauf der Arbeit in Anlehnung an das im Trichlorbenzol (*tcb*) verwertenden Stamm *Pseudomonas* sp. P51 (VAN DER MEER, 1996) beschriebene Operon *tcbAaAbAcAdBC* analog abgekürzt (Tab. 3.5.1).

**Tab. 3.5.1** Gegenüberstellung und Nomenklatur der homologen Gene des Trichlorbenzolverwerters (*tcb*) aus *Pseudomonas* sp. P51 mit den in dieser Arbeit ermittelten offenen Leserahmen.

Funktion des Gens	P51	GJ31
$\alpha$ -Untereinheit der Chlorbenzol-Dioxygenase	<i>tcbAa</i>	<i>cbzAa</i>
$\beta$ -Untereinheit der Chlorbenzol-Dioxygenase	<i>tcbAb</i>	<i>cbzAb</i>
Ferredoxin	<i>tcbAc</i>	<i>cbzAc</i>
NADH-Reduktase	<i>tcbAd</i>	<i>cbzAd</i>
Chlorbenzol-dihydrodiol-Dehydrogenase	<i>tcbB</i>	<i>cbzB</i>
Catechol-2,3-Dioxygenase	<i>tcbC</i>	<i>cbzE(3)</i>

Die Anordnung der PCR-Fragmente für das Auffinden der Gene sowie die Klonierungs- bzw. Subklonierungsstrategie kann der nachstehenden Abbildung 3.5.2 entnommen werden.



**Abb. 3.5.2** Genanordnung und Klonierungsstrategie des chromosomal codierten oberen Abbauweges aus dieser Arbeit, bestehend aus der  $\alpha$ -Untereinheit der Chlorbenzol-Dioxygenase *cbzAa*, der  $\beta$ -Untereinheit der Chlorbenzol-Dioxygenase *cbzAb*, dem Ferredoxin *cbzAc*, der NADH-Reduktase *cbzAd*, der Chlorbenzol-dihydrodiol-Dehydrogenase *cbzB* und der vermutlich durch eine Rasterschubmutation inaktivierten 2,3-Dioxygenase *cbzE(3)*. Die Position der Basendeletion in Position 277 von *cbzE(3)* ist durch einen schwarzen senkrechten Pfeil gekennzeichnet. Die Darstellung ist maßstabsgetreu.

Aus Hybridisierungsexperimenten mit dem 1,52 kbp-Fragment (Primerpaar Qno09/Qno10, Tab. 2.4) ergab sich, dass dieses Operon auf dem Bakterienchromosom vorliegt und nicht plasmidisch codiert ist.

### 3.5.2 Analyse nichtcodierender Bereiche

Die Nukleotid- sowie die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen der identifizierten offenen Leserahmen sind im Anhang (8.3) dargestellt. Der durchschnittliche GC-Gehalt von 60,1% entspricht der für Pseudomonaden zu erwartenden Zusammensetzung der DNA.

Potentielle Ribosomenbindestellen in dem für *Pseudomonas putida* typischen Abstand zum Startcodon konnten für die Gene *cbzAa*, *cbzAb*, *cbzAc*, *cbzAd*, *cbzB* und *cbzE(3)* identifiziert werden (Tab. 3.5.2).

Da die Nukleotidsequenz des Bereiches upstream vom *cbzAaAbAcAdB*-Operon nicht vorliegt, konnten keine potentiellen Promotorregionen ermittelt werden.

**Tab. 3.5.2** Gegenüberstellung der postulierten Ribosomenbindestellen der offenen Leserahmen *cbzAa*, *cbzAb*, *cbzAc*, *cbzAd*, *cbzB* und *cbzE(3)*.

<i>Leserahmen</i>	Sequenz der Ribosomenbindestelle
<i>cbzAa</i>	ACTACCTTGAAA <b>AGTGAG</b> AAGACAATG
<i>cbzAb</i>	CATTTGAA <b>ATCTACAAGG</b> AACGACCATG
<i>cbzAc</i>	GTTTCTTCTTCT <b>AGGTG</b> ATGATGTCATG
<i>cbzAd</i>	ATCTCGACAACGG <b>GGAGT</b> TGAAGTGATG
<i>cbzB</i>	TCGTGCGAA <b>ATGAGGAG</b> ACCTAACGTG
<i>cbzE(3)</i>	TTCGGTTG <b>AGACAGGAG</b> AAGTGTCATG
16S-rRNA	3' - UCUU <b>UCCUCC</b> ACUA - 5'

Die Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz sind grau hinterlegt, weitere außerhalb der grau hinterlegten Konsensussequenz liegende und zur 16S rRNA komplementäre Basen sind fett gedruckt, das jeweilige Startcodon mit einer Welle unterstrichen.

### 3.5.3 Analyse codierender Bereiche

Die in Stamm GJ31 identifizierten und für den oberen Abbauweg codierenden Gene liegen in einem Cluster vor. Datenbankvergleiche ergaben, dass alle zum *cbzAaAbAcAdBE(3)*-Operon ähnlichen und teilweise identischen Gene und Genprodukte ausnahmslos in Form von Operons anzutreffen sind, die auch in ihrer Organisation und Orientierung übereinstimmen.

Aus diesem Grunde wurde die Gegenüberstellung der einzelnen Gene und Genprodukte mit ähnlichen Genen und Genprodukten nicht getrennt, sondern im jeweiligen Operon vorgenommen (Tab. 3.5.3). Ausnahme bildet hierbei die Catechol-2,3-Dioxygenase CbzE(3), die zum einen nicht mehr zum eigentlichen oberen Abbauweg gezählt werden kann und deren analoge Gene in den anderen miteinander verglichenen oberen Abbauwegen entweder nicht auftreten oder deren Sequenz nur partiell bzw. überhaupt nicht vorliegt. Für die vier Operons, bei denen auf die Dihydrodiol-Dehydrogenase eine Catechol-2,3-Dioxygenase mit bekannter Sequenz folgt, sind Werte für Identitäten und Homologien angegeben.

**Tab. 3.5.3** Zusammenstellung der Identitäten/Homologien in [%] auf Basis der vollständigen Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit identifizierten Leserahmen *cbzAa*, *cbzAb*, *cbzAc*, *cbzAd*, *cbzB* und *cbzE(3)* mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen aus Clustern oberer Abbauwege ausgewählter Stämme.

Spezies	identische / homologe Aminosäuren in [%]						Accessionsnummer
	CbzAa	CbzAb	CbzAc	CbzAd	CbzB	CbzE(3)	
<i>Pseudomonas putida</i>	99 / 100	100 / 100	100 / 100	99 / 99	99 / 99	95/95	J04996
<i>Pseudomonas putida</i>	91 / 97	90 / 94	94 / 97	83 / 90	- / - <sup>a)</sup>	- / - <sup>b)</sup>	AF148496
<i>Ralstonia</i> sp.	92 / 95	93 / 96	88 / 95	89 / 93	95 / 97	- / - <sup>b)</sup>	AJ006307
<i>Pseudomonas</i> sp.	88 / 94	90 / 93	88 / 94	83 / 89	89 / 94	- / - <sup>b)</sup>	U15298
<i>Pseudomonas putida</i>	91 / 91	100 / 100	100 / 100	96 / 96	99 / 99	- / - <sup>b)</sup>	M17904
<i>Burkholderia</i> sp.	87 / 93	89 / 92	89 / 94	83 / 89	87 / 92	- / - <sup>b)</sup>	U78099
<i>Rhodococcus</i> sp.	78 / 88	79 / 87	67 / 80	58 / 71	49 / 65	66/76	D32142
<i>Comamonas testosteroni</i>	65 / 79	60 / 76	55 / 75	- / - <sup>b)</sup>	- / - <sup>b)</sup>	- / - <sup>b)</sup>	U47637
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	64 / 78	62 / 78	56 / 73	52 / 68	61 / 76	52/67	M83673
<i>Pseudomonas</i> sp.	64 / 78	61 / 78	56 / 73	52 / 67	61 / 75	51/65	AY027651

-/- bedeutet: Vergleich nicht möglich, da <sup>a)</sup> Gen vermutlich durch Transpositionseignis unterbrochen <sup>b)</sup> Gen bisher nicht oder nur partiell sequenziert

### 3.5.3.1 Die Genprodukte CbzAa und CbzAb

Die in dieser Arbeit beschriebene Chlorbenzol-Dioxygenase aus GJ31 ist aufgrund der unterschiedlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zur ersten Klasse der Benzol-Dioxygenasen zu zählen.

Vertreter dieser Klasse liegen je nach Enzym in einer  $\alpha_2\beta_2$  oder einer  $\alpha_3\beta_3$ - Konformation vor. Zu dieser Klasse zählen auch Dioxygenasen für Toluol, Naphthalin, Biphenyl, Benzol und Benzoat. Das Genprodukt CbzAa besteht aus 450 Aminosäuren und besitzt sehr hohe Ähnlichkeit mit  $\alpha$ -Untereinheiten anderer Chlorbenzol-Dioxygenasen. Auffällig ist dabei die über 99%ige Übereinstimmung (449 von 450 Aminosäuren) mit der  $\alpha$ -Untereinheit TodC1 aus *Pseudomonas putida* F1 (ZYLSTRA & GIBSON, 1989).

Die  $\alpha$ -Untereinheit der terminalen Dioxygenase besitzt in ihrem Reaktionszentrum ein Eisen-Schwefel-Cluster des Typs [2Fe-2S] (Rieske-Typ), welcher durch jeweils zwei Cystein- und Hystidin-Reste der  $\alpha$ -Untereinheit koordiniert wird (GURBIEL et al., 1989; ZYLSTRA & GIBSON, 1991). Desweiteren benötigt die  $\alpha$ -Untereinheit der terminale Dioxygenasen noch



*putida* F1 (ZYLSTRA & GIBSON, 1989) und mit dem Protein 2 aus *Pseudomonas putida* (IRIE et al., 1987).

Für die  $\beta$ -Untereinheit liegen keine Konsensussequenzen bzw. Motive vor. Nach HARAYAMA et al. (1986) spielt diese kleinere Untereinheit vermutlich eine wichtige Rolle in der Bestimmung der Substratspezifität.

### 3.5.3.2 Die Genprodukte CbzAc und CbzAd

Das Genprodukt CbzAc wird durch 107 Aminosäuren gebildet und ist aufgrund von Aminosäuresequenzvergleichen mit den Ferredoxinen TodC3 aus *Pseudomonas putida* F1 (ZYLSTRA & GIBSON, 1989) und Protein 3 aus *Pseudomonas putida* (IRIE et al., 1987) identisch.

Die Aufgabe des Ferredoxins besteht in der Reduktion der durch die Gene *cbzAa* und *cbzAb* codierten Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  der terminalen Dioxygenase.

Ein entscheidendes Struktur-Element ist hier, wie auch in den  $\alpha$ -Untereinheiten der terminalen Dioxygenasen, ein Eisen-Schwefel-Cluster des Typs [2Fe-2S] (Rieske-Typ) im Reaktionszentrum. Somit finden sich auch hier die hochkonservierten Cystein- und Hystidin-Reste im Motiv C-x-H-x<sub>16-17</sub>-C-x<sub>2</sub>-H, welche den Rieske-[2Fe-2S]-Cluster koordinieren (GURBIEL et al., 1989; ZYLSTRA & GIBSON, 1991).

In Abb. 3.5.4 ist die aus *cbzAc* abgeleitete Aminosäuresequenz mit denen von ähnlichen  $\alpha$ -Untereinheiten im Bereich der katalytischen Domänen gegenübergestellt.

CbzAc	31	NVDGEFFAVQDTCTHGDWALSDG-YLDGDIVECTLEHFGKFCVRTGKVKALPACKPIKVFP	89
TodB	31	NVDGEFFAVQDTCTHGDWALSDG-YLDGDIVECTLEHFGKFCVRTGKVKALPACKPIKVFP	89
BedB	31	NVDGEFFAVQDTCTHGDWALSDG-YLDGDVVECTLEHFGKFCVRTGKVKALPACKPIKVFP	89
McbAc	31	NVDGEFFAVQDTCTHGNWALSDG-YLDGDVVECTLEHFGKFCVRTGKVKALPACKPVKVFP	89
TecA3	31	NVDGEFFAVQDTCTHGNWALSDG-YLDGGVVECTLEHFGKFCVRTGKVKALPACKPIKVFP	89
Protein 3	15	NVDGEFFAVQDTCTHGDWALSDG-YLDGDIVECTLEHFGKFCVRTGKVKALPACKPIKVFP	73
IrbA3	31	NVGGEFFATQDTCTSEADWALSDG-YLEDDVVECTLEHWAKFCVRTGKAKALPACLPLRTFV	89
BphA3	31	NVGGEFFATQDTCTSEADWALSEG-YLEDDVVECTLEHWAKFCVRTGKAKALPACVPLRTFV	89
IpbAc	31	NVDGDLFATQDHCHEGDWLSSEGGYLDGDVVECSLEHMGKFCVRTGKIKAAPCDPLKIFP	90
		** . * : : * * . * * * : * : * : * : * * * : . . : * * : * * . * * * * * * * * * * * * * * : :	

**Abb. 3.5.4** Vergleich der Aminosäuresequenz von CbzAc im Bereich der katalytischen Domänen mit sequenz-ähnlichen Ferredoxinen. Die hochkonservierten Aminosäuren der katalytischen Domänen C-x-H und C-x<sub>2</sub>-H im Motiv C-x-H-x<sub>16-17</sub>-C-x<sub>2</sub>-H sind grau hinterlegt und weiß gedruckt. Identische Aminosäuren (\*), strukturell ähnliche (:), und strukturell bedingt ähnliche (.) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen stammen von TodB aus *Pseudomonas putida* DOT-T1 (Y18245); BedB aus *Pseudomonas putida* ML2 auf Tn5542 (AF148496); McbAc aus *Ralstonia* sp. JS705 (AJ006307); TecA3 aus *Burkholderia* sp. PS12 (U78099); Protein 3 aus *Pseudomonas putida* (M17904); IrbA3 aus *Rhodococcus erythropolis* BD2 (U24277); BphA3 aus *Rhodococcus* sp. RHA1 (D32142); IpbAc aus *Pseudomonas putida* RE204 (AF006691).



oberen Abbauweges. Datenbankvergleiche mit der aus *cbzB* abgeleiteten Aminosäuresequenz ergaben Homologien von über 99% mit Dihydrodiol-Dehydrogenasen TodD aus Stamm F1 (ZYLSTRA & GIBSON, 1989) und Protein 5 (IRIE et al., 1987) aus *Pseudomonas putida*.

Bei dem Hauptteil der Enzyme dieser sehr großen Familie der Short-chain Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) handelt es sich um Dimere und Tetramere. Das charakteristische Sequenzmotiv für Alkohol-Dehydrogenasen lautet [LIVSPADNK]- $x_{12}$ -Y-[PSTAGNCV]-[STAGNQCIVM]-[STAGC]-K-{PC}-[SAGFYR]-[LIVMSTAGD]- $x_2$ -[LIVMFYW]- $x_3$ -[LIVMFYWGAPTHQ]-[GSACQRHM] (BLOMQVIST et al., 1993; PERSSON et al., 1991). Untersuchungen mit chemisch modifizierten bzw. ortsspezifisch modifizierten Derivaten bestätigten die röntgenspektroskopischen Befunde, dass in allem bisher bekannten Proteinen dieser Familie sowohl die Aminosäure Tyrosin in Position Y-155 als auch der drei Aminosäuren weiter downstream folgende Lysinrest K-159 streng konserviert sind und Bestandteile des katalytischen Zentrums sind (JORNVALL et al., 1992). Für die Bindung des Co-Faktors NAD(H) bzw. NADP(H) ist ein im aminoterminalen Teil des Enzyms liegendes Motiv mit der Konsensus-Sequenz G- $x_3$ -G-x-G verantwortlich (SCRUTTON et al., 1990).

In Abb. 3.5.6 ist die aus *cbzB* abgeleitete Aminosäuresequenz mit denen von ähnlichen Benzol-dihydrodiol-Dehydrogenase im Bereich der katalytischen Domänen gegenübergestellt.

CbzB	1	VRLEGEVALVTGGGACLGRAIVDRYVAEGARVAVLDKSAAGLEALRKLHGDAIVGVEGDV	60
TodD	1	MRLEGEVALVTGGGACLGRAIVDRYVAEGARVAVLDKSAAGLEALRKLHGDAIVGVEGDV	60
TcbB	1	MKLKGEVALVTGGGACLGRAIVDRYVAEGARVAVLDKSAAGLEELRKRHRGDVAVVGIEGDV	60
BpdD	1	MRLKDEVVLTGGCAGLGRAIVDRFVCEGARVAVLDRSVAGLEELRAAHGDVAVVAVEGDV	60
BphB <sup>1</sup>	1	MQLNNEVALVTGGGSCLGRAIVDRFVAEGARVAVLDKSAARLQELQAAHGAKVLGIEGDV	60
BphB <sup>2</sup>	1	MKLTGEVALITGGASCLGRALVDRFVAEGARVAVLDKSAERLRELEVAHGGNAVGVGDV	60
BphB <sup>3</sup>	1	MKLTGEVVLITGGASCLGRALVDRFVAERAKVAVLDKSAERLAQLETDHGDNVLTGVTGDV	60
		::* .**.*:*** :*****:***:* * *****:* . * :. ** :.: ***	
↓ ↓			
CbzB	121	LAAKAALPALYQSKGSAIFTLSNAGFYPPGGGGVLYTAGKHAVIGLILKQLAHEWGPRIRVN	180
TodD	121	LAAKAALPALYQSKGSAIFTVSNAGFYPPGGGGVLYTAGKHAVIGLILKQLAHEWGPRIRVN	180
TcbB	121	LAAKAALPALYKSKGSAIFTVSNAGFYPPGGGGVLYTAGKHAVIGLVKQLAHEWGPRIRVN	180
BpdD	121	LGVKAALGALYASRGSVIFTVSNAGFYPPAGGGALYTGAKHAIVGMVKQLAYELGPHIRVN	180
BphB <sup>1</sup>	121	LAVKACLPALVQSRGSVVFTISNAGFYPPNGGGPLYTGAKHAVVGMVRELAYELAPHVRVN	180
BphB <sup>2</sup>	121	HAVKACLPALVSSRGSVVFTISNAGFYPPNGGGPLYTATKHAVVGLVVRQMAFELAPHVRVN	180
BphB <sup>3</sup>	121	HAVKACLPALVASRGNVIFTISNAGFYPPNGGGPLYTAAKHAVVGLVRELAFAFELAPYVRVN	180
		. . ** . * ** * : * . : ** : ***** ** * ** . *** : * : : : : * . * : ***	

**Abb. 3.5.6** Vergleich der Aminosäuresequenz von CbzB im Bereich der katalytischen Domänen mit sequenz-ähnlichen Dihydrodiol-Dehydrogenasen. Im N-terminalen Bereich liegt das für die Bindung des Co-Faktors NAD(H) bzw. NADP(H) verantwortliche Motiv mit der Konsensus-Sequenz G- $x_3$ -G-x-G, dessen dazugehörigen Aminosäuren grau hinterlegt und weiß gedruckt sind. Die hochkonservierten Aminosäuren der katalytischen Domäne Y-155 und dem drei Aminosäuren weiter downstream folgenden Lysinrest K-159 sind zusätzlich durch einen Pfeil gekennzeichnet. Identische Aminosäuren (\*), strukturell ähnliche (:), und strukturell bedingt ähnliche (.) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen stammen von TodD aus *Pseudomonas putida* F1 (J04996); TcbB aus *Pseudomonas* sp. P51 (U15298); BpdD aus *Rhodococcus* sp. M5 (U27591); BphB<sup>1</sup> aus *Pseudomonas* sp. KKS102 (D17319); BphB<sup>2</sup> aus *Comamonas testosteroni* B-356 (U57451); BphB<sup>3</sup> aus *Pseudomonas putida* OU83 (Y07655).

### 3.5.3.4 Das Genprodukt CbzE(3)

Downstream von *cbzB* schließt sich ein offener Leserahmen an, der nach 93 Aminosäuren abrupt abbricht. Die Aminosäuresequenzen vor und nach dem Stop-Codon besitzen Übereinstimmung von über 80% mit Catechol-2,3-Dioxygenasen. Vergleiche der Nukleotidsequenz mit Datenbanken ergaben, dass der Leserahmen vermutlich durch eine Punktmutation in Position 277 die Base Guanin verloren hat, so dass es zu einem Versatz im Leseraster und daraus resultierend zu einem vorzeitigen Stop-Codon kommt. Von den ursprünglich 876 Nukleotiden sind nur noch 875 vorhanden. Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleiche mit einem Leserahmen, der diese zusätzliche Base enthält, führen zu hohen Sequenzhomologien mit Catechol-2,3-Dioxygenasen.

**Tab. 3.5.4** Vergleich der Aminosäuresequenzdaten von CbzE(3) mit denen von ähnlichen Catechol-2,3-Dioxygenasen.

Spezies	Aminosäuresequenzbereich		Aminosäuren mit CbzE(3) in [%]		Accession- Nummer
	Spezies	CbzE(3)	identische	homologe	
<i>Pseudomonas putida</i> TodE	1 - 291	1 - 291	99	99	J04996
<i>Pseudomonas putida</i> TobE	1 - 291	1 - 291	99	99	AF180147
<i>Burkholderia</i> sp. TecE*	1 - 291	1 - 291	82	90	AF073900
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1 - 289	1 - 289	69	80	U24277
<i>Rhodococcus</i> sp.	1 - 289	1 - 289	68	79	D32142
<i>Rhodococcus globerulus</i>	1 - 286	1 - 286	64	76	X75633
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	1 - 286	1 - 286	54	69	M83673
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 - 286	1 - 286	54	69	D83056
<i>Pseudomonas</i> sp.	1 - 286	1 - 286	54	69	X66122

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren im angegebenen Aminosäuresequenzbereich an. Zum Sequenzvergleich wurde die abgeänderte Sequenz mit dem zusätzlich eingefügten Nukleotid Guanin in Position 277 verwendet.

\* Bei TecE handelt es sich um ein Konstrukt, bei dem die inaktive Catechol-2,3-Dioxygenase iTecE durch Einfügen von jeweils einem Nukleotid in den Positionen 143 und 484 zu einem aktiven Enzym umgewandelt worden ist (BEIL et al., 1998).

So besitzt *cbzE(3)* mit dieser Basenänderung sowohl auf Nukleotidebene als auch auf Basis der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen eine Sequenzhomologie von jeweils 99% zu

den Genen der 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase *tobE* aus *Pseudomonas putida* PB4071 (LI & TAN, 1999) und der 3-Methylcatechol-2,3-Dioxygenase *todE* aus *Pseudomonas putida* F1 (ZYLSTRA & GIBSON, 1989).

Interessanterweise findet sich in *Burkholderia* sp. PS12 (BEIL et al., 1998) eine inaktive Catechol-2,3-Dioxygenase iTecE, die 82% identische Aminosäuren zu CbzE(3) besitzt. Nach BEIL et al. (1998) ist die Inaktivität von iTecE zum einen auf eine Basendeletion (Nukleotid-Position 320) zurückzuführen, die zu einer Rasterschubmutation führt. Zum anderen besitzt iTecE, vermutlich durch Basenaustausche (Positionen 143 und 484), in seinem Leseraster zwei Stop-Codons, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription führen.

Die aus der Nukleotid-Sequenz *cbzE(3)<sub>inakt.</sub>* und der abgeänderten Sequenz von *cbzE(3)<sub>akt.</sub>* abgeleitete Aminosäuresequenzen für CbzE(3)<sub>inakt.</sub> und CbzE(3)<sub>akt.</sub> sind in Abb. 3.5.7 dargestellt.

```

atgagcattcaaagattgggctacctcggcttcgaagtcgcagatgtgcggtcatggcgtaccctcgccactacc
M S I Q R L G Y L G F E V A D V R S W R T L A T T
aggctggggatgatggaagcctcagccagcgagacggaggcgacgtttcgaatcgactcacgtgcctggcgactg
R L G M M E A S A S E T E A T F R I D S R A W R L
tcggtcagcagaggccccgcagacgactacctgtttgccggtttcgaggtggatagtgaaacaggggctacaggag
S V S R G P A D D Y L F A G F E V D S E Q G L Q E
gtcaaggaaagcctgcaggccccacggcgttaccgtcaaggtcgaaggagggagctgattgccaaacgcggtgtg
V K E S L Q A H G V T V K V E G G E L I A K R G V
V K E S L Q A H G V T V K V E G G ↑S * ← CbzE(3)inakt.
cttgggttgatttcatgcaccgatccgttcggcaatcgcgtcgagatctactacgggtgccaccgaactgttcgag
L G L I S C T D P F G N R V E I Y Y G A T E L F E
cgaccattcgcttcgcccaccgggtgtttctggatttcaaactggagaccagggcttaggtcactatgtgttgagc
R P F A S P T G V S G F Q T G D Q G L G H Y V L S
gtcgcagatgtggacgcagcgcctcctataccaaggcattgggctttcagcttgccgatgtcatcgactgg
V A D V D A A L A F Y T K A L G F Q L A D V I D W
accattggtgacgggttatccgtgaccctctacttctgtactgcaatggccgtcaccactccttccccttggc
T I G D G L S V T L Y F L Y C N G R H H S F P F A
aagttgccgggatcgaagcggctccatcacttcatgctgcaagctaagggatggatgacgtgggcctggcatac
K L P G S K R L H H F M L Q A N G M D D V G L A Y
gacaaatttgatgcggagcgtgcggtcgttatgtcacttggtcgacacgaacgaccacatgatttcgttctac
D K F D A E R A V V M S L G R H T N D H M I S F Y
gggtgccacgccctcgggcttcgcggtcgagtacggctggggcgcacgtgaggtgacccgccactgggtcggtggg
G A T P S G F A V E Y G W G A R E V T R H W S V V
cgctacgaccgtatcagcatctggggacacaagttccaggcgcccgcctga
R Y D R I S I W G H K F Q A P A *
```

**Abb. 3.5.7** Translation der Nukleotidsequenz von *cbzE(3)* mit und ohne Zufügen der vermutlich durch Deletion verlorenen Base Guanin in Position 277. Die Transkription der gefundenen Nukleotidsequenz (ohne g in Position 277) führt unmittelbar zu einem Abbruch der Transkription durch das in Position 280 beginnende Stop-Codon tga (\*) und damit zum inaktiven CbzE(3)<sub>inakt.</sub>. Die zugefügte Base g ist grau hinterlegt, weiß gedruckt und durch einen senkrechten Pfeil markiert.

Während mit dem Hinzufügen der Base Guanin in Position 277 der über 876 Basen verfügende Leserahmen  $cbzE(3)_{\text{akt}}$  richtig transkribiert würde, endet der Leserahmen  $cbzE(3)_{\text{inakt}}$  in Position 280, unmittelbar 3 Basen nach der vermuteten Basendeletion, durch das Stop-Codon tga.

Aus Sequenzvergleichen und röntgenspektroskopischen Untersuchungen ergibt sich für das katalytische Zentrum das folgende, aus vier konservierten Aminosäuren bestehende, Sequenzmotiv [GNTIV]-x-H-x<sub>5,7</sub>-[LIVMF]-Y-x<sub>2</sub>-[DENTA]-P-x-[GP]-x<sub>2,3</sub>-E, wobei der Glutamatrest (E) in die Bindung des Eisen involviert ist (HARAYAMA & REKIK, 1989; ASTURIAS et al., 1994; HAN et al., 1995).

In Abb. 3.5.8 ist die aus  $cbzE(3)$  abgeleitete Aminosäuresequenz mit denen von ähnlichen Catechol-2,3-Dioxygenasen im Bereich der katalytischen Domänen gegenübergestellt.

CbzE (3)	211	FMLQANGMDDVGLAYDKFDAERAVVMSLGRHTNDHMISFYGATPSGFAVEYGGWAGAREVTR	270
TecE	211	FMLQTNMDDVGLAYDRFDAERAIVMTLGRHTNDHMVSFYGATPSGFAVEYGGWAGAREMPP	270
TodE <sup>1</sup>	210	FMLQANGMDDVGLAYDKFDAERAVVMSLGRHTNDHMISFYGATPSGFAVEYGGWAGAREVTR	270
TodE <sup>2</sup>	211	FMLQANGMDDVGLAYDKFDAERAVVMSLGRHTNDHMISFYGATPSGFAVEYGGWAGAREVTR	270
BphC <sup>1</sup>	211	FMLETKHMDDVGLAYDKFDADGTVVMTLGRHTNDHMVSFYGATPSGFAVEYGGWAGARQVEP	270
BpdE	211	LMIETTNLDDVGLAYDRVEDDAVILTLGRHTNDHMVSFYGATPSGFAVEFGWGSRVVEP	270
BphC <sup>2</sup>	211	FMLEVASLDDVGFADRVADGLITSTLGRHTNDHMVSFYASTPSGVEVEYGWSARTVDR	270
		:*:. . :****:*:*: : : :*****:***.:***. **:*.:* :	

**Abb. 3.5.8** Vergleich der Aminosäuresequenz von CbzE(3) im Bereich der katalytischen Domänen mit sequenz-ähnlichen Catechol-2,3-Dioxygenasen. Die zu dem Sequenzmotiv [GNTIV]-x-H-x<sub>5,7</sub>-[LIVMF]-Y-x<sub>2</sub>-[DENTA]-P-x-[GP]-x<sub>2,3</sub>-E gehörenden Aminosäuren sind grau hinterlegt und weiß gedruckt. Identische Aminosäuren (\*), strukturell ähnliche (:) und strukturell bedingt ähnliche (.) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Der Glutamatrest (E) ist in die Bindung des Eisen involviert. Die miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen stammen von TecE aus *Burkholderia* sp. PS12 (AF073900); TodE<sup>1</sup> aus *Pseudomonas putida* DOT-T1 (Y18245); TodE<sup>2</sup> aus *Pseudomonas putida* F1 (J04996); BphC<sup>1</sup> aus *Rhodococcus* sp. RHA1 (D32142); BpdE aus *Rhodococcus* sp. M5 (U27591); BphC<sup>2</sup> aus *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (M15333).

## 4 Diskussion

Die enzymatischen Reaktionskaskaden beim Abbau von Chloraromaten über Catechole sind weitestgehend aufgeklärt. Viele Arbeiten haben die peripheren und zentralen Reaktionen untersucht, wobei auch die daran beteiligten Enzyme biochemisch charakterisiert, zum Teil kristallisiert und röntgenspektroskopisch untersucht wurden (REINEKE, 1984; RAMOS & TIMMIS, 1987; REINEKE & KNACKMUSS, 1988; COMMANDEUR & PARSONS, 1990; CHAUNDRY & CHAPADAMUGU, 1991; DE LORENZO et al., 1991; LI et al., 1991; HAMMER et al., 1993; HOIER et al., 1994; TOMASI et al., 1995; SHU et al., 1995; VOLLMER & SCHLÖMANN, 1995).

Als Alternative zum modifizierten *ortho*-Abbau ist seit langem der *meta*-Weg bekannt, bei dem eine Catechol-2,3-Dioxygenase in der Lage ist, Catechol, 3-Methyl-, 4-Methyl- und 4-Chlorcatechol umzusetzen (DUGGLEBY, 1979; HUGHES et al., 1984; MCCLURE & VENABLES, 1986; MURRAY et al., 1972; SALA-TREPAT & EVANS, 1971; SALA-TREPAT et al., 1972). Allerdings scheint es sich beim Abbau von 4-Chlorcatechol um einen langsam ablaufenden Prozess zu handeln, da alle bislang bekannten und 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg metabolisierenden Stämme nur sehr langsam wachsen (ARENSDORF & FOCHT, 1994; ARENSDORF & FOCHT, 1995; HIGSON & FOCHT, 1992; HOLLENDER et al., 1994). Der Abbau von 3-Chlorcatechol über den *meta*-Weg schien bis vor kurzem als unmöglich, da 3-Chlorcatechol zum einen chelierend wirkt und so zu einer reversiblen Inaktivierung führen kann (KLECKA & GIBSON, 1981) oder durch das bei der Ringspaltung entstehende reaktive Säurechlorid eine irreversible Inaktivierung der 2,3-Dioxygenase herbeiführt. Die Autoxidation des akkumulierten 3-Chlorcatechols führt dann folglich zu einem toxischen Effekt in der Zelle (BARTELS et al., 1984).

MARS et al. (1997) konnten zeigen, dass *Pseudomonas putida* GJ31 die erstaunliche Eigenschaft besitzt, sehr effektiv mit Chlorbenzol zu wachsen, obwohl er den Abbau über 3-Chlorcatechol und den *meta*-Weg betreibt.

Nähere Untersuchungen zeigten die Anwesenheit eines neuen Typs von Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase (KASCHABEK et al., 1998). Dieses Enzym CbzE ist offensichtlich gegenüber dem intermediär auftretenden 2-Hydroxymuconsäurechlorid unempfindlich.

Weiterhin ergaben die Untersuchungen, dass sich das für die 2,3-Dioxygenase codierende Gen *cbzE* auf einem 3,1 kbp großen *PstI*-Fragment befindet. Es liegt downstream von einem Ferredoxin-Gen *cbzT* und upstream von einem Gen *cbzX* mit unbekannter Funktion sowie einem 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase-Gen *cbzG*. Zudem ergab sich ein schwacher Hinweis auf eine plasmidische Codierung von *cbzE*.

#### 4.1 Transposons und mögliche Transpositionereignisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Plasmid pKW1 aus Stamm GJ31 isoliert. Restriktionsanalysen ergaben eine Größe von etwa  $180 \pm 10$  kbp. Durch Hybridisierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass das von MARS et al. (1997) analysierte *PstI*-Fragment mit *cbzE* plasmidisch codiert vorliegt.

Die Untersuchungen der genetischen Umgebung von *cbzE* ergaben, dass das *cbzTEXG*-Cluster und die sich daran downstream anschließende Glutathion S-Transferase durch zwei Gene flankiert werden, welche große Ähnlichkeiten mit denen von Transposasen (TnpA) besitzen. Beide Transposase-Gene weisen dieselbe Transkriptionsrichtung auf, wobei der N-terminalen Bereich von *tnpA(2)* verkürzt ist.

Nach unveröffentlichten Hinweisen von MARS wird pKW1 geringfügig kleiner, wenn Stamm GJ31 durch Benzoat-Curing seine Eigenschaft verliert, auf Chlorbenzol zu wachsen.

Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass sich der Gencluster *cbzTEXG* auf einem transponierbaren Element befindet, welches bei unspezifischem Wachstum auf Benzoat, vermutlich durch eine Excision, verloren geht.

Versuche, das durch MARS postulierte verkleinerte Plasmid der Mutante QM1 zu isolieren, führten nicht zum Erfolg. Folglich konnte keine vergleichende Restriktionsanalyse beider Plasmide erstellt werden und keine direkte Aussage über mögliche deletierte oder verkleinerte Banden beim Fragmentmuster von QM1 getroffen werden.

Excisionsvorgänge, wie sie bei Wachstum von Stamm GJ31 auf Benzoat vermutet werden, konnten auch bei den TOL-Plasmid tragenden Organismen *Pseudomonas putida* PaW1 (WILLIAMS & MURRAY, 1974; BAYLEY et al., 1977), *Pseudomonas putida* MT15 (KEIL et al., 1985), *Pseudomonas putida* MT20 (WORSEY & WILLIAMS, 1977) und dem zu PaW1 sehr ähnlichen Stamm HS1 beobachtet werden (KUNZ & CHAPMAN, 1981).

Wuchs *Pseudomonas putida* PaW1 mit Benzoat, so verlor sein TOL-Plasmid pWW0 relativ schnell ein 39 kbp-Fragment, das bei allen isolierten Mutanten exakt an der gleichen Stelle in

pWW0 herausgetrennt wird. Zurück blieb ein kleineres Plasmid mit etwa 78 kbp (WILLIAMS & MURRAY, 1974; BAYLEY et al., 1977).

*Pseudomonas putida* MT15 enthält ein 250 kbp großes TOL-Plasmid pWW15, welches bei Wachstum auf Benzoat spontanen Deletionsereignissen unterliegt. Diese Deletionen führten zu zwei Arten von Mutanten B3 und B5 mit unterschiedlichen phänotypischen Eigenschaften (KEIL et al., 1985).

Stamm HS1 enthält das Plasmid PpC1 mit einer Größe von etwa 120 kbp und wächst mit Toluol, *m*-Xylol, *p*-Xylol oder Benzaldehyd. Nach Wachstum mit Benzoat konnten verschiedene Derivate von HS1 mit unterschiedlich großen Plasmiden isoliert werden. So konnte das Derivat PpCM1 mit dem Plasmid pDKM1 weiterhin mit Benzaldehyd wachsen, hatte aber die Fähigkeit, Toluol bzw. Xylole zu metabolisieren, verloren. pDKM1 besaß nur noch eine Größe von etwa 100 kbp. PpCT1 wuchs auf Toluol und Benzaldehyd, allerdings nicht mehr auf Xylol. Sein Plasmid pDKT1 hatte sich auf etwa 80 kbp verkleinert (KUNZ & CHAPMAN, 1981).

In *Pseudomonas putida* UCC22, einem Abkömmling von PaW1, der durch Adaptation und Wachstum auf aromatischen Aminen generiert worden war, konnte das Plasmid pTDN1 isoliert werden. Die katabolischen Gene befinden sich in einer etwa 26 kbp großen Region, welche durch zwei 1,8 kbp große direkte Sequenzwiederholungen eingerahmt ist. Bei nicht selektivem Wachstum kam es sehr schnell zu einer Deletion dieser Region (SAINT et al., 1990; MCCLURE & VENABLES, 1987).

*Alcaligenes eutrophus* A5 ist in der Lage, Biphenyl und Chlorbiphenyl zu metabolisieren. Sein etwa 75 kbp großes Plasmid trägt die für den Abbau von 4-Chlorbenzoat codierenden Gene (*cbp*). Nach mehrfacher Kultivierung auf nicht selektivem Medium verlor *Alcaligenes eutrophus* A5 seine Fähigkeit, 4-Chlorbenzoat zu mineralisieren. Sein Plasmid pSS50 besitzt nur noch eine Größe von 51 kbp und enthält weder die Gene für den Chlorbiphenylabbau noch für den Chlorbenzoatabbau (SPRINGAEL et al., 1993).

Alle bisher erwähnten Excisionsvorgänge führten ausnahmslos nicht nur zu einer Verkleinerung des Plasmides, sondern auch zu einem irreversiblen Verlust der katabolischen Information.

Dagegen wurden auch mehrere mobile DNA-Elemente sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Organismen beschrieben, die nach ihrer Excision nicht verloren gehen, sondern als zirkuläre Intermediate in der Zelle verbleiben (MORISATO & KLECKNER, 1984; ROSE & SNUTCH, 1984; SCOTT et al., 1988; TURLAN & CHANDLER, 1995; KALLASTU et al., 1998). Da in dieser Arbeit durch PCR-Experimente nachgewiesen werden konnte, dass *cbzE*

und seine angrenzenden Bereiche nicht mehr in der Mutante QM1 vorhanden waren, kann dieser Mechanismus für GJ31 ausgeschlossen werden.

Für den Excisionsmechanismus werden je nach Familienzugehörigkeit der transponierbaren Elemente zwei unterschiedliche Modelle vorgeschlagen (EGNER & BERG, 1981; GOLDBERG et al., 1990; HALLET & SHERRAT, 1997).

Die Transposition erfolgt im wesentlichen nach einem dieser beiden Mechanismen:

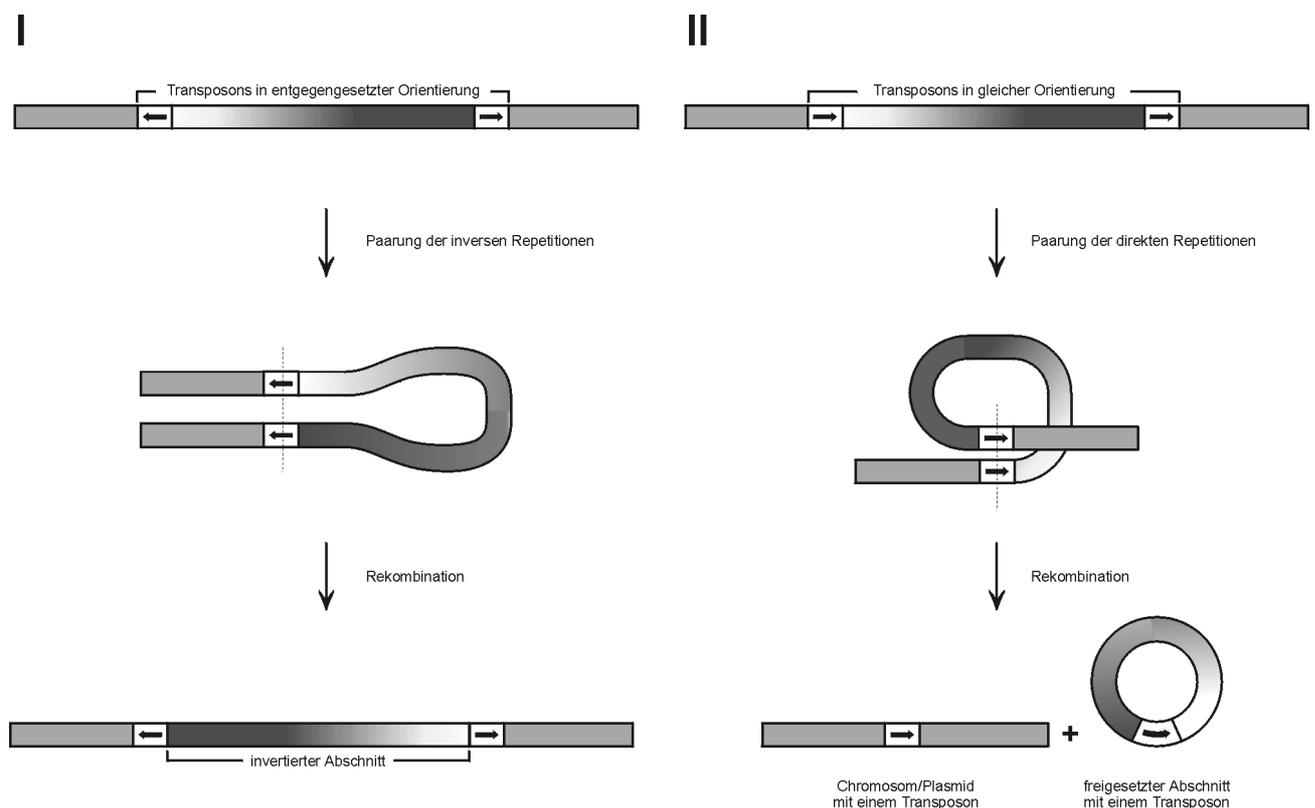
- Der konservative oder „*cut and paste*“-Weg. Dabei wird das transponierbare Element aus der Donor-DNA ausgeschnitten und an einer neuen Stelle in die Empfänger-DNA integriert. Das Transposon Tn5 wird beispielsweise durch diesen Mechanismus übertragen.
- Der replikative Weg. Das transponierbare Element wird repliziert, und eine Kopie bleibt an der Ursprungsstelle erhalten, während die zweite Kopie an neuer Stelle integriert wird. Dabei bildet ein Komplex, bestehend aus Donor- und Empfänger-DNA eine Zwischenstufe, das sogenannte Cointegrat. Über den replikativen Weg bewegt sich beispielsweise das Transposon Tn3.

Ob Transpositionsvorgänge Mutationen durch Insertionen, aber auch Inversionen und Deletionen zur Folge haben, hängt mit dem Vorgang der Cointegrat-Bildung und -Auflösung zusammen. Die Verhältnisse sind in Abb. 4.1 dargestellt. Während bei einem Rekombinationsereignis zwischen zwei auf dem Chromosom oder Plasmid nahe gelegenen aber entgegengesetzt orientierten Transposons der dazwischen liegende Nukleotidbereich invertiert wird, findet bei gleichgerichteter Orientierung eine Deletion des DNA-Abschnittes zwischen den Transposons statt. Das Schicksal des ausgeschnittenen DNA-Fragmentes ist ungewiss. Sie kann unter Beschädigung repariert werden oder geht durch Abbau ganz verloren (MORISATO & KLECKNER, 1984; ROSE & SNUTCH, 1984; SCOTT et al., 1988; TURLAN & CHANDLER, 1995; KALLASTU et al., 1998).

Eine Gemeinsamkeit aller Modelle ist, dass mindestens eine aktive Transposase innerhalb des transponierbaren Elementes vorhanden sein muss. Zudem bildet sowohl bei den einfachsten transponierbaren Elementen, den IS-Elementen, als auch bei den zusammengesetzten, komplexeren Transposons das Vorhandensein terminaler gleichgerichteter oder invertierter Repe-titionen eine entscheidende Voraussetzung. Eine Anordnung, wie sie in Abb. 4.1-II skizziert ist, findet sich auch bei den beiden gleichläufig orientierten und den *cbz*TEXG-Cluster flankierenden Transposase-Genen *tnpA*(1) und *tnpA*(2) wieder. Dabei würde der *cbz*TEXG-

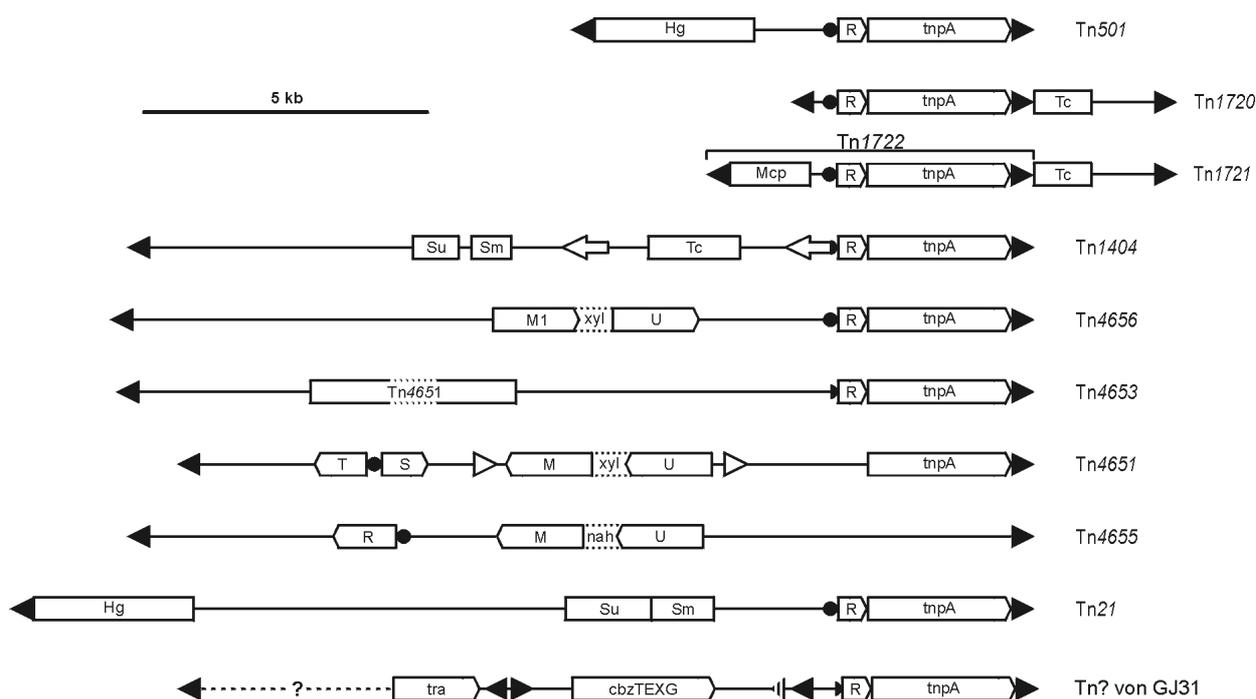
Cluster sowie die sich daran downstream anschließende Glutathion S-Transferase den zentralen Bereich eines IS-Elementes bilden. Bei unspezifischem Wachstum auf Benzoat könnte es dann zu einer Überlagerung der beiden Transposase-Gene kommen und somit, wie in Abb. 4.1 angedeutet, zu einer Excision der durch die Transposasen eingeschlossenen Region führen.

Dieses Modell der beiden sich überlappenden Transposase-Gene *tnpA(1)* und *tnpA(2)* muss allerdings verworfen werden, da sie zum einen in ihrer näheren Umgebung weder direkte noch invertierte Sequenzwiederholungen besitzen, wie sie für aktive IS-Elemente postuliert werden. Zum anderen ergaben PCR-Experimente, dass auch Bereiche, sowohl upstream als auch downstream des durch die Transposase-Gene flankierten Bereiches, in der Mutante QM1 fehlen. Daraus kann geschlossen werden, dass ein größerer Bereich als der bislang angenommene durch ein Excisionsereignis verloren gehen muss.



**Abb. 4.1** Rekombinationsmodelle für (I) die Inversion eines DNA-Abschnittes zwischen zwei identischen Transposons in entgegengesetzter Orientierung; (II) die Deletion bzw. Excision eines DNA-Abschnittes zwischen zwei identischen Transposons in gleicher Orientierung. Durch diesen Vorgang wird jeweils ein Transposon auf die entstandenen beiden DNA-Moleküle verteilt.

Bei einer Gegenüberstellung der Organisationsstrukturen von Transposons der Klasse II und dazu verwandter Transposons fällt auf, dass die degradativen Gencluster durch Inverted Repeats mit einer Länge von 38 bp (Tn4653, Tn4655), 39 bp (Tn4656) bzw. 46 bp (Tn4651) flankiert werden. Die für den Transpositionsvorgang benötigte Transposase sowie für die Auflösung des Cointegrates zuständige Resolvase sind mit Ausnahme von Tn1404, Tn4653, Tn4651 und Tn4655 unmittelbar neben dem rechten IR lokalisiert.



**Abb. 4.2** Strukturen von katabolischen Transposons der Klasse II sowie verwandten Transposons. Symbole und Abkürzungen: schwarzes Dreieck, terminale Sequenzwiederholung; weißes Dreieck, IS1246 (REDDY et al., 1994); weißer Pfeil, IS26 (SCHNABEL & JONES, 1999); schwarzer Kreis, *res*-site (interne Auflösungsstelle der Resolvase); schwarzer Halbkreis, defekte *res*-site; *tnpA*, Transposase; R, S und T, Gene für die Auflösung des Cointegrates; *nah*, *nah*-Gene; *xyl*, *xyl*-Gene; M und M1, *meta*-Operon; U, oberer Abbauweg; Hg, Gene für Quecksilberresistenz; Sm, Gene für Streptomycinresistenz; Su, Gene für Sulfonamidresistenz; Tc, Gene für Tetracyclinresistenz; Mcp, Gene für Membranproteine (Methyl-Accepting Chemotaxis Proteine). Tn4651 und Tn4653 befinden sich auf pWW0, Tn4655 befindet sich auf NAH7 und Tn4656 befindet sich auf pWW53-4. Die Operons für den oberen Abbauweg codieren im Falle des TOL-Plasmides die Gene für die Umwandlung von Toluol und Xylolen zu den entsprechenden Carbonsäuren, im Falle von NAH7 die Gene für die Umwandlung von Naphthalin zu Salicylat. Die *meta*-Operons codieren Gene für die Umwandlung der Endprodukte der oberen Abbauwege zu Catechol bzw. den entsprechenden methylierten Derivaten und dann weiter zu zentralen Stoffwechselmetaboliten. Auf Tn4656 befindet sich nur eins (M1) von zwei *meta*-Operons von pWW53. Die downstream vom *xyl*-Operon liegenden Regulator-Gene *xylS* und *xylR* sowie das upstream vom *nah*-Operon liegende Regulator-Gen *nahR* sind nicht eingezeichnet. Das schwarz/weiß gestreifte Dreieck kennzeichnet die Lage des linken IR von IS1071 auf pKW1.

Bei Tn1404 und Tn4653 sind die internen Auflösungsstellen (*res*-sites) vermutlich durch andere Transpositionereignisse (Insertion von IS26 in Tn1404) nur noch unvollständig vorhan-

den und dadurch inaktiv. Bei Tn4651 liegen die Gene für die Cointegrat-Auflösung mitsamt ihrer *res*-site upstream vom Abbau-Cluster.

Tn4655 besitzt zwar ein *tnpR*-Gen und eine intakte *res*-site, allerdings fehlt das Gen für eine Transposase. Das *tnpR*-Gen ist mit 1,8 kbp etwa dreimal länger als vergleichbare Resolvase-Gene der Klasse II. Untersuchungen ergaben, dass TnpR nicht nur Auflösungs-Reaktionen, sondern auch Integrations-Reaktionen katalysieren kann.

Eine vergleichbare Struktur liegt auch bei dem vermutlich mobilen Element von pKW1 vor. Das downstream von *cbzJ* sitzende Transposon Tn5501 könnte das rechte Ende eines komplexen Transposons darstellen, während eine zum rechten 38 bp-IR von Tn5501 komplementäre IR-Sequenz upstream vom *cbzTEXG*-Cluster das linke Ende bildet. Tn5501 besitzt als Mitglied der Tn3-Familie eine Transposase und eine Resolvase. Vermutlich verfügt Tn5501, ähnlich wie Tn1404 und Tn4653, nur über eine unvollständig vorhandene *res*-site (Daten nicht gezeigt).

Eine zur rechten 38 bp langen IR-Sequenz komplementäre Nukleotidabfolge ist auf dem bisher upstream von Tn5501 sequenzierten und sich über etwa 15 kbp erstreckenden Bereich nicht vorhanden. Etwa 9,9 kbp strangaufwärts folgt eine 38 bp lange und zur Tn3-Familie gehörende, 38 bp umfassende, IR-Sequenz. Allerdings bildet diese den linken Flügel des 262 bp langen sogenannten  $\Delta$ -x-IS-Elementes und besitzt zum rechten IR von Tn5501 lediglich eine Übereinstimmung in 11 von 38 Nukleotiden (29%). Weitere 1,5 kbp upstream vom  $\Delta$ -x-IS-Element liegt innerhalb von *traG* ein 38 bp langer Bereich, der in 22 Nukleotiden (58%) komplementär zum rechten IR von Tn5501 ist und somit als linker „Anker“ eines Klasse-II-Transposons dienen könnte. Hier stellt sich die Frage, wie niedrig die Übereinstimmung der beiden zueinander komplementären IR-Sequenzen sein darf, damit ein Transpositions Vorgang noch stattfinden kann. TSUDA & GENKA (2001) beobachteten beim 39 kbp großen Tn4656 eine Transpositionsaktivität, dessen 39 bp langen IR-Sequenzen in nur 27 Nukleotiden (69%) übereinstimmten.

Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die vermutete IR-Sequenz außerhalb des bisher sequenzierten Bereiches liegt. Somit besäße das Transposon eine Größe von mehr als 20 kbp.

Bei der Gegenüberstellung in Abb. 4.2 fällt auf, dass die linke IR-Sequenz vergleichbarer Transposons in den meisten Fällen mehrere 10 kbp upstream von der zu ihr komplementären rechten IR-Sequenz liegt. So flankieren bei Tn4653, welches Bestandteil des TOL-Plasmides pWW0 ist, die beiden 46 bp umfassenden IR-Sequenzen einen Bereich von etwa 70 kbp.

Selbst das in Tn4653 integrierte Klasse-II-Transposon Tn4651 besitzt noch eine Größe von 56 kbp, während Tn4655 und Tn4656 Bereiche von 38 kbp bzw. 39 kbp umfassen.

Tn5501 wird zur Tn3-Familie gezählt. Vertreter dieser Familie bewegen sich in der Regel mit Hilfe des replikativen Mechanismus, d.h. das transponierbare Element wird repliziert, und eine Kopie bleibt an der Ursprungsstelle erhalten, während die zweite Kopie an neuer Stelle integriert wird. Beispiele für Excisionen unter Beteiligung von Transposons der Klasse II sind bisher nicht bekannt (SHERRATT, 1989).

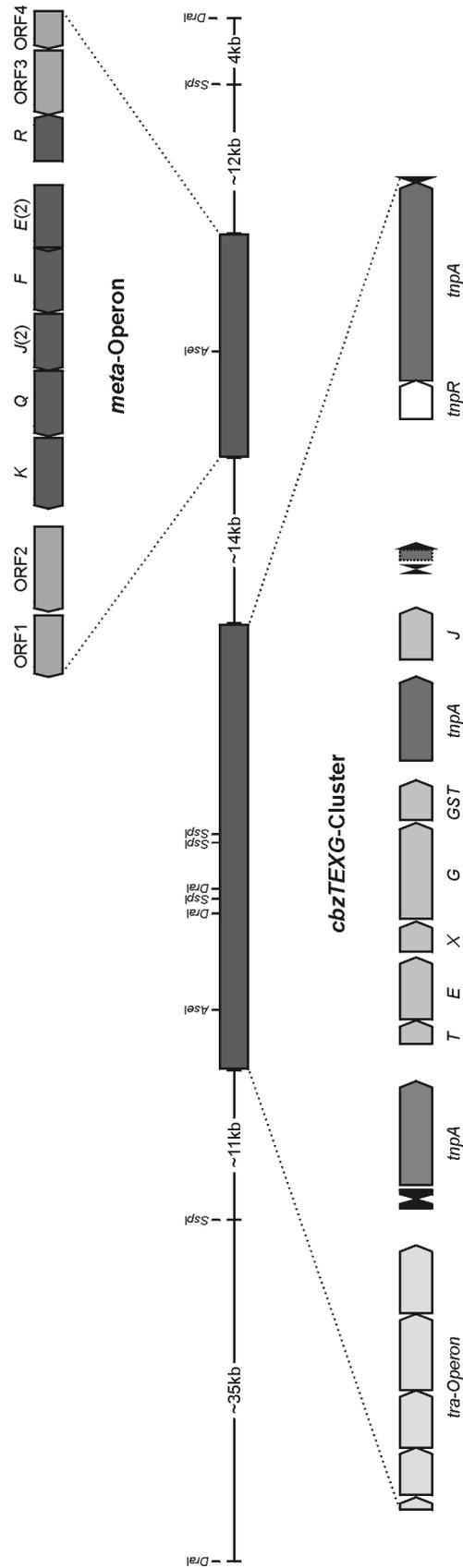
So findet beispielsweise die Excision eines 39 kbp umfassenden Bereiches aus dem TOL-Plasmid pWW0 bei unspezifischem Wachstum auf Benzoat nicht unter direkter Beteiligung der Transposons Tn4653 und Tn4651 statt. Zwei gleich orientierte 1275 bp lange Sequenzen, die sogenannten IS-Elemente IS1246, flankieren ein 39 kbp Fragment auf Tn4651 und bilden ein Transposon der Klasse I. Für die Excision wird eine Rekombination der beiden IS-Elemente nach Abb. 4.1-II verantwortlich gemacht (ASSINDER & WILLIAMS, 1990; REDDY et al.; 1994). Folglich scheint ein Transposon der Klasse II, bestehend aus Tn5501 am rechten Rand und einer geeigneten IR-Sequenz am linken Rand des *cbzTEXG*-Clusters, kein geeignetes Modell für die Deletion von *cbzE* zu sein.

## 4.2 Ein neues *meta*-Operon in Stamm GJ31

Gene des *meta*-Abbauweges sind gewöhnlich in einem Operon angeordnet, welches dann induziert wird, wenn aromatische Substrate vorhanden sind. Das gleiche gilt für Gene von peripheren Abbauwegen, wie beispielsweise die des oberen Abbauweges. Alle Abbauwege können sowohl plasmidisch als auch chromosomal codiert vorliegen (WILLIAMS & SAYERS, 1994; MARQUES & RAMOS, 1993; LEHRBACH & TIMMIS, 1983; RAMOS et al., 1997; REINEKE, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte auf dem Plasmid pKW1 ein vollständiger *meta*-Abbauweg samt entgegengesetzt orientiertem Regulatorgen und Promotorbereich identifiziert werden.

Hybridisierungsexperimente zeigten, dass sich das *meta*-Operon und der *cbzTEXG*-Cluster in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (siehe Abb. 4.3 nächste Seite).

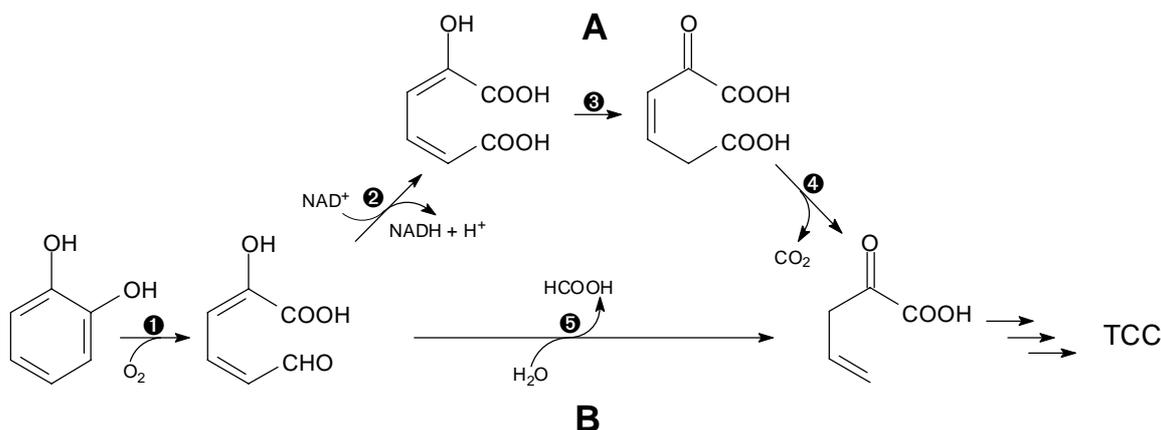


**Abb. 4.3** Restriktionskartierung als Ergebnis der Hybridisierungsergebnisse und der partiellen Sequenzierungen eines etwa 100 kbp großen Bereiches um den *cbzTEXG*-Cluster und das downstream davon gelegene *meta-Operon*. Diese Gencuster (dunkelgrau schraffiert) liegen vollständig sequenziert vor, die Anordnung der dazu benachbarten Bereiche ergibt sich aus der Kombination aller Hybridisierungsergebnisse. Die Abstände der Restriktionsschnittstellen innerhalb der sequenzierten Bereiche ist maßstabsgetreu, ein Maßstab ist angegeben. Alle degradativen Gene sind mit einem entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet: R: Regulator; E(2): 2,3-Dioxygenase; F: 2-Hydroxy-6-ketona-2,4-dienoat-Hydrolase; J(2): 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase; Q: Acetaldehyd-Dehydrogenase; K: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase; T: Ferredoxin-Reduktase; E: 2,3-Dioxygenase; X: Funktion unbekannt; G: 2-Hydroxymuonsäuresemialdehyd-Dehydrogenase; GST: Glutathion S-Transferase; J: 2-Hydroxypent-2,4-dienoat-Hydratase. Die Belegung der übrigen Gempfeile kann den Kapiteln 3.3 und 3.4 und den entsprechenden Abbildungen entnommen werden.

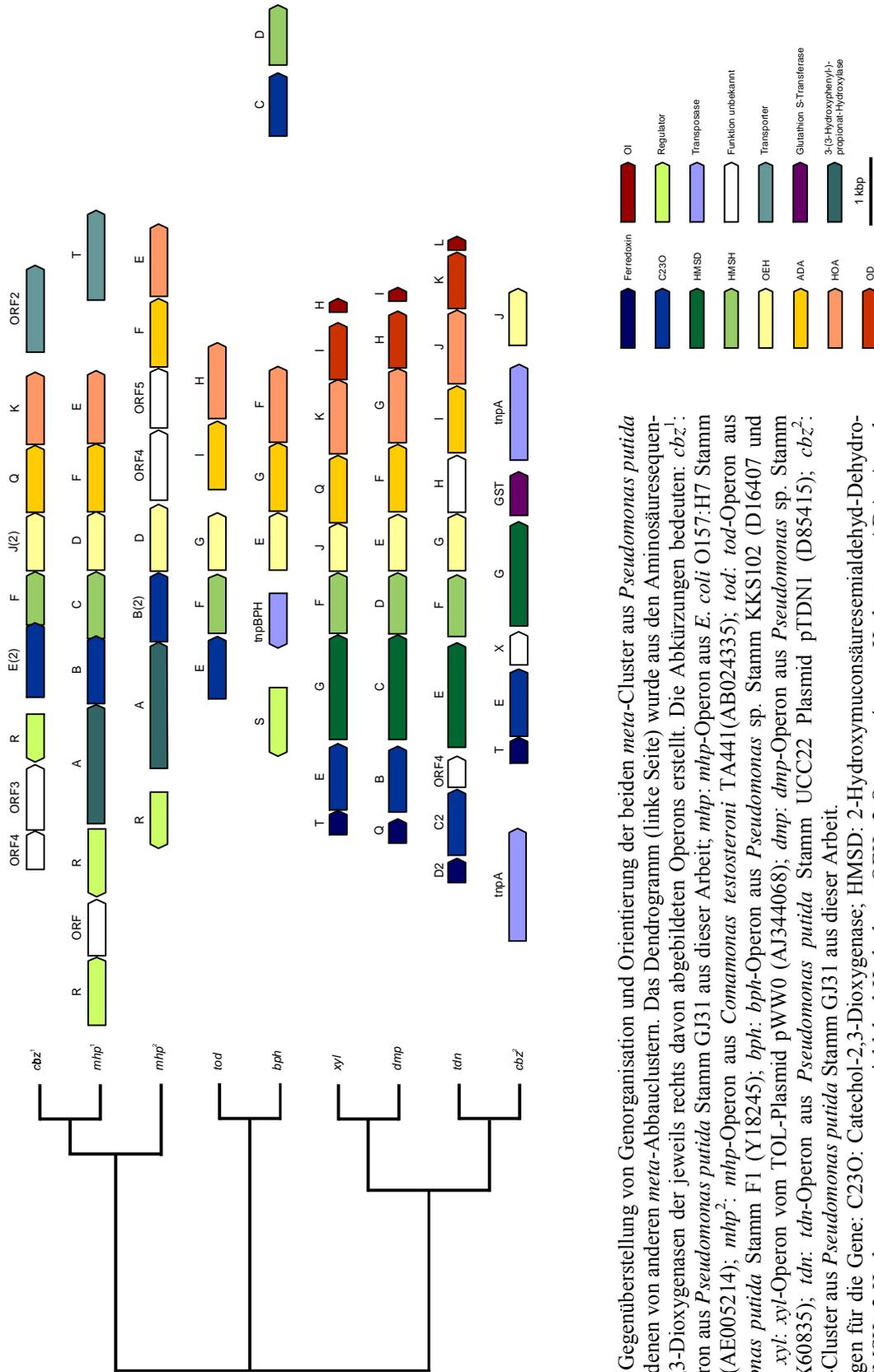
### 4.3 Vergleich der beiden Abbau-Cluster von Stamm GJ31 mit Abbaucleistern anderer Stämme

Der Vergleich der beiden in Stamm GJ31 gefundenen Abbaucleistern mit *meta*-Wegen anderer Organismen macht deutlich, dass diese sich in bezug auf ihre Genorganisation in zwei Untergruppen einteilen lassen (Abb. 4.5 nächste Seite).

Sowohl *xyl*-Operon vom TOL-Plasmid pWW0 (GREATED et al., 2002), *dmp*-Operon aus *Pseudomonas* sp. CF600 (SHINGLER et al., 1992) als auch das *bph*-Operon aus *Pseudomonas* sp. Plasmid pWW110 (CARRINGTON et al., 1994) und das *nah*-Operon aus *Pseudomonas putida* PpG7 (YEN & GUNSALUS, 1982; SIMON et al., 1993; SANSEVERINO et al., 1993; BORONIN et al., 1989) besitzen neben dem durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase gebildeten hydrolytischen Abbauzweig auch den dehydrogenolytischen Zweig. Bei diesem befindet sich zum einen zwischen dem Gen der Catechol-2,3-Dioxygenase und dem der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase das einer 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, zum anderen schließen sich downstream von der 2-Keto-4-oxovalerat-Aldolase die Gene für die 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase an.



**Abb. 4.4** Ausschnitt aus dem Abbaumechanismus für Catechol über **A** den dehydrogenolytischen Weg (Oxalocrotonat-Weg) und **B** den hydrolytischen Weg. Die an den einzelnen Reaktionsschritten beteiligten Enzyme sind durchnummeriert: **1** Catechol-2,3-Dioxygenase; **2** 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase; **3** 4-Oxalocrotonat-Tautomerase; **4** 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase; **5** 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase. **TCC** = Tricarbonsäurecyclus.



**Abb. 4.5** Gegenüberstellung von Genorganisation und Orientierung der beiden *meta*-Cluster aus *Pseudomonas putida* GJ31 mit denen von anderen *meta*-Abbauclustern. Das Dendrogramm (linke Seite) wurde aus den Aminosäuresequenzen der 2,3-Dioxygenasen der jeweils rechts davon abgebildeten Operons erstellt. Die Abkürzungen bedeuten: *cbz*<sup>1</sup>: *meta*-Operon aus *Pseudomonas putida* Stamm GJ31 aus dieser Arbeit; *mhp*<sup>1</sup>: *mhp*-Operon aus *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 (AE005214); *mhp*<sup>2</sup>: *mhp*-Operon aus *Comamonas testosteroni* TA441 (AB024335); *tod*: *tod*-Operon aus *Pseudomonas putida* Stamm F1 (Y18245); *bph*: *bph*-Operon aus *Pseudomonas* sp. Stamm KKS102 (D16407 und M26433); *xyl*: *xyl*-Operon vom TOL-Plasmid pWW0 (AJ344068); *dmp*: *dmp*-Operon aus *Pseudomonas* sp. Stamm CF600 (X60835); *tdn*: *tdn*-Operon aus *Pseudomonas putida* Stamm UCC22 Plasmid pTDN1 (D85415); *cbz*<sup>2</sup>: *cbz*TEXG-Cluster aus *Pseudomonas putida* Stamm GJ31 aus dieser Arbeit. Abkürzungen für die Gene: C23O: Catechol-2,3-Dioxygenase; HMSD: 2-Hydroxyumuonsäuresemialdehyd-Dehydrogenase; HMSH: 2-Hydroxyumuonsäuresemialdehyd-Hydroxylase; OEH: 2-Oxopent-4-enoat-Hydratase; ADA: Acetaldehyd-Dehydrogenase; HOA: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase; OD: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase; Ol: 4-Oxalocrotonat-γ-Automerase.

Zusätzlich liegt bei den zum *xyl*-Operon ähnlichen Clustern upstream von der Catechol-2,3-Dioxygenase ein Ferredoxin, welches vermutlich zur Stabilität des Eisen-(II)-Ions gegen Oxidation verantwortlich ist.

Aus neueren kinetischen und spektroskopischen Untersuchungen geht hervor, dass die den Catechol-2,3-Dioxygenasen vorangestellten [2Fe-2S]-Ferredoxin-ähnlichen Proteine wie CbzT aus GJ31, AtdS aus dem Anilin-Abbauer *Acinetobacter* sp. YAA (TAKEO et al., 1998) oder CdoT aus einem Nitrobenzol-verwertenden Stamm *Comamonas* sp. JS765 (PARALES et al., 1997) ähnlich wie XylT aus *Pseudomonas putida* pWW0 einen Komplex mit der Catechol-2,3-Dioxygenase bilden und so zu einer effektiven Reaktivierung des Proteins führen (HUGO et al., 1998; HUGO et al., 2000; TROPEL et al., 2002).

In eine weitere Gruppe lassen sich beispielhaft das *tod*-Operon aus *Pseudomonas putida* F1, das *bph*-Operon aus *Pseudomonas* sp. KKS102 (KIMBARA et al., 1989) und das *mhp*-Operon aus *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 (PERNA et al., 2001; ARAI et al., 1999) einordnen. Diese besitzen wie das *meta*-Operon aus Stamm GJ31 nur Gene, welche für eine Metabolisierung über den hydrolytischen Weg erforderlich sind.

Auffällig ist, dass die Anordnung der Gene für die Hydroxymuconsäure-Hydrolase, die 4-Oxo-2-pentenoat-Hydratase, die Acetaldehyd-Dehydrogenase und die 4-Hydroxy-2-oxo-valerat-Aldolase mit Ausnahme des *bph*-Operons aus *Pseudomonas* sp. KKS102, bei dem die Hydrolase vermutlich durch ein Transpositionereignis verloren gegangen ist, hoch konserviert zu sein scheint. Ebenso liegt die Dioxygenase, wieder mit Ausnahme von Stamm KKS102, bei allen Operons upstream von dieser konservierten Genanordnung.

Der Vergleich der beiden degradativen Cluster von GJ31 verdeutlicht, dass der Transposonbereich um *cbzE* (*cbz*TEXG-Cluster) in der Organisation seiner Gene große Ähnlichkeiten mit einem Teil der Anordnung des *xyl*-Operons, das *meta*-Cluster *cbzE(2)FJ(2)QK* große Ähnlichkeiten mit dem *tod*-Operon bzw. *mhp*-Operon besitzt.

Bemerkenswert ist die große Übereinstimmung des *cbz*-Operons bezüglich Genorganisation mit der des *mhp*-Operons aus *E. coli* EDL933 (PERNA et al., 2001). Dabei ist nicht nur eine auffällige Homologie der Gene von Dioxygenase bis zur Aldolase vorhanden, sondern auch der sich daran anschließende, vermutlich für ein Transporter-Gen codierende Leserahmen ORF2. Ein Unterschied besteht darin, dass sich ORF2 im *cbz*-Operon unmittelbar an die Aldolase CbzK anschließt, während beim *mhp*-Operon ein mehrere hundert Basenpaare

großer Bereich dazwischen liegt. Der größte Unterschied zwischen diesen beiden Operons besteht in der Abwesenheit des für die 3-(3-Hydroxyphenyl-)propionat-Hydroxylase codierenden Gens *mhpA*, welches sich im *mhp*-Operon zwischen den Genen für den Regulator *mhpR* und der Dioxygenase *mhpB* befindet. Weitere Ähnlichkeiten bestehen in der Lage und Orientierung des Regulator-Gens *mhpR* und *gntR* des *cbz*-Operons.

Im upstream-Bereich von *mhpR* folgt auf einen ORF mit unbekannter Funktion ein Leserahmen, welcher Ähnlichkeiten zu Regulator-Genen der AraC-Familie besitzt und dessen möglicher Einfluss auf die Regulation des *mhp*-Operons nicht ausgeschlossen werden kann.

Dieselbe Anordnung mit derselben Orientierung findet sich auch beim *meta*-Operon von GJ31, bei dem ORF4 ebenfalls gewisse Ähnlichkeiten mit Regulator-Genen aufweist, sich allerdings in der Länge (537 Nukleotide im Vergleich zu 951 Nukleotide bei *mhpR*) stark unterscheidet.

Die AraC-Familie gehört zu den größten Familien positiver Regulatoren (GALLEGOS et al., 1993; RAMOS et al., 1990) und ist nach dem Regulator AraC des L-Arabinose-Operons aus *Escherichia coli* benannt, dem ersten Protein, welches als Transkriptions-Regulator identifiziert, gereinigt und biochemisch charakterisiert worden ist (GREENBLATT & SCHLEIF, 1971; SCHLEIF, 1969). Zu den Mitgliedern gehört auch das XylS-Protein aus *Pseudomonas putida*, welches durch *xylS* auf dem TOL-Plasmid pWW0 codiert ist und als Transkriptions-Aktivator für das *meta*-Operon fungiert. Obwohl es sich bei fast allen Vertretern dieser Familie um positive Transkriptions-Aktivatoren handelt, besitzen zwei Mitglieder die Eigenschaft, sowohl als Repressor als auch als positiver Regulator zu dienen (FETHERSTON et al., 1996). Bei einem dieser Mitglieder handelt es sich um AraC aus *E. coli*, welches auch dem *cbz*-Operon sehr ähnlichen *mhp*-Operon aus *E. coli* vorgelagert ist.

Nach GALLEGOS et al. (1997) enthalten die Regulatorproteine der AraC-Familie zwei kurz hintereinander folgende Helix-Turn-Helix-Motive. Diese befinden sich in der Regel in einem sich über etwa 100 Aminosäuren erstreckenden Bereich des C-Terminus. Das erste HTH-Motiv ist weniger stark konserviert, was vermutlich auf die unterschiedlichen Operatorsequenzen der verschiedenen zu regulierenden Operons zurückzuführen ist. Die deutlich höhere Konservierung des zweiten HTH-Motives ergibt sich vermutlich aus seiner gemeinsamen Aufgabe für alle Vertreter dieser Familie, wie beispielsweise den Kontakt mit dem Transkriptionsapparat.

Eine Gegenüberstellung der aus den Leserahmen ORF4 (*cbz*-Operon) und AraC (*mhp*-Operon) abgeleiteten Aminosäuren ergeben trotz der unterschiedlichen Längen (ORF4: 179 Aminosäuren; AraC: 257 Aminosäuren) in mehreren Bereichen überraschend große Ähnlichkeiten. So ergibt sich eine Übereinstimmung in 69 Positionen (39% der Gesamtsequenz von ORF4), in denen entweder identische oder funktionelle Konservierung vorhanden ist. Ebenso gibt es 97 Positionen (54% der Gesamtsequenz von ORF4), in denen eine Homologie zwischen ORF4 und AraC besteht.

AraC	1	MRPLTVAIIAVAGFSPFHLSPFVIFSEKMAEKKRFHVIICA EKPGNVDSADGFSVTATH	60
ORF4	1	MKVRRVVAGTQGGKSVF-----LSDGLAPHTY EYEHVPGFATSL----IWETA	44
		*: * . : . * * * : : : * . . ** . * : *	
AraC	61	DYTA VIQADIVIIPYWG TITQKPPQK LLEALTTARDNGAQIVGLCLGT FVLGYAGLLKNK	120
ORF4	45	SLPVIPEGLVDPVRESSTLLPKPGETKCLAVSFPPDS-----VFGSSDFDPND	92
		. . . : . : : . * : ** : . * : : . * . * : * : : *	
AraC	121	RAATHWEFEREFQARFPQTHLDINALYVDDDGIITSAGTAAALDCCLYIVRQHFGSDYAN	180
ORF4	93	ANAEQQRKLLGLYE CFPDPERPGMHASPTIDYGVVKGPLILELD-----	136
		* : . : * : . : * . * * : . . . **	
AraC	181	HIARRMVPPYRTGGQAQFIEQPVPKNTHDERINLLLDYLRQNI AQQHDLDSL AQRVMMS	240
ORF4	137	-----DGEVRELSSGDVVVQQGNV-	155
		: : : . * : * : :	
AraC	241	RRTLTRHFMKATGSSIAEWLITERLRRSQELLGSSQLPVERIAAEVGF LSPVTWRQHFKS	300
ORF4	156	-----HAWRNP GSEPA--LITFIL-----	172
		* : . * . * * * * *	
AraC	301	HFGVSPA EWRKTFRGMA	
ORF4	173	-IGANTKQ-----	
		: * . . . :	

**Abb. 4.6** Sequenzvergleich zwischen der aus ORF4 abgeleiteten Aminosäuresequenz aus GJ31 mit der Aminosäuresequenz von AraC upstream vom *mhp*-Operon aus *Escherichia coli* EDL933 (PERNA et al., 2001)

Ein offener Leserahmen ORF3 mit bislang unbekannter Funktion wie er auch beim *mhp*-Operon beobachtet wird, liegt zwischen ORF4 und *gntR*. Allerdings sind hier die Aminosäuresequenzen dieser beiden Leserahmen so unterschiedlich, dass ein Vergleich nicht möglich ist.

#### 4.4 CbzE(2) - eine neue Catechol-2,3-Dioxygenase in Stamm GJ31

Neben der durch MARS et al. (1997) identifizierten Dioxygenase CbzE konnte auf dem Plasmid pKW1 von Stamm GJ31 eine weitere Catechol-2,3-Dioxygenase CbzE(2) identifiziert

werden, deren Gen Bestandteil des *meta*-Operons ist und dessen abgeleitete Aminosäuresequenz sehr hohe Übereinstimmungen mit denen der 2,3-Dihydroxyphenylpropionsäure-1,2-Dioxygenase MhpB aus *E. coli* K-12 W3110 (BURLINGAME & CHAPMAN, 1983) sowie der Catechol-2,3-Dioxygenase MpcI aus *Alcaligenes eutrophus* JMP222 (KABISCH & FORTNAGEL, 1990) besitzt.

Stellt man die Aminosäuresequenzen der N-terminalen und C-terminalen Bereiche von CbzE(2), MhpB und MpcI gegenüber, so ergeben sich in 39 Positionen (23% der Gesamtsequenz) Übereinstimmungen, bei denen entweder identische oder funktionelle Konservierung in allen sechs Sequenzen vorhanden sind. Ebenso gibt es 66 Positionen (39% der Gesamtsequenz), in denen eine paarweise Ähnlichkeit zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Domäne von CbzE(2) entweder mit MhpB oder MpcI beobachtet werden kann.

CbzE (2)	1	MNAYLHCLSHSTPLIGHFDPTQDVLDEVAEVVRAARARIEAFNPVLVLFAPDHYNGFFYD	60	•
MhpB	1	MHAYLHCLSHSPLVGYVDPAQEVLDVNGVIASARERIAAFSPVLVLFAPDHYNGFFYD	60	• N
MpcI	1	MPIQLECLSHSTPLHGYVDPAPEVVAEVERVQAAARDRVRAFDPVLVVFAPDHFNGFFYD	60	•
CbzE (2)	172	--LGSGGLSHQP-----PVPELAKVDARM----ADRLMGSGRDL---PPEERDARTQQ-	206	•
MhpB	172	--LGSGGLSHQP-----PVPELAKADAHM----RDRLLGSGKDL---PASERELRQQR-	206	• C
MpcI	172	--VGSGGISHEP-----PVPELAGASEEV----AERLIA-GRN----PSPESAARQAR-	204	•
		. : ** * * . : . : . : . : * : : . : . : . :		
CbzE (2)	61	VMPPFCGLMAAEAIGDFGSLVGTLSVPKELAEACAESVLTSGIDLAVSYRMQVDHGFAQP	120	•
MhpB	61	VMPPFCGLVGATAIGDFGSAAGELPVPVELAEACAHAVMKSGIDLAVSYCMQVDHGFAQP	120	• N
MpcI	61	VMPPFCIGAAATAIGDFKSLAGKLPVPADLALSLAESVMAADIDVALSHRMQVDHGCADA	120	•
CbzE (2)	215	-----VVVAAERFVEDQNTLHPLNPKWDQYFLDVVEQDLVSQLD-DLSN--SHLSELAGK	266	•
MhpB	215	-----VISAAEKFVEDQRTLHPLNPIWDNQFMTLLEQGRIQELD-AVSN--EELSAIAGK	266	• C
MpcI	213	-----TVAAAKSFVAGDShLHPLNPEWDRAFLSLLASGELTAVD-GMTN--DAITRDGGK	264	•
		. : . : . : . : . : . : . : . : . : * : : : . : . :		
CbzE (2)	121	LEFLLGGLDKYPVLPVFNVCVAPPLPTFERVRLGGEAIGRFTTRGLNKRVLV.....	171	•
MhpB	121	LEFLLGGLDKVPVLPVFINVATPLPGFQRTTRMLGGEAIGRFTSTLNKRVLV.....	171	• N
MpcI	121	LAALTGSLHRYVPVIVFINSVAPPMATLRRARLLGDVGRFLSRAGKRVLV.....	171	•
CbzE (2)	268	STHE---VKAWVAAFSALAAHGAYTATDRYRPIPEWIAGFGSISAHTQR-	314	•
MhpB	268	STHE---IKTWAAFAAISAFGNWRSEGRYYRPIPEWIAGFGSLSARTEN-	314	• C
MpcI	266	SAHE---IRTWAAFGALAAAGPYRASLDFYRAIPEWIAGFATMHAEPAAV	313	•
		. : . : . : . : . : . : . : . : . : * : . :		

**Abb. 4.7** Aminosäuresequenzvergleich der aminoterminalen Domänen N (Position 1-171) und der carboxyterminalen Domänen C (Position 172 bis Ende) von CbzE(2) aus dieser Arbeit mit der sequenzähnlichen 2,3-Dihydroxyphenylpropionat-1,2-Dioxygenase MhpB aus *Escherichia coli* K-12 W3110 (D86239) und der Catechol-2,3-Dioxygenase MpcI aus *Alcaligenes eutrophus* JMP222 (X52414). Identische Aminosäuren (\*), funktionell ähnliche in allen sechs Sequenzen (: ) (erlaubt sind: I/L/V/M, S/T, D/E, D/N, E/Q, A/G, A/S, R/K/H, F/Y) sowie paarweise Ähnlichkeiten innerhalb des amino- oder carboxyterminalen Bereiches (.) sind gekennzeichnet.

Die Ähnlichkeiten der amino- und carboxyterminalen Bereiche lässt vermuten, dass diese Enzyme, ähnlich wie die 2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. LB400 (HAN et al., 1995), aus einer Genverdoppelung zu einem früheren Evolutionszeitpunkt stattgefunden haben muss (SPENCE et al., 1996).

## 4.5 Abbau von 3-Chlorcatechol bzw. 4-Chlorcatechol

Beim Abbau von 3-Chlorcatechol werden sowohl die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase als auch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase nicht benötigt, da das bei der Ringspaltung entstandene Säurechlorid durch Wasser hydrolysiert wird und der beim Abbau von Methylcatecholen benötigte Oxidationsschritt der Aldehydgruppe zur Carbonsäure entfällt. Dennoch konnte MARS et al. (1997) eine hohe Aktivität dieser beiden Folgeenzyme im Rohextrakt von GJ31, der mit Chlorbenzol über 3-Chlorcatechol gewachsen war, nachweisen. Diese Beobachtung wird darauf zurückzuführen sein, dass zur Bildung des 4-Oxalocrotonats die Enzyme des dehydrogenolytischen Zweiges erforderlich sind (Abb. 4.4). Entweder werden diese Enzyme konstitutiv exprimiert oder sie liegen organisiert in einem *meta*-Operon vor und werden aufgrund der Bildung eines Polycistrons exprimiert. Nach MARS et al. (1997) wird die Hydrolase nur dann stark exprimiert, wenn GJ31 auf Benzol, Toluol, Chlorbenzol oder einem Gemisch der beiden letzteren gewachsen ist. Bei Wachstum auf Acetat oder Succinat ist die Expression nur sehr schwach. Die Dehydrogenase ist dagegen nicht nur bei Wachstum auf Benzol, Toluol oder Chlorbenzol stark exprimiert, sondern auch genauso stark bei Wachstum auf Acetat oder Succinat (siehe Tab 4.1). Diese Beobachtungen lassen sich dadurch erklären, dass die Hydrolase aus einem *meta*-Operon stammt, wie es auf dem Plasmid gefunden worden ist, und nur beim Abbau von Aromaten zusammen mit dem anderen „Set“ der *meta*-Weg-Enzyme polycistronisch exprimiert wird. Bei der Verwertung von Acetat oder Succinat wird dieses Cluster nur schwach exprimiert, so dass nur eine geringe Aktivität der Hydrolase gemessen werden kann.

Die Dehydrogenase befindet sich dagegen nicht auf diesem Operon, sondern im downstream-Bereich von *cbzE* und wird wie die suizidstabile Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase sowohl bei Wachstum auf Aromaten als auch bei der Verwertung von Acetat und Succinat konstitutiv exprimiert.

**Tab. 4.1:** Spezifische Aktivitäten aller Enzyme des *meta*-Weges in Rohextrakt von *Pseudomonas putida* GJ31 nach Wachstum auf Acetat und Chlorbenzol

Enzym	spezifische Aktivität in U/mg Protein nach Wachstum auf	
	Acetat	Chlorbenzol
Catechol-2,3-Dioxygenase	223*	356*
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase	215*	523*
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase	8*	311*
4-Oxalocrotonat-Tautomerase	158	345
4-Oxalocrotonat-Decarboxylase	145	189
2-Oxopent-4-enoat-Hydratase	256	378
4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase	19	54
Acetaldehyd-Dehydrogenase	6	75

\* Die Werte stammen von MARS (Promotion, 1998).

Ähnlich verhält es sich mit den anderen Folgeenzymen des *meta*-Weges. Für die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase und 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase sind bei Wachstum auf Acetat zwar eine weitaus geringere aber dennoch deutlich messbare Expression zu beobachten. Ebenso verhält es sich mit dem Gen der 2-Oxopent-4-enoat-Hydratase, das sowohl downstream vom *cbz*TEXG-Cluster (*cbzJ*) als auch auf dem *meta*-Operon (*cbzJ(2)*) vorkommt. Vermutlich wird die etwas geringere Aktivität bei Wachstum auf Acetat durch die konstitutive Expression von *cbzJ* hervorgerufen, während die Hydratase CbzJ(2) vom *meta*-Operon nur schwach exprimiert wird. Die Aktivitäten der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase CbzK und der Acetaldehyd-Dehydrogenase CbzQ zeigen, dass sie bei Wachstum auf Acetat deutlich schwächer exprimiert werden und vermutlich dem *meta*-Operon zuzuordnen sind. Die etwas erhöhte Aktivität der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase beim Wachstum auf Acetat wird vermutlich durch isofunktionelle Enzyme und somit nicht durch das Genprodukt CbzK hervorgerufen (ARAI et al., 2000).

Die aufgrund von Sequenzvergleichen zugeschriebenen Funktionen der für den Abbau von Chlorbenzol nicht benötigten 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase CbzG und der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase CbzF konnten durch Klonierung in einen Überexpressionsstamm belegt werden. Dagegen verliefen Anstrengungen zum Auffinden der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase ohne Erfolg. Obwohl die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase *in vitro* nicht unbedingt für den Isomerisierungsschritt notwendig ist, zeigten enzymatische Untersuchungen mit Rohextrakt aus Zellen von Stamm

GJ31, die auf Chlorbenzol angezogen wurden, dass eine katalytische Aktivität für diesen Metabolisierungsschritt vorhanden ist und somit die Existenz einer Tautomerase bewiesen ist. Ebenso konnte durch HARAYAMA et al. (1987) mit Tautomerase-negativen Mutanten gezeigt werden, dass die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase für eine effektive Umsetzung von Metaboliten über den 4-Oxalocrotonat-Zweig essentiell ist.

#### **4.6 Inaktivierung der Hydrolase durch 4-substituierte Verbindungen**

Nach SALA-TREPAT et al. (1972) sowie BAYLY & WIGMORE (1973) wird 3-Methylcatechol über den hydrolytischen und Catechol wie auch 4-Methylcatechol vorwiegend, vermutlich sogar ausschließlich, über den dehydrogenolytischen (4-Oxalocrotonat-) Zweig metabolisiert. Neuere Untersuchungen mit Pseudomonaden, die Mutationen im TOL-Plasmid enthielten, zeigten, dass allein 4-Methylcatechol, nicht aber das unsubstituierte Catechol über den 4-Oxalocrotonat-Zweig katabolisiert werden muss (HARAYAMA et al., 1987).

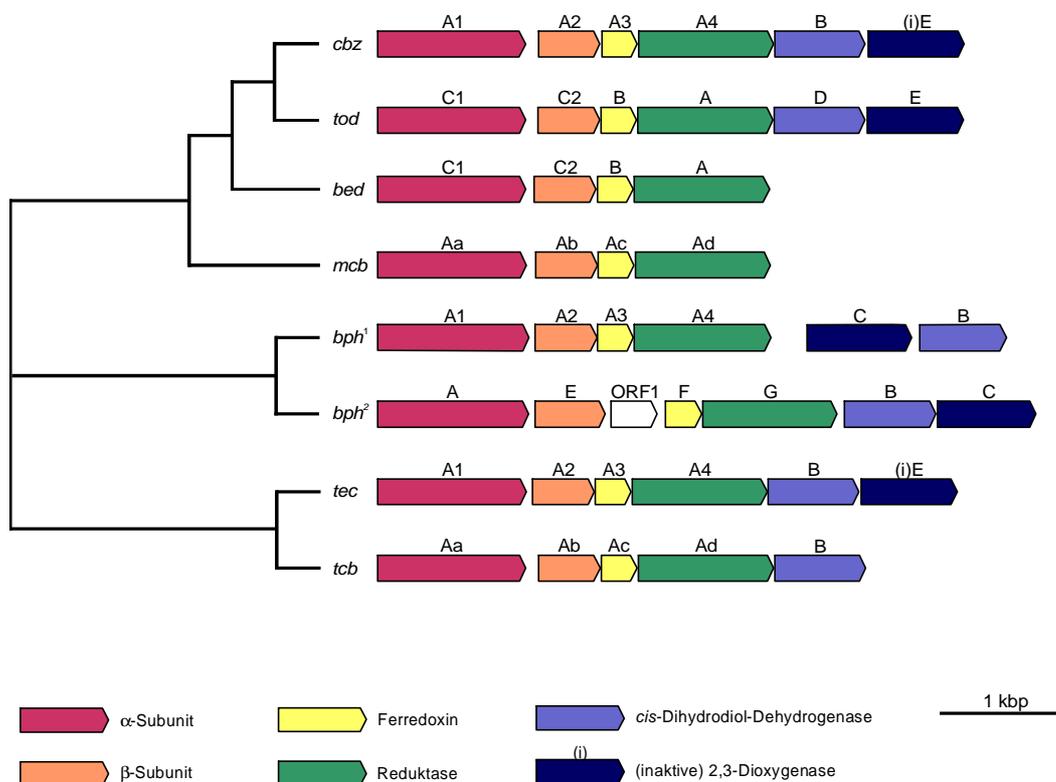
Durch enzymatische Untersuchungen mit Rohextrakt des Überexpressionsstammes Cbz-XP-F (2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase) mit 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd und 5-Methyl-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd, die bei der *meta*-Spaltung aus den Vorstufen 4-Chlorcatechol bzw. 4-Methylcatechol entstehen, ergab sich, dass mit keinem dieser Substrate eine Aktivität zu verzeichnen ist, während für das unsubstituierte Muconsäuresemialdehyd eine hohe Affinität ermittelt werden konnte. Untersuchungen, in denen der Rohextrakt zuerst mit chloriertem Semialdehyd und unmittelbar darauf derselbe Ansatz mit dem unchlorierten Substrat versetzt wurde, zeigten, dass auch unsubstituiertes Substrat nicht mehr umgesetzt wird. Daraus ergeben sich Hinweise, dass der fehlende Umsatz der 4-substituierten Verbindungen nicht nur auf eine nicht vorhandene Substratspezifität, sondern auf eine Inaktivierung der Hydrolase zurückzuführen sein könnte. Inwiefern diese Inaktivierung reversibel ist, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

#### **4.7 Ein neuer oberer Abbauweg in Stamm GJ31**

In dieser Arbeit konnte für *Ps. putida* GJ31 ein insgesamt 5493 bp großes Fragment sequenziert werden. Alle darauf identifizierte Leserahmen besitzen sehr große Homologien und die

offenen Leserahmen *cbzAb* und *cbzAc* vollkommene Identität mit Genen anderer, sogenannter oberer Abbauwege. Der in Stamm GJ31 identifizierte obere Abbauweg besteht aus den folgenden in dieser Reihenfolge auftretenden Komponenten:  $\alpha$ -Untereinheit und  $\beta$ -Untereinheit der Chlorbenzol-Dioxygenase, Ferredoxin, Ferredoxinreduktase und *cis*-Dihydrodiol-Dehydrogenase. Seine Gene scheinen polycistronisch vorzuliegen und er besitzt damit große Homologien zu Abbauwegen für aromatische Verbindungen der meisten anderen Organismen, bei denen auf einen initiierenden Dioxygenierungsschritt eine Dehydrogenierung zum Catechol erfolgt.

Der obere Abbauweg ist in den meisten in der Literatur beschriebenen Beispielen nicht zwingend an den darauffolgenden unteren Abbauweg gebunden, sondern liegt häufig viele tausend Basenpaare von diesem entfernt. Ebenso liegen zahlreiche Beispiele vor, in denen der obere Abbauweg auf einem Plasmid liegt, der untere Abbauweg dagegen chromosomal codiert ist und umgekehrt (FURUKAWA & MIYAZAKI, 1986; GOYAL & ZYLSTRA, 1996; KIKUCHI et al., 1994; MASAI et al., 1995; ZYLSTRA & GIBSON, 1989). Durch Hybridisierungsexperimente konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Stamm GJ31 dieser obere Abbauweg für Chlorbenzol chromosomal codiert ist.



**Abb. 4.8** Vergleich der Genorganisation und Orientierung bekannter Cluster für den oberen Abbauweg mit dem von GJ31. Die Abkürzungen bedeuten: *cbz*: *cbz*-Operon aus *Pseudomonas putida* GJ31 aus dieser Arbeit; *tod*: *tod*-Operon aus *Pseudomonas putida* F1 (J04996); *bed*: *bed*-Operon aus *Pseudomonas putida* ML2 (AF148496); *mcb*: *mcb*-Operon aus *Ralstonia* sp. JS705 (AJ006307); *bph*<sup>1</sup>: *bph*-Operon aus *Rhodococcus* sp. RHA1 (D32142); *bph*<sup>2</sup>: *bph*-Operon aus *Pseudomonas* sp. CAM-1 (AY027651); *tec*: *tec*-Operon aus *Burkholderia* sp. PS12 (U78099); *tcb*: *tcb*-Operon aus *Pseudomonas* sp. P51 (U15298).

OESCH & DALY (1972) sowie ROGERS & GIBSON (1977) gehen davon aus, dass die offensichtlich hoch konservierte Genanordnung in fast allen bekannten Fällen dazu notwendig ist, einen gekoppelten Dioxygenase-Dehydrogenase-Komplex zu ermöglichen.

Allerdings sind auch Ausnahmen von dieser Genanordnung bekannt. So liegt in *Pseudomonas putida* ML2 (FONG et al., 1996) das Gen für die *cis*-Dihydrodiol-Dehydrogenase *bedD* upstream vom Dioxygenase-Komplex *bedC1C2BA*, bei *Pseudomonas putida* NCIB9816 (KURKELA et al., 1988) und *Pseudomonas putida* G7 (SIMON et al., 1993) sind die Gene für die vier Untereinheiten der Dioxygenase im Vergleich zum obigen Schema entgegengesetzt organisiert.

## 4.8 Ausblick

Die Analyse der genetischen Umgebung von *cbzE* sowie die Identifizierung eines neuen, plasmidisch codierten *meta*-Abbauweges respektive eines oberen Abbauweges hat zwar zum Verständnis der Chlorbenzolabbaus durch GJ31 beigetragen, allerdings auch eine Vielzahl noch zu klärender Fragen aufgeworfen.

Ungeklärt bleibt, warum sich das verkleinerte Plasmid aus der Mutante QM1 nicht ähnlich gut isolieren lassen konnte, wie bei GJ31 selbst. Entweder wurde für diesen Stamm die falsche Isolierungsmethode angewendet oder das Plasmid unterlag einer Deletion, mit der gleichzeitig grundlegende Eigenschaften verändert wurden, die eine Isolierung und ausreichende Trennung von der chromosomalen DNA mit der Methode nach WHEATCROFT & WILLIAMS unmöglich machten. Eine Isolierung des Plasmides von QM1 zur Erstellung einer Restriktionskarte und sich daran anschließende Hybridisierungsexperimente könnten wichtige Fragen zur Größe des deletierten Fragmentes und zur Spezies der daran beteiligten transponierbaren Elemente beantworten.

Weiterhin ist das Schicksal des deletierten Fragmentes offen. Wird die herausgetrennte DNA unter allen Bedingungen abgebaut oder besteht die Möglichkeit, dass dieses Fragment in anderer Position wieder eingesetzt werden kann? Daran schließt sich die Frage an, ob auf pKW1 noch andere aktive transponierbare Elemente vorhanden sind. Zur Klärung könnte eine simple Methode beitragen, die auch schon von SIMON et al. (1983), KOVACH et al. (1995), LENZ et al. (1994) und HERRMANN et al. (1998) erfolgreich praktiziert wurde. Dabei verwendet man das Plasmid pLU4, ein Abkömmling des broad-host-range Plasmides pBBR1 (KOVACH et al.,

1995), welches das unter bestimmten Bedingungen letale *sacB*-Gen von *Bacillus subtilis* (GAY et al., 1985) trägt. Plasmid pLU4 wird durch Konjugation aus *E. coli* S17-1 in Stamm GJ31 (enthält pKW1) gebracht. Alle entstehenden Transkonjuganten sind resistent gegenüber Piperacillin und sensitiv gegenüber Saccharose. Eine Inaktivierung des *sacB*-Genes, beispielsweise durch Integration eines Transposons könnte durch Selektion nach Saccharose-resistenten Kolonien erfolgen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eine genetische Untersuchung der auf Saccharose überlebenden Stämme erfolgen kann, da mit der Kenntnis der Sequenz von *sacB* gleichzeitig die Sequenz rechts und links vom, in *sacB* insertierten, Transposon bekannt ist. So ließen sich nicht nur relativ schnell Aussagen über die Größe des transponierten Elementes machen, sondern durch beidseitige Ansequenzierung gleichzeitig die Target- und Insertionssequenzen bestimmen und damit Aussagen über die Familienzugehörigkeit des/der Transposons machen.

Durch PCR-Experimente konnte nachgewiesen werden, dass Teile des *tra*-Operons auf dem Fragment liegen, welches in der Mutante offensichtlich herausgetrennt wird. Durch einfache Konjugationsexperimente mit der Mutante QM1 und der Plasmid-freien Mutante von PaW1 (KT2440) könnte geklärt werden, welchen Einfluss die Excision der *tra*-Gene auf die Konjugationsfähigkeit der Mutante QM1 hat. Lassen sich auch mit QM1 Konjugantenstämme erzeugen, in denen QM1 der Donor ist oder verliert Stamm GJ31 mit einem Teil der *tra*-Gene oder dem ganzen *tra*-Operon auch die Fähigkeit, bei Konjugationen als Donor zu fungieren?

Eine interessante Region auf pKW1 ist der Bereich des Transposons Tn5501. Dort wird *tnpA(4)* des IS-Elementes IS1071 durch Insertion von Tn5501 unterbrochen. Da durch PCR-Experimente festgestellt worden ist, dass Tn5501 vollständig auf pKW1 vorliegt, wäre die sich downstream anschließende Sequenz von Tn5501 interessant. Vermutlich folgt dort der rechte Teil des unterbrochenen Gens *tnpA(4)* sowie die rechte komplementäre IR-Sequenz zu IS1071. Vielleicht bildet das in IS1071 integrierte Tn5501 als Vertreter der Klasse-II-Transposons mit den IR-Sequenzen von IS1071, als einem Vertreter der Klasse-I-Transposons, eine neue Gruppe von transponierbaren Elementen, in der die Transposase von Tn5501 die Funktion von TnpA(4) aus IS1071 übernimmt. Solche kombinierten Elemente, allerdings mit umgekehrter Anordnung, in denen ein Klasse-I-Transposon von IS-Sequenzen der Tn3-Familie flankiert wird, wurde von NAKATSU et al. (1991) beobachtet.

Da auch die Sequenz der etwa 14 kbp bis zum sich daran anschließenden *meta*-Operon von Interesse ist, sollte über eine vollständige Sequenzierung von pKW1 nachgedacht werden,

wobei sich für die verbleibenden etwa 150 kbp Nukleotidsequenz die Erstellung einer Cosmid-Bank aufdrängt.

Um die Rolle von CbzE und die Beteiligung des *meta*-Operons, speziell von CbzE(2) beim Abbau unterschiedlicher Substrate zuordnen zu können, wäre die Entwicklung von *knock-out* Mutanten, zum einen von *cbzE* und zum anderen vom Regulator-Gen *gntR* des *meta*-Operons wünschenswert. Ebenso könnte man das gesamte *meta*-Operon oder nur seine katabolischen Gene als Einheit exprimieren, um nähere Informationen zum Substratspektrum und zur Regulation zu erhalten.

Eine weitere offene Frage ist die nach der Lage der genetisch noch nicht identifizierten Gene für die 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase. Sind diese Enzyme Bestandteil eines weiteren *meta*-Operons oder liegen sie, ähnlich wie *cbzE*, *cbzG* oder *cbzJ* vereinzelt auf dem Plasmid bzw. dem Chromosom?

Zum einen lieferten Hitze-Inaktivierungs-Untersuchungen mit Rohextrakt aus GJ31 (KRANZ & ZERLIN, pers. Mit.) erste Hinweise auf die Anwesenheit einer weiteren aktiven 2,3-Dioxygenase, die Bestandteil eines bislang unbekanntem *meta*-Operons sein könnte und folglich auch diese beiden Gene beherbergen könnte. Zum anderen könnten sich die noch nicht identifizierten Gene für die 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase in einem weiteren *meta*-Cluster auf dem Chromosom befinden, der sich vermutlich downstream vom oberen Abbauweg und von *cbzE(3)* anschließt. Einfache PCR-Experimente unter Zuhilfenahme des „Universal GenomeWalker Kit“ könnten hier schnell Aufschluss geben.

Zudem ließe sich durch eine *knock-out*-Mutante im oberen Abbauweg klären, ob es sich bei diesem tatsächlich um den genutzten Weg handelt oder ob ein weiterer vorhanden ist. Ferner gibt es bisher keine Erkenntnisse über den Sinn der Punktmutation in *cbzE(3)*. Ist diese Mutation essentiell, um eine Fehlleitung von Metaboliten zu verhindern oder handelt es sich nur um eine Mutation, welche für GJ31 durch mangelnden Selektionsdruck (aufgrund von mindestens zwei weiteren 2,3-Dioxygenase-Genen *cbzE* und *cbzE(2)* auf dem Plasmid) für den Abbau von Aromaten nicht mehr existentiell ist? Die Frage wird dadurch interessant, da sich in *tecE* aus *Burkholderia* sp. PS12 ebenfalls in der sich dem oberen Abbauweg anschließenden 2,3-Dioxygenase einige Punktmutationen befinden, welche durch einen frame-shift zu vorzeitigen Stop-Codons führen.

Mit Hilfe dieser zahlreichen Ansatzpunkte und den sich daraus ergebenden Informationen sollte es in absehbarer Zeit möglich sein, die genetischen und regulatorischen Eigenschaften des Chlorbenzolabbaus durch Stamm GJ31 exakt zu charakterisieren.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Untersuchung der genetischen Umgebung des für die Säurechlorid-stabile Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase kodierenden Gens *cbzE*, zum anderen die Suche nach weiteren degradativen Genen eines *meta*-Abbauweges sowie eines oberen Abbauweges in *Pseudomonas putida* Stamm GJ31.

- Die Übertragungsrichtung für Hybridstämme, die aus einer ungerichteten Konjugation der Wildtypstämme *Pseudomonas putida* Stamm GJ31 und *Pseudomonas putida* Stamm PaW1 hervorgegangen waren, konnte durch die RAPD-PCR-Methode erfolgreich bestimmt und somit Aussagen über die eingesetzten Stämme bezüglich ihrer Funktion als Donor beziehungsweise Akzeptor beim konjugativen Gentransfer gemacht werden.
- Aus *Pseudomonas putida* Stamm GJ31 konnte ein etwa 180 kbp großes Plasmid isoliert werden. Durch Hybridisierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass das für den Chlorbenzol-Abbau erforderliche Gen *cbzE* auf einem 2,4 kbp großem *SspI*-Fragment des Plasmides lokalisiert ist. Durch sogenanntes „Benzoat-Curing“ konnten Chlorbenzol-negative Derivate CB<sup>-</sup> von Stamm GJ31 erhalten werden. Hybridisierungsexperimente mit *cbzE* als Sonde machten deutlich, dass *cbzE* in diesen Derivaten nicht mehr vorhanden ist. PCR-Experimente mit Primern aus *cbzE* bestätigten diesen Befund.
- Mithilfe von PCR-Verfahren konnte ein Bereich von etwa 6,3 kbp upstream und 11,0 kbp downstream von *cbzE* kloniert und sequenziert werden. Aus der Sequenzanalyse ergab sich, dass upstream von *cbzE* ein Teil eines Transfer-Operons mit den offenen Leserahmen *traNEOFG* gefolgt von einer Transposase *tnpA(1)* angeordnet ist. Downstream von *cbzE* folgen die offenen Leserahmen *cbzG*, *GST*, *tnpA(2)*, *cbzJ*, die für die Genprodukte 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, Gluthation S-Transferase, Transposase und 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase kodieren. Die sich daran anschließende Sequenz besitzt eine sehr große Ähnlichkeit mit dem Transposon Tn5501.

- Auf dem Plasmid konnten mehrere, in Form eines Clusters vorliegende Gene eines *meta*-Weges lokalisiert und sequenziert werden. Diese bilden vermutlich mit einem vorangestellten, entgegengesetzt transkribierten Regulatorgen aus der *gntR*-Familie ein Operon, das große Homologien zu Operons des dioxygenolytischen Abbaus von 3-Phenylpropionsäure aus *E. coli* K12 und *Comamonas testosteroni* Stamm TA441 aufweist. Auf dem 9632 bp großen Fragment konnten die folgenden zehn neuen offenen Leserahmen ORF1, ORF2, *cbzK*, *cbzQ*, *cbzJ*, *cbzF*, *cbzE(2)*, *gntR*, ORF3, ORF4 identifiziert werden. Dabei kodieren die offenen Leserahmen ORF1 und ORF2 vermutlich für ein Porin und ein Transporter-Protein für 4-Hydroxybenzoat. Die Gene des *meta*-Weges *cbzKQJFE(2)* kodieren für 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase (*cbzK*), Acetaldehyd-Dehydrogenase (*cbzQ*), 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase (*cbzJ(2)*), 2-Hydroxy-6-ke-tonona-2,4-dienoat-Hydrolase (*cbzF*) und die *meta*-spaltende 2,3-Dihydroxyphenylpropionat-1,2-Dioxygenase (*cbzE(2)*). Das Gen *gntR* kodiert vermutlich für einen Transkriptions-Aktivator aus der *gntR*-Familie. Die Funktionen der offenen Leserahmen ORF3 und ORF4 sind zur Zeit unbekannt.
- Durch Hybridisierungsexperimente konnte nicht nur die Zugehörigkeit von *cbzE* und des gefundenen *meta*-Operons zum Plasmid, sondern auch die räumliche Nähe und die Orientierung dieser beiden Gen-Abschnitte zueinander durch eine Restriktionskartierung ermittelt werden.
- Die degradativen Gene *cbzG* (2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase), *cbzJ* und *cbzJ(2)* (2-Keto-4-pentenoat-Hydratase), *cbzE(2)* (Catechol-2,3-Dioxygenase), *cbzF* (2-Hydroxy-6-ke-tonona-2,4-dienoat-Hydrolase), *cbzQ* (Acetaldehyd-Dehydrogenase) konnten erfolgreich exprimiert werden und somit ihre aufgrund von Sequenzvergleichen zugeschriebenen Funktionen durch enzymatische Untersuchungen bestätigt werden.
- Ferner wurde ein 5493 bp großes Fragment kloniert und sequenziert, auf dem die folgenden sechs neuen offenen Leserahmen *cbzAa*, *cbzAb*, *cbzAc*, *cbzAd*, *cbzB* und *cbzE(3)* identifiziert werden konnten. Sequenzvergleiche zeigten, dass die Gene *cbzAaAbAcAd* für die vier Untereinheiten des Multienzym-Komplexes der Chlorbenzol-Dioxygenase kodieren, während *cbzB* die dazu korrespondierende *cis*-Dihydrodiol-Dehydrogenase verschlüsselt. Die Dioxygenase *cbzE(3)* liegt als unterbrochener Leserahmen mit einer Rasterschubmutation vor, vergleichbar mit den Dioxygenasen-Genen *todE* aus *Pseudo-*

*monas putida* Stamm F1 und *tecE* aus *Burkholderia* sp. Stamm PS12. Die Gene und Genprodukte sind eng verwandt mit denen für den Toluol- (*todC1C2BADE*) und Benzol-Abbau (*bedC1C2BA* und *bznABCD*) und entfernt verwandt zu denen für den Abbau von Biphenyl, Naphthalin und Benzoat.

Hybridisierungsexperimente mit *cbzB* als Sonde machten deutlich, dass dieser Gencluster im Gegensatz zu den beiden anderen plasmidisch kodierten Clustern nur auf dem Genom vorhanden ist.

## 6 Literatur

Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE.  
DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting.

*Nucleic Acids Res.* **20**, 5137-42 (1992 a)

Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Berg DE.  
PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*.

*Nucleic Acids Res.* **20**, 6221-5 (1992 b)

Alijah R, Schwartz D, Nussbaumer B, Pelzer S, Wohlleben W.  
The peptide synthetase gene *phsA* from *Streptomyces viridochromogenes* is not juxtaposed with other genes involved in nonribosomal biosynthesis of peptides.

*Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 570-7 (1996)

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.  
Basic local alignment search tool.

*J. Mol. Biol.* **215**, 403-10 (1990)

Anderson WF, Ohlendorf DH, Takeda Y, Matthews BW.  
Structure of the Cro repressor from bacteriophage lambda and its interaction with DNA.

*Nature* **290**, 754-8 (1981)

Anderson JE, Ptashne M, Harrison SC.  
Structure of the repressor-operator complex of bacteriophage 434.

*Nature* **326**, 846-52 (1987)

Arai H, Yamamoto T, Ohishi T, Shimizu T, Nakata T, Kudo T.  
Genetic organization and characteristics of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid degradation pathway of *Comamonas testosteroni* TA441.

*Microbiology* **145**, 2813-20 (1999)

Arai H, Ohishi T, Chang MY, Kudo T.  
Arrangement and regulation of the genes for *meta*-pathway enzymes required for degradation of phenol in *Comamonas testosteroni* TA441.

*Microbiology* **146**, 1707-15 (2000)

Arensdorf JJ, Focht DD.  
Formation of chlorocatechol *meta* cleavage products by a pseudomonad during metabolism of monochlorobiphenyls.

*Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2884-9 (1994)

- Arendsdorf JJ, Focht DD.  
A *meta* cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 443-7 (1995)
- Arnheim N, Erlich H.  
Polymerase chain reaction strategy.  
*Annu. Rev. Biochem.* **61**, 131-56 (1992)
- Assinder SJ, Williams PA.  
The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes.  
*Adv. Microb. Physiol.* **31**, 1-69 (1990)
- Asturias JA, Eltis LD, Prucha M, Timmis KN.  
Analysis of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases found in *Rhodococcus globerulus* P6. Identification of a new family of extradiol dioxygenases.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 7807-15 (1994)
- Barnes MR, Duetz WA, Williams PA.  
A 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid catabolic pathway in *Rhodococcus globerulus* PWD1: cloning and characterization of the *hpp* operon.  
*J. Bacteriol.* **179**, 6145-53 (1997)
- Barry T, Powell R, Gannon F.  
A general method to generate DNA probes for microorganisms.  
*Biotechnology (NY)* **8**, 233-6 (1990)
- Bartels I, Knackmuss HJ, Reineke W.  
Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halo-catechols.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 500-5 (1984)
- Bartels F, Backhaus S, Moore ER, Timmis KN, Hofer B.  
Occurrence and expression of glutathione-S-transferase-encoding *bphK* genes in *Burkholderia* sp. strain LB400 and other biphenyl-utilizing bacteria.  
*Microbiology* **145**, 2821-34 (1999)
- Batie CJ, LaHaie E, Ballou DP.  
Purification and characterization of phthalate oxygenase and phthalate oxygenase reductase from *Pseudomonas cepacia*.  
*J. Biol. Chem.* **262**, 1510-8 (1987)
- Bayley SA, Duggleby CJ, Worsey MJ, Williams PA, Hardy KG, Broda P.  
Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2.  
*Mol. Gen. Genet.* **154**, 203-4 (1977)
- Bayly RC, Dagley S.  
Oxoenoic acids as metabolites in the bacterial degradation of catechols.  
*Biochem. J.* **111**, 303-7 (1969)

- Bayly RC, Wigmore GJ.  
Metabolism of phenol and cresols by mutants of *Pseudomonas putida*.  
*J. Bacteriol.* **113**, 1112-20 (1973)
- Beil S, Happe B, Timmis KN, Pieper DH.  
Genetic and biochemical characterization of the broad spectrum chlorobenzene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain PS12 - dechlorination of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene.  
*Eur. J. Biochem.* **247**, 190-9 (1997)
- Beil S, Timmis KN, Pieper DH.  
Genetic and biochemical analyses of the *tec* operon suggest a route for evolution of chlorobenzene degradation genes.  
*J. Bacteriol.* **181**, 341-6 (1999)
- Berg D, Howe M.  
Mobile DNA. *Am. Soc. Microbiol. Publ.*, Washington, DC (1989)
- Bill E, Bernhardt FH, Trautwein AX.  
Mossbauer studies on the active Fe ... [2Fe-2S] site of putidamonooxin, its electron transport and dioxygen activation mechanism.  
*Eur. J. Biochem.* **121**, 39-46 (1981)
- Birnboim HC, Doly J.  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
*Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-23 (1979)
- Blomqvist K, Nikkola M, Lehtovaara P, Suihko ML, Airaksinen U, Straby KB, Knowles JK, Penttila ME.  
Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*.  
*J. Bacteriol.* **175**, 1392-404 (1993)
- Bonen L, Doolittle WF, Fox GE.  
Cyanobacterial evolution: results of 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses.  
*Can. J. Biochem.* **57**, 879-88 (1979)
- Boronin AM, Tsoi TV, Kosheleva IA, Arinbasarov MU, Adanin VM.  
Cloning of *Pseudomonas putida* genes responsible for the primary stages of oxidation of naphthalene in *Escherichia coli* cells  
*Genetika* **25**, 226-37 (1989)
- Bradford MM.  
A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prinziple of protein-dye binding  
*Anal. Biochem.* **72**, 248-54 (1976)
- Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Huge-Jensen B, Norskov L.  
A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase.  
*Nature* **343**, 767-70 (1990)

- Bugg T.D.  
Overproduction, purification and properties of 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli*.  
*Biochim. Biophys. Acta* **1202**, 258-64 (1993)
- Burlingame R, Chapman PJ.  
Catabolism of phenylpropionic acid and its 3-hydroxy derivative by *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol.* **155**, 113-21 (1983)
- Burlingame RP, Wyman L, Chapman PJ.  
Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants defective for phenylpropionate degradation.  
*J. Bacteriol.* **168**, 55-64 (1986)
- Carrington B, Lowe A, Shaw LE, Williams PA.  
The lower pathway operon for benzoate catabolism in biphenyl-utilizing *Pseudomonas* sp. strain IC and the nucleotide sequence of the *bphE* gene for catechol 2,3-dioxygenase.  
*Microbiology* **140**, 499-508 (1994)
- Casse F, Boucher C, Julliot JS, Michel M, Dénarie J.  
Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis.  
*J. Gen. Microbiol.* **113**, 229-42 (1979)
- Catelani D, Sorlini C, Treccani V.  
The metabolism of biphenyl by *Pseudomonas putida*.  
*Experientia* **27**, 1173-4 (1971)
- Chakrabarty A, Palchaudhuri S.  
Isolation of plasmid deoxyribonucleic acid from *Pseudomonas putida*.  
*J. Bacteriol.* **126**, 410-6 (1976)
- Chaudhry GR, Chapadamugu S.  
Biodegradation of halogenated organic compounds.  
*Microbiol. Rev.* **55**, 59-79 (1991)
- Chomczynski P.  
One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA.  
*Anal. Biochem.* **201**, 134-9 (1992)
- Collinsworth WL, Chapman PJ, Dagley S.  
Stereospecific enzymes in the degradation of aromatic compounds by *Pseudomonas putida*.  
*J. Bacteriol.* **113**, 922-31 (1973)
- Commandeur LCM, Parsons JR.  
Degradation of halogenated aromatic compounds.  
*Biodegradation* **1**, 207-20 (1990)
- Craig NL.  
Tn7: a target site-specific transposon.  
*Mol. Microbiol.* **5**, 2569-73 (1991)

- Crutcher SE, Geary PJ.  
Properties of the iron-sulphur proteins of the benzene dioxygenase system from *Pseudomonas putida*.  
*Biochem. J.* **177**, 393-400 (1979)
- Dagley S, Gibson DT.  
The bacterial degradation of catechol.  
*Biochem. J.* **95**, 466-74 (1965)
- Dany AL, Douki T, Triantaphylides C, Cadet J.  
Repair of the main UV-induced thymine dimeric lesions within *Arabidopsis thaliana* DNA: evidence for the major involvement of photoreactivation pathways.  
*J. Photochem. Photobiol. B* **65**, 127-35 (2001)
- Davidson E, Ohnishi T, Atta-Asafo-Adjei E, Daldal F.  
Potential ligands to the [2Fe-2S] Rieske cluster of the cytochrome bc1 complex of *Rhodobacter capsulatus* probed by site-directed mutagenesis.  
*Biochemistry* **31**, 3342-51 (1992)
- de Lorenzo V, Herrero M, Metzke M, Timmis KN.  
An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the sigma 54-dependent Pu promoter of TOL plasmid.  
*EMBO J.* **10**, 1159-67 (1991)
- Dehmel U, Engesser KH, Timmis KN, Dwyer DF.  
Cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding a novel dioxygenase involved in metabolism of carboxydiphenyl ethers in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310.  
*Arch. Microbiol.* **163**, 35-41 (1995)
- Derewenda ZS, Derewenda U.  
Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases.  
*Biochem. Cell Biol.* **69**, 842-51 (1991)
- Don RH, Pemberton JM.  
Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*.  
*J. Bacteriol.* **145**, 681-6 (1981)
- Dorn E, Knackmuss HJ.  
Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad.  
*Biochem. J.* **174**, 73-84 (1978 a)
- Dorn E, Knackmuss HJ.  
Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol.  
*Biochem. J.* **174**, 85-94 (1978 b)

- Dorn E, Hellwig M, Reineke W, Knackmuss HJ.  
Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad.  
*Arch. Microbiol.* **99**, 61-70 (1974)
- Duggleby RG.  
Experimental designs for estimating the kinetic parameters for enzyme-catalysed reactions.  
*J. Theor. Biol.* **21**, 671-84 (1979)
- Egner C, Berg DE.  
Excision of transposon Tn5 is dependent on the inverted repeats but not on the transposase function of Tn5.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 459-63 (1981)
- Eltis LD, Bolin JT.  
Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases.  
*J. Bacteriol.* **178**, 5930-7 (1996)
- Ensley BD, Gibson DT.  
Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component.  
*J. Bacteriol.* **155**, 505-11 (1983)
- Environmental Pollution Agency  
Water-related environmental fate of 129 priority pollutants, Volume II, US-EPA Rpt. EPA-440/4-79-029b, Washington DC. (1979)
- Environmental Pollution Agency  
Health assessment document for chlorinated benzenes, US-EPA Rpt. EPA/600/8-84/015F, Washington DC. (1985)
- Erickson BD, Mondello FJ.  
Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400.  
*J. Bacteriol.* **174**, 2903-12 (1992)
- Evans WC, Gaunt JK.  
Metabolism of 4-chloro-2-methylphenoxyacetate by a soil pseudomonad. Preliminary evidence for the metabolic pathway.  
*Biochem. J.* **122**, 519-26 (1971)
- Faelen M, Toussaint A.  
Inversions induced by bacteriophage Mu-1 in the chromosome of *E. coli* K12.  
*J. Bacteriol.* **143**, 1029-30 (1980)
- Fetherston JD, Bearden SW, Perry RD.  
YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor.  
*Mol. Microbiol.* **22**, 315-25 (1996)
- Firth N, Skurray R.  
Characterization of the F plasmid bifunctional conjugation gene, *traG*.  
*Mol. Gen. Genet.* **232**, 145-53 (1992)

- Fong KP, Goh CB, Tan HM.  
Characterization and expression of the plasmid-borne *bedD* gene from *Pseudomonas putida* ML2, which codes for a NAD<sup>+</sup>-dependent *cis*-benzene dihydrodiol dehydrogenase.  
*J. Bacteriol.* **178**, 5592-601 (1996)
- Fong KP, Goh CB, Tan HM.  
The genes for benzene catabolism in *Pseudomonas putida* ML2 are flanked by two copies of the insertion element *IS1489*, forming a class-I-type catabolic transposon, Tn5542.  
*Plasmid* **43**, 103-10 (2000)
- Franklin FCH, Bagdasarian M, Bagdasarian MM, Timmis KN.  
Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7458-62 (1981)
- Freier RK.  
Wasseranalyse  
Chemische, physiko-chemische und radio-chemische Untersuchungsverfahren.  
2. Auflage, S. 45-6; W. de Gruyter, Berlin, New York (1974)
- Friedberg D, Rosenthal ER, Jones JW, Calvo JM.  
Characterization of the 3' end of the leucine operon of *Salmonella typhimurium*.  
*Mol. Gen. Genet.* **199**, 486-94 (1985)
- Fukumori F, Saint CP.  
Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1).  
*J. Bacteriol.* **179**, 399-408 (1997)
- Fukumori F, Saint CP.  
Aniline degradation in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1): Initial characterization of its conversion to catechol.  
Unpublished GenBank Accession number: D85415
- Furukawa K, Miyazaki T.  
Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*.  
*J. Bacteriol.* **166**, 392-8 (1986)
- Galas DJ, Chandler M.  
Bacterial insertion sequences: In *Mobile DNA*.  
Berg DE, Howe MM. (eds) Washington, DC:  
*American Society for Microbiology*, 109-62 (1989)
- Gallegos MT, Michan C, Ramos JL.  
The XylS/AraC family of regulators.  
*Nucleic Acids Res.* **21**, 807-10 (1993)
- Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K, Ramos JL.  
Arac/XylS family of transcriptional regulators.  
*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 393-410 (1997)

- Gay P, leCoq D, Steinmetz M, Berkelmann T, Kado CI  
Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria.  
*J. Bacteriol.* **164**, 918-21 (1985)
- Gill R, Heffron F, Dougan G, Falkow S.  
Analysis of sequences transposed by complementation of two classes of transposition-deficient mutants of Tn3.  
*J. Bacteriol.* **136**, 742-56 (1978)
- Gill GS, Hull RC, Curtiss R 3rd.  
Mutator bacteriophage D108 and its DNA; an electron microscopic characterisation.  
*J. Virol.* **37**, 420-30 (1981)
- Giovannoni SJ, Turner S, Olsen GJ, Barns S, Lane DJ, Pace NR.  
Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts.  
*J. Bacteriol.* **170**, 3584-92 (1988)
- Gish W, States DJ.  
Identification of protein coding regions by database similarity search.  
*Nat. Genet.* **3**, 266-72 (1993)
- Goldberg JB, Won J, Ohman DE.  
Precise excision and instability of the transposon Tn5 in *Pseudomonas aeruginosa*.  
*J. Gen. Microbiol.* **136**, 789-96 (1990)
- Goyal AK, Zylstra GJ.  
Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 230-6 (1996)
- Greated A, Lambertson L, Williams PA and Thomas CM.  
Complete nucleotide sequence of IncP-9 plasmid pWW0.  
Accessions-Nummer: AJ344068 (2002)
- Greenblatt J, Schleif R.  
Arabinose C protein: regulation of the arabinose operon *in vitro*.  
*Nat. New Biol.* **233**, 166-70 (1971)
- Grindley ND, Reed RR.  
Transpositional recombination in prokaryotes.  
*Annu. Rev. Biochem.* **54**, 863-96 (1985)
- Gurbiel RJ, Batie CJ, Sivaraja M, True AE, Fee JA, Hoffman BM, Ballou DP.  
Electron-nuclear double resonance spectroscopy of <sup>15</sup>N-enriched phthalate dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* proves that two histidines are coordinated to the [2Fe-2S] Rieske-type clusters.  
*Biochemistry* **28**, 4861-71 (1989)

- Haddock JD, Gibson DT.  
Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400.  
*J. Bacteriol.* **177**, 5834-9 (1995)
- Haigler BE, Spain JC.  
Degradation of p-chlorotoluene by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain JS6.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 372-9 (1989)
- Hallet B, Sherrat DJ.  
Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut and paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements.  
*FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 157-78 (1997)
- Hallet B, Rezsöházy R, Mahillon J, Delcour J.  
IS231A insertion specificity: consensus sequence and DNA bending at the target site.  
*Mol. Microbiol.* **14**, 131-9 (1994)
- Han S, Eltis LD, Timmis KN, Muchmore SW, Bolin JT.  
Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading pseudomonad.  
*Science* **270**, 976-80 (1995)
- Hanahan D.  
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.  
*J. Mol. Biol.* **166**, 557-80 (1983)
- Harayama S, Rekik M.  
Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families.  
*J. Biol. Chem.* **264**, 15328-33 (1989)
- Harayama S, Rekik M.  
The *meta* cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes.  
*Mol. Gen. Genet.* **221**, 113-20 (1990)
- Harayama S, Rekik M. (1993)  
Comparison of the nucleotide sequences of the *meta*-cleavage pathway genes of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* with other *meta*-cleavage genes suggests that both single and multiple nucleotide substitutions contribute to enzyme evolution.  
*Mol. Gen. Genet.* **239**, 81-9 (1993)
- Harayama S, Rekik M, Timmis KN.  
Genetic analysis of a relaxed substrate specificity aromatic ring dioxygenase, toluate 1,2-dioxygenase, encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida*.  
*Mol. Gen. Genet.* **202**, 226-34 (1986)
- Harayama S, Mermoud N, Rekik M, Lehrbach PR, Timmis KN.  
Roles of the divergent branches of the *meta*-cleavage pathway in the degradation of benzoate and substituted benzoates.  
*J. Bacteriol.* **169**, 558-64 (1987)

- Harayama S, Rekik M, Ngai KL, Ornston LN.  
Physically associated enzymes produce and metabolize 2-hydroxy-pent-2,4-dienoate, a chemically unstable intermediate formed in catechol metabolism via *meta* cleavage in *Pseudomonas putida*.  
*J. Bacteriol.* **171**, 6251-8 (1989)
- Harayama S, Rekik M, Wubbolts M, Rose K, Leppik RA, Timmis KN.  
Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products.  
*J. Bacteriol.* **171**, 5048-55 (1989)
- Hartmann J, Reineke W, Knackmuss HJ.  
Metabolism of 3-chloro-, 4-chloro and 3,5-dichlorobenzoate by a pseudomonad.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 421-8 (1979)
- Hayase N, Taira K, Furukawa K.  
*Pseudomonas putida* KF715 *bphABCD* operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning, analysis, and expression in soil bacteria.  
*J. Bacteriol.* **172**, 1160-4 (1990)
- Hayes JD, Pulford DJ.  
The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.  
*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 445-600 (1995)
- Heinaru E, Peters M, Talpsep E, Wand H, Stottmeister U, Heinaru A, Nurk A.  
Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different indigenous *Pseudomonas* species.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4899-906 (1997)
- Herrmann H, Lauf U, Müller C.  
The transposable elements resident on the plasmids of *Pseudomonas putida* strain H, Tn5501 and Tn5502, are cryptic transposons of the Tn3 family.  
*Mol. Gen. Genet.* **259**, 674-8 (1998)
- Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R.  
CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment.  
*Comput. Appl. Biosci.* **8**, 189-91 (1992)
- Higson FK, Focht DD.  
Degradation of 2-methylbenzoic acid by *Pseudomonas cepacia* MB2.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 194-200 (1992)
- Hofer B, Backhaus S, Timmis KN.  
The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (*bph*) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes.  
*Gene* **144**, 9-16 (1994)
- Hollender J, Dott W, Hopp J.  
Regulation of chloro- and methylphenol degradation in *Comamonas testosteroni* JH5.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2330-8 (1994)

- Holmes DS, Quigley M.  
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.  
*Anal. Biochem.* **114**, 193-7 (1981)
- Hoover TR, Robertson AD, Cerny RL, Hayes RN, Imperial J, Shah VK, Ludden PW.  
Identification of the V factor needed for synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitro-  
genase as homocitrate.  
*Nature* **329**, 855-7 (1987)
- Hugo N, Armengaud J, Gaillard J, Timmis KN, Jouanneau Y.  
A novel -2Fe-2S- ferredoxin from *Pseudomonas putida* mt2 promotes the reductive  
reactivation of catechol 2,3-dioxygenase.  
*J. Biol. Chem.* **273**, 9622-9 (1998)
- Hugo N, Meyer C, Armengaud J, Gaillard J, Timmis KN, Jouanneau Y.  
Characterization of three XylT-like [2Fe-2S] ferredoxins associated with catabolism of cre-  
sols or naphthalene: evidence for their involvement in catechol dioxygenase reactivation.  
*J. Bacteriol.* **182**, 5580-5 (2000)
- Hull RA, Gill GS, Curtiss R 3rd.  
Genetic characterization of Mu-like bacteriophage D108.  
*J. Virol.* **27**, 513-8 (1978)
- Inouye S, Nakazawa A, Nakazawa T.  
Molecular cloning of TOL genes *xylB* and *xylE* in *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol.* **145**, 1137-43 (1981)
- Irie S, Doi S, Yorifuji T, Takagi M, Yano K.  
Nucleotide sequencing and characterization of the genes encoding benzene oxidation  
enzymes of *Pseudomonas putida*.  
*J. Bacteriol.* **169**, 5174-9 (1987)
- Jiang H, Parales RE, Lynch NA, Gibson DT  
Site-directed mutagenesis of conserved amino acids in the alpha subunit of toluene dioxy-  
genase: potential mononuclear non-heme iron coordination sites.  
*J. Bacteriol.* **178**, 3133-9 (1996)
- Johansson J, Fleetwood L, Jornvall H.  
Cysteine reactivity in sorbitol and aldehyde dehydrogenases. Differences towards the pattern  
in alcohol dehydrogenase.  
*FEBS Lett.* **303**, 1-3 (1992)
- Kabisch M, Fortnagel P.  
Nucleotide sequence of the metapyrocatechase II (catechol 2,3-oxygenase II) gene *mpcII*  
from *Alcaligenes eutrophus* JMP 222.  
*Nucleic Acids Res.* **18**, 5543 (1990)
- Kado CI, Liu ST.  
Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids.  
*J. Bacteriol.* **145**, 1365-73 (1981)

- Kallastu A, Horak R, Kivisaar M.  
Identification and characterization of *IS1411*, a new insertion sequence which causes transcriptional activation of the phenol degradation genes in *Pseudomonas putida*.  
*J. Bacteriol.* **180**, 5306-12 (1998)
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S.  
Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*.  
*DNA Res.* **7**, 331-8 (2000)
- Kaschabek SR, Reineke W.  
Maleylacetate reductase of *Pseudomonas* sp. strain B13: dechlorination of chloromaleylacetates, metabolites in the degradation of chloroaromatic compounds.  
*Arch. Microbiol.* **158**, 412-7 (1992)
- Kaschabek SR, Kasberg T, Müller D, Mars AE, Janssen DB, Reineke W.  
Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31.  
*J. Bacteriol.* **180**, 296-302 (1998)
- Kasuga K, Nojiri H, Yamane H, Kodama T, Omori T.  
Cloning and characterization of the genes involved in the degradation of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DBF63.  
*J. Ferment. Bioeng.* **84**, 387-99 (1997)
- Kayser KJ, Daram A, Abassian J, Kilbane JJ.  
Isolation and characterization of a carbazole-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. GTIN11.  
Unpublished GenBank Accession number: AF442494
- Kazusa DNA Research Institute, Japan  
[www.kazusa.or.jp/codon/](http://www.kazusa.or.jp/codon/)
- Keil H, Keil S, Pickup RW, Williams PA.  
Evolutionary conservation of genes coding for *meta* pathway enzymes within TOL plasmids pWW0 and pWW53.  
*J. Bacteriol.* **164**, 887-95 (1985 a)
- Keil H, Lebens MR, Williams PA.  
TOL plasmid pWW15 contains two nonhomologous, independently regulated catechol 2,3-oxygenase genes.  
*J. Bacteriol.* **163**, 248-55 (1985 b)
- Keller JW, Baurick KB, Rutt GC, O'Malley MV, Sonafrank NL, Reynolds RA, Ebbesson LO, Vajdos FF.  
*Pseudomonas cepacia* 2,2-dialkylglycine decarboxylase. Sequence and expression in *Escherichia coli* of structural and repressor genes.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 5531-9 (1990)

- Kesarwani M, Azam M, Natarajan K, Mehta A, Datta A.  
Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato.  
*J. Biol. Chem.* **275**, 7230-38 (2000)
- Kikuchi Y, Yasukochi Y, Nagata Y, Fukuda M, Takagi M.  
Nucleotide sequence and functional analysis of the *meta*-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102.  
*J. Bacteriol.* **176**, 4269-76 (1994 a)
- Kikuchi Y, Nagata Y, Hinata M, Kimbara K, Fukuda M, Yano K, Takagi M.  
Identification of the *bphA4* gene encoding ferredoxin reductase involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102.  
*J. Bacteriol.* **176**, 1689-94 (1994 b)
- Kimbara K, Hashimoto T, Fukuda M, Koana T, Takagi M, Oishi M, Yano K.  
Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxy-biphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102.  
*J. Bacteriol.* **171**, 2740-7 (1989)
- Klecka GM, Gibson DT.  
Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1159-65 (1981)
- Kleckner N, Chan RK, Tye BK, Botstein D.  
Mutagenesis by insertion of a drug-resistance element carrying an inverted repetition.  
*J. Mol. Biol.* **97**, 561-75 (1975)
- Klimke WA, Frost LS.  
Genetic analysis of the role of the transfer gene, *traN*, of the F and R100-1 plasmids in mating pair stabilization during conjugation.  
*J. Bacteriol.* **180**, 4036-43 (1998)
- Knackmuss HJ, Hellwig M, Lackner H, Otting W.  
Cometabolism of 3-methylbenzoate and methylcatechols by a 3-chlorobenzoate utilizing *Pseudomonas*: accumulation of (+)-2,5-dihydro-4-methyl- and (+)-2,5-dihydro-2-methyl-5-oxo-furan-2-acetic acid.  
*Eur. J. Appl. Microbiol.* **2**, 267-76 (1976)
- Knackmuss HJ.  
Degradation of halogenated and sulfonated hydrocarbons, S. 189-212. In: Leisinger T, Cook AM, Hüttner R, Nüesch J.  
Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds.  
Academic Press, London, United Kingdom (1981)
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM.  
Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes.  
*Gene* **166**, 175-6 (1995)

- Kulakov LA, Delcroix VA, Larkin MJ, Ksenzenko VN, Kulakova AN.  
Cloning of new *Rhodococcus* extradiol dioxygenase genes and study of their distribution in different *Rhodococcus* strains.  
*Microbiology* **144**, 955-63 (1998)
- Kunz DA, Chapman PJ.  
Isolation and characterization of spontaneously occurring TOL plasmid mutants of *Pseudomonas putida* HS1.  
*J. Bacteriol.* **146**, 952-64 (1981)
- Kurkela S, Lehvaslaiho H, Palva ET, Teeri TH.  
Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816.  
*Gene* **73**, 355-62 (1988)
- Lauf U, Müller C, Herrmann H.  
Identification and characterisation of IS1383, a new insertion sequence isolated from *Pseudomonas putida* strain H.  
*FEMS Microbiol. Lett.* **170**, 407-12 (1999)
- Laurie AD, Lloyd-Jones G.  
The *phn* genes of *Burkholderia* sp. Strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism.  
*J. Bacteriol.* **181**, 531-40 (1999)
- Lehrbach PR, Timmis KN.  
Genetic analysis and manipulation of catabolic pathways in *Pseudomonas*.  
*Biochem. Soc. Symp.* **48**, 191-219 (1983)
- Lenz O, Schwartz E, Dervede J, Eitinger M, Friedrich B.  
The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation.  
*J. Bacteriol.* **176**, 4385-93 (1994)
- Li WH, Tan Y.  
Trichromatic vision in prosimians.  
*Nature* **402**, 36 (1999)
- Li Z, Hiasa H, Kumar U, DiGate RJ.  
The *traE* gene of plasmid RP4 encodes a homologue of *Escherichia coli* DNA topoisomerase III.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 19582-7 (1997)
- Li DY, Eberspächer J, Wagner B, Kuntzer J, Lingens F.  
Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Azotobacter* sp. strain GP1.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1920-8 (1991)
- Mampel J, Providenti MA, Cook AM.  
Protocatechuate 4,5-dioxygenase of *Comamonas testosteroni* T-2 and other Proteobacteria: a new subgroup of class III extradiol dioxygenases.  
Unpublished GenBank Accession number: AF459635

- Maniatis RT, Fritsch EF, Sambrook J.  
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)
- Mannervik B.  
The isoenzymes of glutathione transferase.  
*Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **57**, 357-417 (1985)
- Markus A, Krekel D, Lingens F.  
Purification and some properties of component A of the 4-chlorophenylacetate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas* species strain CBS.  
*J. Biol. Chem.* **261**, 12883-8 (1986)
- Marques S, Ramos JL.  
Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways.  
*Mol. Microbiol.* **9**, 923-9 (1993)
- Mars AE, Kasberg T, Kaschabek SR, van Agteren MH, Janssen DB, Reineke W.  
Microbial degradation of chloroaromatics: use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene.  
*J. Bacteriol.* **179**, 4530-7 (1997)
- Mars AE, Kingma J, Kaschabek SR, Reineke W, Janssen DB.  
Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31.  
*J. Bacteriol.* **181**, 1309-18 (1999)
- Martinez MB, Flickinger MC, Nelsestuen GL.  
Accurate kinetic modeling of alkaline phosphatase in the *Escherichia coli* periplasm: implications for enzyme properties and substrate diffusion.  
*Biochemistry* **35**, 1179-86 (1996)
- Masai E, Yamada A, Healy JM, Hatta T, Kimbara K, Fukuda M, Yano K.  
Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2079-85 (1995)
- Masepohl B, Angermüller S, Hennecke S, Hubner P, Moreno-Vivian C, Klipp W.  
Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Rhodobacter capsulatus* ORF6-*nifUI* SVW gene region: possible role of NifW in homocitrate processing.  
*Mol. Gen. Genet.* **238**, 369-82 (1993)
- Mason JR, Cammack R.  
The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases.  
*Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 277-305 (1992)
- Master ER, Mohn WW.  
Induction of *bphA*, encoding biphenyl dioxygenase, in two polychlorinated biphenyl-degrading bacteria, psychrotolerant *Pseudomonas* strain Cam-1 and mesophilic *Burkholderia* strain LB400.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2669-76 (2001)

- McClure NC, Saint CP, Weightman AS.  
Nucleotide sequence of 3-Methylcatechol 2,3-dioxygenase gene *tdnC* from *Pseudomonas putida* UCC2.  
Unpublished GenBank Accession number: X59790
- McClure NC, Venables WA.  
Adaptation of *Pseudomonas putida* mt-2 to growth on aromatic amines.  
*J. Gen. Microbiol.* **132**, 2209-18 (1986)
- McClure NC, Venables WA.  
pTDN1, a catabolic plasmid involved in aromatic amine catabolism in *Pseudomonas putida* mt-2.  
*J. Gen. Microbiol.* **133**, 2073-7 (1987)
- Mendiola MV, de la Cruz F.  
Specificity of insertion of IS91, an insertion sequence present in alpha-haemolysin plasmids of *Escherichia coli*.  
*Mol. Microbiol.* **3**, 979-84 (1989)
- Miller JH.  
Experiments in molecular genetics.  
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor, 433 (1972)
- Mise K.  
Isolation and characterization of a new generalized transducing bacteriophage different from P1 in *Escherichia coli*.  
*J. Virol.* **7**, 168-75 (1971)
- Mori I, Benian GM, Moerman DG, Waterston RH.  
Transposable element Tc1 of *Caenorhabditis elegans* recognizes specific target sequences for integration.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 861-4 (1988)
- Morisato D, Kleckner N.  
Transposase promotes double strand breaks and single strand joints at Tn10 termini *in vivo*.  
*Cell* **39**, 181-90 (1984)
- Müller D, Schlömann M, Reineke W.  
Maleylacetate reductases in chloroaromatic-degrading bacteria using the modified *ortho* pathway: comparison of catalytic properties.  
*J. Bacteriol.* **178**, 298-300 (1996)
- Murray K, Duggleby CJ, Sala-Trepat JM, Williams PA.  
The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the *meta*-cleavage pathway by *Pseudomonas arvilla* mt-2.  
*Eur. J. Biochem.* **28**, 301-10 (1972)
- Murray K, Sala-Trepat JM, Williams PA.  
The divergent *meta*-cleavage pathway for the metabolism of benzoate, 3-methylbenzoate and 4-methylbenzoate by *Pseudomonas arvilla* mt-2.  
*Biochem. J.* **128**, 89-90 (1972 a)

- Murray K, Duggleby CJ, Sala-Trepat JM, Williams PA.  
The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the *meta*-cleavage pathway by *Pseudomonas arvilla* mt-2.  
*Eur. J. Biochem.* **28**, 301-10 (1972 b)
- Nakatsu C, Ng J, Singh R, Straus N, Wyndham C.  
Chlorobenzoate catabolic transposon Tn5271 is a composite class I element with flanking class II insertion sequences.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8312-6 (1991)
- Nakatsu CH, Straus NA, Wyndham RC.  
The nucleotide sequence of the Tn5271 3-chlorobenzoate 3,4-dioxygenase genes (*cbaAB*) unites the class IA oxygenases in a single lineage.  
*Microbiology* **141**, 485-95 (1995)
- Nakazawa T, Inouye S, Nakazawa A.  
Physical and functional mapping of RP4-TOL plasmid recombinants: analysis of insertion and deletion mutants.  
*J. Bacteriol.* **144**, 222-31 (1980)
- Neidle EL, Hartnett C, Ornston LN, Bairoch A, Rekik M, Harayama S.  
Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* *benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases.  
*J. Bacteriol.* **173**, 5385-95 (1991)
- Nelissen B, Van de Peer Y, Wilmotte A, De Wachter R.  
An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences.  
*Mol. Biol. Evol.* **12**, 1166-73 (1995)
- Niegemann E, Schulz A, Bartsch K.  
Molecular organization of the *Escherichia coli* *gab* cluster: nucleotide sequence of the structural genes *gabD* and *gabP* and expression of the GABA permease gene.  
*Arch. Microbiol.* **160**, 454-60 (1993)
- Nishida M, Harada S, Noguchi S, Satow Y, Inoue H, Takahashi K.  
Three-dimensional structure of *Escherichia coli* glutathione S-transferase complexed with glutathione sulfonate: catalytic roles of Cys10 and His106.  
*J. Mol. Biol.* **281**, 135-47 (1998)
- Noda Y, Nishikawa S, Shiozuka KI, Kadokura H, Nakajima H, Yoda K, Katayama Y, Morohoshi N, Haraguchi T, Yamasaki M.  
Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*.  
*J. Bacteriol.* **172**, 2704-09 (1990)
- Nordlund I, Powlowski J, Shingler V.  
Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600.  
*J. Bacteriol.* **172**, 6826-33 (1990)

O'Brien XM, Lessard PA, Dexter AF, Choi EE, Nagpal G, Cho JJ, Agosto M, Yang L, Treadway SL, Gaffey C, Tamashiro L, Wallace M, Sinskey AJ.  
Genetic Characterization of Indene Bioconversion in *Rhodococcus* sp. I24.  
Unpublished GenBank Accession number: AF452376

O'Donnell KJ, Williams PA.  
Duplication of both *xyl* catabolic operons on TOL plasmid pWW15.  
*J. Gen. Microbiol.* **137**, 2831-8 (1991)

Oesch F, Daly J.  
Conversion of naphthalene to *trans*-naphthalene dihydrodiol: evidence for the presence of a coupled aryl monooxygenase-epoxide hydrase system in hepatic microsomes.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1713-20 (1972)

Ohlendorf DH, Anderson WF, Takeda Y, Matthews BW.  
High resolution structural studies of Cro repressor protein and implications for DNA recognition.  
*J. Biomol. Struct. Dyn.* **1**, 553-63 (1983 a)

Ohlendorf DH, Anderson WF, Lewis M, Pabo CO, Matthews BW.  
Comparison of the structures of *cro* and lambda repressor proteins from bacteriophage lambda.  
*J. Mol. Biol.* **169**, 757-69 (1983 b)

Ohtsubo F, Sekine Y.  
Bacterial insertion sequences.  
*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **204**, 1-26 (1996)

Ohtsubo Y, Delawary M, Kimbara K, Takagi M, Ohta A, Nagata Y.  
BphS, a key transcriptional regulator of *bph* genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102.  
*J. Biol. Chem.* **276**, 36146-54 (2001)

Oldenhuis R, Vink RL, Janssen DB, Witholt B.  
Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2819-26 (1989)

Olivera ER, Minambres B, Garcia B, Muniz C, Moryeno MA, Ferrandez A, Diaz E, Garcia JL, Luengo JM.  
Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6419-24 (1998)

Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J.  
The alpha/beta hydrolase fold.  
*Protein Eng.* **5**, 197-211 (1992)

- Ouchiyama N, Miyachi S, Omori T.  
Cloning and nucleotide sequence of carbazole catabolic genes from *Pseudomonas stutzeri* strain OM1, isolated from activated sludge.  
*J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**, 57-63 (1998)
- Panicker G, Tan HM.  
*mhpB* from *Pseudomonas putida* ML2.  
Unpublished GenBank Accession number: AF176355
- Parales RE, Ontl TA, Gibson DT.  
Cloning and sequence analysis of a catechol 2,3-dioxygenase gene from the nitrobenzene-degrading strain *Comamonas* sp. JS765.  
*J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 385-91 (1997)
- Pearson WR, Lipman DJ.  
Improved tools for biological sequence comparison.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-8 (1988)
- Perna NT, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Posfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR.  
Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.  
*Nature* **409**, 529-33 (2001)
- Persson B, Krook M, Jornvall H.  
Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes.  
*Eur. J. Biochem.* **200**, 537-43 (1991)
- Pettigrew CA, Haigler BE, Spain JC.  
Simultaneous biodegradation of chlorobenzene and toluene by a *Pseudomonas* strain.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 157-62 (1991)
- Pfennig N, Lippert KD.  
Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.  
*Arch. Mikrobiol.* **55**, 245-56 (1966)
- Pohlman RF, Genetti HD, Winans SC.  
Entry exclusion of the IncN plasmid pKM101 is mediated by a single hydrophilic protein containing a lipid attachment motif.  
*Plasmid* **31**, 158-65 (1994)
- Pollard JR, Bugg TD.  
Purification, characterisation and reaction mechanism of monofunctional 2-hydroxypentadienoic acid hydratase from *Escherichia coli*.  
*Eur. J. Biochem.* **251**, 98-106 (1998)
- Powell JAC, Archer JAC.  
Molecular characterisation of a *Rhodococcus ohp* operon.  
*Antonie Van Leeuwenhoek* **74**, 175-88 (1998)

- Powlowski J, Shingler V.  
Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600.  
*Biodegradation* **5**, 219-36 (1994)
- Providenti MA, Mampel J, MacSween S, Cook AM, Wyndham RC.  
*Comamonas testosteroni* BR6020 possesses a single genetic locus for extradiol cleavage of protocatechuate.  
*Microbiology* **147**, 2157-67 (2001)
- Ramos JL, Timmis KN.  
Experimental evolution of catabolic pathways of bacteria.  
*Microbiol. Sci.* **4**, 228-37 (1987)
- Ramos JL, Rojo F, Zhou L, Timmis KN.  
A family of positive regulators related to the *Pseudomonas putida* plasmid XylS and the *Escherichia coli* AraC activators.  
*Nucleic Acids Res.* **18**, 2149-52 (1990)
- Ramos JL, Marques S, Timmis KN.  
Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators.  
*Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 341-73 (1997)
- Reddy BR, Shaw LE, Sayers JR, Williams PA.  
Two identical copies of IS1246, a 1275 base pair sequence related to other bacterial insertion sequences, enclose the *xyl* genes on TOL plasmid pWWO.  
*Microbiology* **140**, 2305-7 (1994)
- Reese MG, Ohler U, Harbeck S, Niemann H, Noth E.  
Interpolated markov chains for eukaryotic promoter recognition.  
*Bioinformatics* **15**, 362-9 (1999)
- Reineke W, Knackmuss HJ.  
Construction of haloaromatics utilising bacteria.  
*Nature* **277**, 385-6 (1979)
- Reineke W, Knackmuss HJ.  
Microbial degradation of haloaromatics.  
*Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 263-87 (1988)
- Reineke W.  
Microbial degradation of halogenated aromatic compounds. *In*: Gibson DT (Hrsg.). Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker Inc. New York/Basel. 319-60 (1984)
- Reineke W.  
Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly.  
*Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 287-331 (1998)

- Rogers JE, Gibson DT.  
Purification and properties of *cis*-toluene dihydrodiol dehydrogenase from *Pseudomonas putida*.  
*J. Bacteriol.* **130**, 1117-24 (1977)
- Rojo F, Pieper DH, Engesser KH, Knackmuss HJ, Timmis KN.  
Assemblage of *ortho* cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methyl-aromatics.  
*Science* **238**, 1395-8 (1987)
- Roper DI, Cooper RA.  
Subcloning and nucleotide sequence of the 3,4-dihydroxyphenylacetate (homoprotocatechuate) 2,3-dioxygenase gene from *Escherichia coli* C.  
*FEBS Lett.* **275**, 53-7 (1990)
- Rose AM, Snutch TP.  
Isolation of the closed circular form of the transposable element Tc1 in *Caenorhabditis elegans*.  
*Nature* **311**, 485-6 (1984)
- Saint CP, McClure NC, Venables WA.  
Physical map of the aromatic amine and *m*-toluate catabolic plasmid pTDN1 in *Pseudomonas putida*: location of a unique *meta*-cleavage pathway.  
*J. Gen. Microbiol.* **136**, 615-25 (1990)
- Sala-Trepat JM, Evans WC.  
The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species. 4-Oxalocrotonate pathway.  
*Eur. J. Biochem.* **20**, 400-13 (1971)
- Sala-Trepat JM, Murray K, Williams PA.  
The metabolic divergence in the *meta* cleavage of catechols by *Pseudomonas putida* NCIB 10015. Physiological significance and evolutionary implications.  
*Eur. J. Biochem.* **28**, 347-56 (1972)
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.  
Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)
- Sanseverino J, Applegate BM, King JM, Saylor GS.  
Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1931-7 (1993)
- Sato SI, Ouchiyama N, Kimura T, Nojiri H, Yamane H, Omori T.  
Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: nucleotide sequences of genes and characterization of *meta*-cleavage enzymes and hydrolase.  
*J. Bacteriol.* **179**, 4841-9 (1997)
- Schacht S.  
Biologische Abbaubarkeit von Halogenaromaten via *meta*-Spaltung: Zur Frage der Halogenidfreisetzung aus 4-Halogenbrenzcatechinen.  
Diplomarbeit, Göttingen (1984)

- Schleif R.  
An l-arabinose binding protein and arabinose permeation in *Escherichia coli*.  
*J. Mol. Biol.* **46**, 185-96 (1969)
- Schleif R.  
Induction of the L-arabinose operon.  
*J. Mol. Biol.* **46**, 197-9 (1969)
- Schmidt E, Knackmuss HJ.  
Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid.  
*Biochem. J.* **192**, 339-47 (1980)
- Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR.  
Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing.  
*J. Bacteriol.* **173**, 4371-8 (1991)
- Schnabel EL, Jones AL.  
Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phyloplane bacteria in Michigan apple orchards.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4898-907 (1999)
- Schwieh U, Schmidt E, Knackmuss HJ, Reineke W.  
Degradation of chlorosubstituted aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. strain B13 - fate of 3,5-dichlorocatechol.  
*Arch. Microbiol.* **150**, 78-84 (1988)
- Scott JR, Kirchman PA, Caparon MG.  
An intermediate in transposition of the conjugative transposon Tn916.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4809-13 (1988)
- Scrutton NS, Berry A, Deonarain MP, Perham RN.  
Active site complementation in engineered heterodimers of *Escherichia coli* glutathione reductase created *in vivo*.  
*Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **242**, 217-24 (1990)
- Shapiro JA.  
Mobile Genetic Elements  
Academic Press, New York (1983)
- Sherratt D.  
Tn3 and related transposable elements: site-specific recombination and transposition. *In*: Berg DE, Howe MM (Hrsg.). Mobile DNA.  
*American Society for Microbiology*, Washington DC, 1302-8 (1989)
- Shingler V, Powlowski J, Marklund U.  
Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600.  
*J. Bacteriol.* **174**, 711-24 (1992)

- Shu L, Chiou YM, Orville AM, Miller MA, Lipscomb JD, Que L Jr.  
X-ray absorption spectroscopic studies of the Fe(II) active site of catechol 2,3-dioxygenase. Implications for the extradiol cleavage mechanism.  
*Biochemistry* **34**, 6649-59 (1995)
- Simon R, Priefer U, Pühler A.  
A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria.  
*Biotechnology* **1**, 84-91 (1983)
- Simon MJ, Osslund TD, Saunders R, Ensley BD, Suggs S, Harcourt A, Suen WC, Cruden DL, Gibson DT, Zylstra GJ.  
Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4.  
*Gene* **127**, 31-7 (1993)
- Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H, Dubois J, Aldredge T, Bashirzadeh R, Blakely D, Cook R, Gilbert K, Harrison D, Hoang L, Keagle P, Lumm W, Pothier B, Qiu D, Spadafora R, Vicaire R, Wang Y, Wierzbowski J, Gibson R, Jiwani N, Caruso A, Bush D, Reeve JN.  
Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics.  
*J. Bacteriol.* **179**, 7135-55 (1997)
- Spence EL, Kawamukai M, Sanvoisin J, Braven H, Bugg TD.  
Catechol dioxygenases from *Escherichia coli* (MhpB) and *Alcaligenes eutrophus* (MpcI): sequence analysis and biochemical properties of a third family of extradiol dioxygenases.  
*J. Bacteriol.* **178**, 5249-56 (1996)
- Springael D, Kreps S, Mergeay M.  
Identification of a catabolic transposon, Tn4371, carrying biphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5.  
*J. Bacteriol.* **175**, 1674-81 (1993)
- Takeo M, Fujii T, Maeda Y.  
Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA.  
*Microbiology* **143**, 93-9 (1997)
- Takeo M, Fujii T, Takenaka K, Maeda Y.  
Cloning and sequencing of a gene cluster for the *meta*-cleavage pathway of the aniline degradation of *Azotobacter* sp. strain YAA.  
*J. Ferment. Bioeng.* **85**, 514-7 (1998)
- Tan HM, Tang HY, Joannou CL, Abdel-Wahab NH, Mason JR.  
The *Pseudomonas putida* ML2 plasmid-encoded genes for benzene dioxygenase are unusual in codon usage and low in G+C content.  
*Gene* **130**, 33-9 (1993)
- Taylor AL.  
Bacteriophage-induced mutation in *Escherichia coli*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 1043-51 (1963)

- Tenzen T, Matsutani S, Ohtsubo E.  
Site-specific transposition of insertion sequence IS630.  
*J. Bacteriol.* **172**, 3830-6 (1990)
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.  
CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.  
*Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-80 (1994)
- Tomasi I, Artaud I, Bertheau Y, Mansuy D.  
Metabolism of polychlorinated phenols by *Pseudomonas cepacia* AC1100: determination of the first two steps and specific inhibitory effect of methimazole.  
*J. Bacteriol.* **177**, 307-11 (1995)
- Tropel D, Meyer C, Armengaud J, Jouanneau Y.  
Ferredoxin-mediated reactivation of the chlorocatechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* GJ31.  
*Arch. Microbiol.* **177**, 345-51 (2002)
- Tsuda M, Genka H.  
Identification and characterization of Tn4656, a novel class II transposon carrying a set of toluene-degrading genes from TOL plasmid pWW53.  
*J. Bacteriol.* **183**, 6215-24 (2001)
- Tsuda M, Minegishi K, Iino T.  
Toluene transposons Tn4651 and Tn4653 are class II transposons.  
*J. Bacteriol.* **171**, 1386-93 (1989)
- Turlan C, Chandler M.  
IS1-mediated intramolecular rearrangements: formation of excised transposon circles and replicative deletions.  
*EMBO J.* **14**, 5410-21 (1995)
- Turner S, Burger-Wiersma T, Giovannoni SJ, Mur LR, Pace NR.  
The relationship of a prochlorophyte *Prochlorothrix hollandica* to green chloroplasts.  
*Nature* **337**, 380-2 (1989)
- Urbach E, Robertson DL, Chisholm SW.  
Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation.  
*Nature* **355**, 267-70 (1992)
- van der Meer JR, Zehnder AJ, de Vos WM.  
Identification of a novel composite transposable element, Tn5280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas* sp. strain P51.  
*J. Bacteriol.* **173**, 7077-83 (1991 a)
- van der Meer JR, van Neerven AR, de Vries EJ, de Vos WM, Zehnder AJ.  
Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1,2-dichloro-, 1,4-dichloro-, and 1,2,4-trichlorobenzene of *Pseudomonas* sp. strain P51.  
*J. Bacteriol.* **173**, 6-15 (1991 b)

- van der Meer JR, Werlen C, Nishino SF, Spain JC.  
Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater  
*Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4185-93 (1998)
- van der Meer JR, Werlen C, Kohler HP.  
The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and *cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 4009-16 (1996)
- Volff JN, Eichenseer C, Viell P, Piendl W, Altenbuchner J.  
Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66.  
*Mol. Microbiol.* **21**, 1037-47 (1996)
- Vollmer MD, Schlömann M.  
Conversion of 2-chloro-*cis,cis*-muconate and its metabolites 2-chloro- and 5-chloromuconolactone by chloromuconate cycloisomerases of pJP4 and pAC27.  
*J. Bacteriol.* **177**, 2938-41 (1995)
- Wattiau P, Bastiaens L, Van Herwijnen R, Daal L, Parsons J, Renard ME, Springael D.  
Fluorene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid : a genetic analysis.  
Unpublished GenBank Accession number: AJ277295
- Weretilnyk EA, Hanson AD.  
Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2745-9 (1990)
- Werlen C, Kohler HP, van der Meer JR.  
The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and *cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 4009-16 (1996)
- Wheatcroft R, Williams PA.  
Rapid methods for the study of both stable and unstable plasmids in *Pseudomonas*.  
*J. Gen. Microbiol.* **124**, 433-7 (1981)
- Whitman CP, Chen LH, Kenyon GL, Curtin F, Harayama S, Bembenek ME, Hajipour G.  
4-Oxalocrotonate tautomerase, an enzyme composed of 62 amino acid residues per monomer.  
*J. Biol. Chem.* **267**, 17716-21 (1992)
- Williams PA, Murray K.  
Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid.  
*J. Bacteriol.* **120**, 416-23 (1974)

- Williams PA, Sayers JR.  
The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*.  
*Biodegradation* **5**, 195-217 (1994)
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV.  
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.  
*Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-5 (1990)
- Worsey MJ, Williams PA.  
Characterization of a spontaneously occurring mutant of the TOL20 plasmid in *Pseudomonas putida* MT20: possible regulatory implications.  
*J. Bacteriol.* **130**, 1149-58 (1977)
- Worsey MJ, Franklin FCH, Williams PA.  
Regulation of the degradative pathway enzymes coded for by the TOL plasmid (pWWO) from *Pseudomonas putida* mt-2.  
*J. Bacteriol.* **134**, 757-64 (1978)
- Yamaguchi M, Fujisawa H.  
Subunit structure of oxygenase component in benzoate-1,2-dioxygenase system from *Pseudomonas arvilla* C-1.  
*J. Biol. Chem.* **257**, 12497-502 (1982)
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J.  
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.  
*Gene* **33**, 103-19 (1985)
- Yen KM, Gunsalus IC.  
Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 874-8 (1982)
- Zamanian M, Mason JR.  
Benzene dioxygenase in *Pseudomonas putida*. Subunit composition and immuno-cross-reactivity with other aromatic dioxygenases.  
*Biochem. J.* **244**, 611-6 (1987)
- Zylstra GJ, Gibson DT.  
Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*.  
*J. Biol. Chem.* **264**, 14940-6 (1989)
- Zylstra GJ, McCombie WR, Gibson DT, Finette BA.  
Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the *tod* operon.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1498-503 (1988)

## 7 Abkürzungen

A	Ampere	m	Milli-
Abb.	Abbildung	max.	maximal
Abs.	Absorption	M	Molar
AS	Aminosäure	min.	Minute(n)
ATP	Adenosintriphosphat	NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid (red.)
bp	Basenpaare	NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (red.)
BSA	Rinderserumalbumin	NB	Nutrient Broth
<i>C.</i>	<i>Comamonas</i>	OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm und 1 cm Schichtdicke
ca.	circa	ORF	offener Leserahmen
CB	Chlorbenzol	<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
Ci	Curie	p. a.	pro analysi
d	Tag	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
dest.	destilliert	PEG	Polyethylenglycol
DMSO	Dimethylsulfoxid	pers. Mit.	persönliche Mitteilungen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>R.</i>	<i>Ralstonia</i>
DNase	Desoxyribonuklease	RBS	Ribosomenbindestelle
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate	red.	reduziert
DTT	Dithiothreitol	RNA	Ribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	RNase	Ribonuklease
ε	Extinktionskoeffizient	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	s	Sekunde(n)
EE	Extinktionseinheiten	S	Svedberg-Einheit
eV	Elektronenvolt	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	Gramm	sp.	Spezies
g	Erdbeschleunigung	Tab.	Tabelle
GST	Glutathion S-Transferase	Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
h	Stunde(n)	U	internationale Enzymeinheit
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid	ÜN	über Nacht
k	Kilo-	Upm	Umdrehungen pro Minute
kbp	Kilobasenpaare	V	Volt
λ	Wellenlänge	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
LB	Luria Bertani	% (v/v)	Volumenprozent
LDH	Lactat-Dehydrogenase	% (w/v)	Gewichtsprozent

## 8 Anhang

### 8.1 DNA-Sequenz des Transposonbereiches um *cbzE*

Angegeben ist die in dieser Arbeit ermittelte DNA-Sequenz des Transposonbereiches um *cbzE* sowie die identifizierten offenen Leserahmen und deren abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Start und Stopbereiche der einzelnen Gene sind beschriftet. Postulierte Promotorbereiche, Hairpin-Strukturen als mögliche Terminationssignale sowie IS-Elemente sind fett gedruckt. Transkriptionsstartpunkte sind zusätzlich durch einen Pfeil gekennzeichnet. Invertierte Sequenzwiederholungen von transponierbaren Elementen sind grau hinterlegt und weiß gedruckt.

```

cagctgctggagcagcggcaggtgctggcagccgggtccagccggcgcagcggcaagcgtggttgactgccatgcagggc
  10      20      30      40      50      60      70      80

                                     -35-Region
atggccagaggttcacgcccagcaggctaaaaggaatcacattcgggcccgtataaagtccttgaaattataatttcaggg
  90      100     110     120     130     140     150     160

                                     Start traN →
-10-Region  ↗
atttattatggccctgtcctttttctcatctgaggaattcacatggtgcggttttcgacgggattggtcgggatcttact
 170     180     190     200     210     220     230     240

      V A A L A G C A S K P K P A P E P D M T N L V P V N
      ggttggcgtctggctggatgcgcaagcaagcccaagcccgacactgagcctgacatgaccaatttggtgccggtcaaca
      250     260     270     280     290     300     310     320

                                     Stop traN →|
      K T L P S A L V G R P G V I P Q A T N G E R K E *
                                     Start traE →
                                     M S R
      agcgttggcccagcgcctttagtagcagccccgggtaattccccagggccacgaatggagaacgtaaagaatgagtcggg
      330     340     350     360     370     380     390     400

      A D K N E A I T K A D M A V F Q E E R Q N L E T D L L
      ctgataagaacgaggcaattaccaaggccgacatggcgtgttccaagaagaacgaccagaacctggaaacggatctgctc
      410     420     430     440     450     460     470     480

      D E V L K S R R V A W W V A T G L G A L A G V A L A V
      gatgaggtgctgaaatcccgtcgagttgcctggtgggtagcagactggcctgggtgctctggccggcgtggcgttggcgt
      490     500     510     520     530     540     550     560

      T G F T M Y R Y S Q P V P A H M L V M N S D G T I Q
      gaccggcttcaccatgtaccgctacagccagccgggtcccagcgcacatgctggttatgaatagtacggcactatccagc
      570     580     590     600     610     620     630     640

      Q V S L L T P Q S S Y G D V A D T Y W V S T F I R H Y
      aggtgctggttgcagcccgcaatccagctacggcgatgtagcagatacctactgggtttctacgttcatccgtcattac
      650     660     670     680     690     700     710     720

      E S Y E F N T A Q A D Y D A I G L M A G P D V A E D Y
      gaaagctacgagttcaacacggcgcaggcagactatgacgctatcgccctgatggccggccctgatgtggctgaggatta
      730     740     750     760     770     780     790     800

```

Q K R Y K W G T K E A M D K T V G D R K S V K V K V  
 ccagaagcgctacaagtggggcaccaaggaagccatggataagaccgttggcgaccgcaagtcggtcaaggtcaaggttt  
 810 820 830 840 850 860 870 880

S S V I L D R E T G I A T V R F S T T E K Y R T R G A  
 cctcggtcatcctcgaccgtgaaacaggtatcgctacggttcgccttctcaaccactgaaaagtagcgtaccggtggtgccc  
 890 900 910 920 930 940 950 960

D E A P Q F W I A T L S Y R Y D N M E L T A A Q R Y I  
 gatgaggctccgcaattctggatcgctaccctgtcctatcgctacgacaacatggagctgacggcgccgagcgtacat  
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

N P A G F R V Y S Y R V N A E S V A S V G G R \*  
 Stop *traE* →|  
 Start *traO* →  
 M N L  
 caaccggtgattccgcttactcgtaccgagtcacgcccgaatctggtgcccagtggtggggggccgataatgaatct  
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120

K F A I A T A L A A A L V S A P A L A L N E K T D S  
 caaattcgctattgcaactgccttggcagcggcgctggtatcgcgccggccctggccctcaacgagaagacagacagcc  
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

P Y D Y R I K T V I Y N P M D V V Q I D G V V G L Q T  
 cctacgactatcggtcaagacggtgatctacaacccgatggacggttgcctcaaatcgatgggggtggtgggctgcaaacc  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280

L I Q F A P D E V Y V T H N F G A K S A W E L V N K D  
 ctcatccagtttggcccgatgaggtctacgtgacgcataactcgggtgcaaaagcgcctgggagttggtcaacaagga  
 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360

N N V F I R P I A E L S D T N L T V V T S K R T Y Y  
 caacaagctatttatcagggcagattgcccagctgagcgcacccaacctgaccgtagtgaccagcaaacggacgtactact  
 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440

F L L H Y I G S N A V K G P D G Q V K E E F I K T P W  
 tctgctgactacatcgccagcaatgcccgtcaaaggccctgatggacaagtgaaagaagagttcatcaagacgccttgg  
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520

S M R K A T V G V I F K Y P F E D M K V A N K K L E E  
 agcatgcgcaaaagccacggtagggcgtcatcttcaaatacccggttgaagacatgaaggttgctaacaaaaagctcgaaga  
 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600

R R V R E A L A K G N N G P V N I A Y T R S D E E S  
 acgcccgtcccgagcgcctggccaagggtaataacggccagtgaaatcgctatacccgctccgatgaagagagca  
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680

S Q E I R P T H T W D D F R F T Y F E F P A N A A L P  
 gccaggaatcagggccacccacacctgggatgatttccgcttactacttcgagtttccggccaatgcagcgttgcca  
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760

N V Y M I G P D G K E T I P Q T H I E G E Y S N I I V  
 aacgtctacatgattggcccggatggcaaggaacccatcccacagacgcacatcgagggcgagtagttccaacatcatcgt  
 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840

A E T T A R E W R V R L G D R V V G V V N G G Y N P  
 ggccgagacaacggcgcgtgaatggcgggttcgcctgggtgatcgcggtgggtgtagtcaatggcgggttacaaccgg  
 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920

A L G A S K T G T N S P V V K R V L K G G E E \*  
 Stop *traO* →|  
 Start *traF* →  
 M S R D  
 cgttggcgctagcaagaccggcaccaactcgcccgtggttaagcgcgtggtgaaagggggtgaggaatgagccgcgacg  
 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000

V N I D E L D T F E D D R G G F D G G P K K K V P G L  
 taaatcgcagcaactggacacgttcgaggacgaccggggcggttcgatgggtggccgaaaaagaaagtgccaggcctg  
 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080

R A F I G V L F L I A L C L I S W I V Y K N V I A P K  
 cgagcattcatcggcgtgttctctgattgccttgctctcattagctggatcgtctacaaaaatgtgattgcgcctaa  
 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160

L Q Q Q E Q A E K A S P N K A R N L P G V S F A T T  
 actccagcagcaggaacaggccgaaaaagcctcgcccaacaaggccaggaacttgccgggtgtgagcttcgcaaccacac  
 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240

P A N A E D E P V E Q S A E Q E Q A A S T Y Q Q P V Q  
 ctgcaaacgcgaggacgaacctgtcgaacagtcagccgagcaggagcaagcccgccagtacctaccagcagccggtgcaa  
 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320

Q T Q P G Q Q G K V E L T P E Q K A M Q R R L S A S S  
 cagaccagcccgacagcagggcaaggtcgagctaacgcctgagcaaaaggccatgcagcgcggctcagtgctcgag  
 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400

G T E E M R S Q G A V A T P S R G E K A E P V Q T S  
 cgggacagaggaatgcggttcccagggtgcagtcgctacgcctagtcggtgagaaggccgagccggtacaaaaccagca  
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480

S G S S E L A T R M N S A R Y T A S R A T L M K N M S  
 gtggcagttcggagctggccacgcgcatgaatagcggcgggtacactgcatccagggcgacactcatgaaaaatcagc  
 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560

M S I A A G T M I N C G T I T E L D T T V P G F V S C  
 atgtcgatagccgctggcacgatgattaattgcggcacgatcaccgagctggataccactggtcccggcttcgttccctg  
 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640

Q V S K E V R S A D G S V V L I D K G A K I T G E V  
 ccaagtgtcgaaggaggttcggtcgggtgacgggttcggtggtgctgatcgacaagggcgcaagatcacaggcgaagtca  
 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720

S G G I L M G Q A R A F V L W S R V R N R D G A V A Y  
 gtggcggcatcctgatgggcccaggccaggcccttctgtgctggtgctgaggggttcgcaaccgagcggcggcggctac  
 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800

L D A P G T N R L G S A G I P G Q V D T H F W D R F G  
 ctcgatgcgctgggtaccaaccgctcggtagcgcggcattcctggccaggtcgataccacttttggtgatcgcttcgg  
 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880

G A M F I S V F S D L S R G L I Q A L V N S T D K S  
 tggcgccatgttcatttcggtggtcagtgacctgagccggtgctgatacaggccctggtgaactccaccgacaagtgcg  
 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960

D S D T T V N L D N T S N T S D S L A R E V L R A T I  
 acagcgacacgaccgtgaacctcgacaacacctcgaacacctccgattcgctggcccgcgaagtgttcgcgccacgatc  
 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040

N I P P T L T V N H G E A V S I F V P R D V D F S D V  
 aacatcccgcacaacctgaccgtcaatcacggcgaagccggttcgatcttcgctgcccgtgacgttgattcagcgatgt  
 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120

Y G L E M V E \*      Stop *traF* → |      Start *traG* →  
 gtatggcctggaatggtggagtgaggagggacacatatggatattgcgaccgagcgcgacctggcctttagcagacatgga  
 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200

M A L A A A N F A P L R Q Y L D D P E V F E I R V N  
 catggccctggcggggcgaacttcgccccgctgcgccagtcacctcgacgatccagaagtgttcgagatccgggtgaaca  
 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280

K F G Q V V C D T P K G R V L H A D P R I T Y D Y L W  
 agttcggccaggtggtatgtgacacgcccagggcggtgtcttgcacgcccacggatcacctacgactacctgtgg  
 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360

A L N D H L L S L N G L G R T P I S Y V K L P D G S R  
 gccttgaatgaccatctactgagcctgaacggactcggccgacgcctatcagctacgtgaagtggccgacggatctcg  
 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440

G T F C W P P A T V E G T M L M S I R K H L P V S K  
 ggggacgttctgctggcctcctcgcgactgtcaggggaccatgctcatgtcgttcgtaagcatttgcccgtatcgaaga  
 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520

S L A Q L A Q E G R F A K V R H R K Q S E Q F S L E P  
 gcctggccagcttgcccaggaaggccgcttggccaaggtgacacccgtaagcagctgagcaattctctcttgagccg  
 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600

F E E E L L A L L E K G D V E G F L T L A V K T K R N  
 ttcgaggaagagtgtgctgctgttgaaaagggtagcgtggaaggttcttgacgctggccgtcaagactaagcggaa  
 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680

I A V A G P T G S G K T T L T R S L M G A V P T V E  
 cattgccgtagccggtcctaccggtccggcaaaactacgcttaccgctcgttgatggggcggtgcctacggttgagc  
 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760

R V L L M E D T H E I D D N R L D E V G Y L M Y G E G  
 gtgtgctgctgatggaagatacgcacgaaatcgcagataaccggtcgtgatgaggtgggctatctgatgtacggcgaaggc  
 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840

D G R M S A R E C L K L C M R L S P D R I F L T E L R  
 gacggcgcaatgtcggcgcgtgaatgcctcaagctgtgcatgcgcctgtccccggaccggatcttctcctgaccgagctgcg  
 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920

D D A A W D Y L A G A N T G H P G G I F S T H A D S  
 cgacgatgcagcctgggactacctggccggcgcgaacacggggcaccctggggcattttctcgcacgcagctgacagcg  
 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000

A A S T P A R I A T L V K A S E I G R A L D Y D V I M  
 cggccagcaccacagcgcgtatcgccacattggtaaaggcctcggaatcggtcggcgcctcgcactacgacgtaaatcatg  
 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080

K T I N T T L D V V V Y M E K R E V L E I L Y D P M F  
 aagaccatcaacaccagcttgatgtggtcgtgtacatggaaaacgtgaagtgtggaatcctgtacaccgatggt  
 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160

**Stop *traG* →**

K K Q A M A A V \*  
 caagaaacaagcaatggctgctggtgtaggagttcaagccgctgagcgcctgcagggcaacaaccaaggagaagtatgca  
 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240

tgaccgaagcaaccaatatctggaccgccaccgcttccgagatcaccaacgcggtgctgagagccttatcgccatgggt  
 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320

tgtggcgagccacaaacaggcgatgtatacaccactgctgctgcttggtcgtagtggcgtggaagagctgggtgcctc  
 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400

cgtgagcaagtttggcgcggcaggttgaaagcgtcatggccggtggtcgtggacctgctggcggtgatggcattgccc  
 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480

tgacgggtgagctgcctatctggctccgtgtttacccagcgtggaaggaaagctcccggccttcagtgtcgatgactgg  
 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560

cgatggattcgcctgtcctcgatccaagaggttcagccccgcgcgcaatcgtcattggcgaagatacgtctaaatggca  
 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640

gctcatgggtcaacggtgttgccaatggccaggtgtaccacgcgacacagcgccctgttcctcggcgcatcggtagagaagc  
4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720

cggtagaccgtctgttgacggttgtagcgccgctgtgagtgagaacagcgcgccggatgcagctggccagcggcaca  
4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800

**38 bp inverted repeat (ΔX-IS-Element)**

agatggtgtggtta**gggggtttgggggagcaatggaaccgaaaaccaacgtaag**cacgaattagagttcgctttactcgtatg  
4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880

**tgactggtgattggagaactctgattgtcgaaaagagtttatcgaaccgcttttcggatggttacggtccttctctgatgt**  
4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960

**tcgtaaagcgggtttcataaaacggtggttttatcgtactcccagacagagcgtggtttgcgggcaggtactggg****ctt**  
4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040

**Start *tnpA*(1) →**

**38 bp inverted repeat (ΔX-IS-Element)** M P A T A K P  
**aagtgcgcttactgctccattgctccccgaaccc**aaatactgtgtatttgcacagtattcatgccagccaccgccaacc  
5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120

K R Y N P R H P E R T L L Y Q T V A E H Y E S W L E  
caagcgctacaacccccgccaccccgaacgcactctgctctaccaaaccgtggccgagcactacgagagctggctggagc  
5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200

L A C E G Q F E G Q G D H H S P R P Y V R K A F E K Y  
tggcttgcgaggggtcaatttgagggccagggcgaccaccacagccccagggcctacgtgcgcaaagcgttcgagaaatat  
5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280

L E C G I F A H G F A R A R C D D C G H D F L V A F S  
ctggagtgcggcatcttcgcccacggctttgcccgcgcccgtgcgacgactgcggacacgacttctctggctgccttctc  
5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360

C K G G G V C P S C N T R R M A E T A A H L T D H V  
gtgcaaagggggggtgtctgcccctcatgcaaacccggcgcatggctgagacggcggcacacctcaccgaccatgtgt  
5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440

F P R L P V R Q W V L S V P K R L R Y Y M Q R E G P V  
ttccccgctgcgggtgcgacagtggtgctgtcggtgccaaacggctgcggtactacatgcagcagagggcccggtg  
5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520

L G M V L R I F L R V I A Q T L Q A N S P G A A N V D  
ctgggcatggtgctgcgcatcttctctacgcgctcatcgcgaaaacgctgcaagccaacagccctggtgcggccaatgtgga  
5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600

K A A L H I G A V A F I H R F G S N L N E H V H F H  
caaggcagcactgcacataggcgcagtcgccttcatccaccgctttggctccaatctgaacgagcatgtgcacttccatg  
5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680

V C A V D G V F E E V A G E E G D A A D A A S Q S S P  
tctgcgcagtcgatggcgtgtttgaggaagtggcggcgaggaggggcgatgctgctgatgcagcttctcaaagctcacca  
5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760

S R I I F H P A T G V T A D A V G Q V Q A S L R K R I  
tcgcatcatcttccaccccgccaccggcgtgactgcggatgcccgtgggtcaggtgcaggccagcttacgaaaacgcat  
5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840

L R A F V G R G L L E S F E A Q E M L G Y K H S G F  
cctgcgcgcttctgctggggcggcctgctggagagtttcgagcccaagagatgctggggctacaagcacagcgggtttt  
5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920

S A D T S V C I A A H D R A G L E R L L R Y C A R P P  
cggcggacaccagcgtgtgcatagcggcgacgaccgcgcccggctggagcggctgctgcgctactgcgcccgcggcgg  
5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000

F A M E R L R K A G S E L V Y R C A K Q H S E P G S L  
 ttgccaatggagcggctgcgcaaacggcgagcagctggctaccgctgcgccaagcagcacagcagcccgccagcct  
 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080

P H N K R G V K A D E I T L T P L E L I E R I A K L  
 gcctcacaacaagcgcggcgtaaaggccgatgagatcacccctaccccgcctggagctgattgaacgtatcgccaagctgg  
 6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160

V P P P R T H R H R Y F G V L A P N S P L R P A V T A  
 tgcccccgccgcgcaagcaccgcccaccgctactttggcgtgctggcaccgaactcacccctgaggcctgccgtcacggcg  
 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240

L A R D A A V K P A Q V Q A E P A S T A A G E G A L G  
 ctggcgcgtgatgcagcgggtgaaaccggcgaggtgcaagccgagccagccagcacggctgcagcggagggcgcaacttg  
 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320

V R S P L P T Q T E P A Q P V P P K R P A H Y L W A  
 ggtaagaagcccactgccaaccagaccgagcccgcagccggcgccaccaagcgcggcgccgcaactatgtggggcg  
 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400

V L M A R I Y E V F P L L C P I C G G Q M H I I A F I  
 tgctgatggcccgtatctacgaggtgttcccgctgctgtgccccatctgcggcgggcaaatgcacatcatcgccctcatc  
 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480

T H S A D I R Q I L E H I G V E T E P P H I T P A R G  
 acacacagtgccgatatccgccaataactggagcacatcggggtggagacggagccgcccacatcaccccgccagcgg  
 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560

P P L W D E C D A Q A A E G V E P A P D W D E A T Q  
 gccgccactgtgggacgagtgacgcgcaagccgagggcgctggagccagcccagactgggatgaagcgaccaac  
 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640

**Stop *tnpA*(1) →|**

P A P D F E V D Q R V S W \*  
 cggccccggacttcgaggtcgatcagcgcgtcagttggtaggggggcaacagcgggtaaacagtggttttgccaacggtgc  
 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720

gaggcagcgcctgcgcctgtcaccgccccaaaacgggtcataccgaaaaatctcgggcaactggccttgagaaatcaaccca  
 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800

cgagtcacctgtgtgcatgcctgagacgccccaaacgtgtgctatacttgtgctcatgcgggttgatttcctatcctcag  
 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880

ttgttcgtggatctgatgttgccaaaacctgcttttgacgatttttgcgctcgaaccagggtgcagttgttgagtgattg  
 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960

**Start ORF →**

M S V D L H A R E I K P L R N  
 agtccgttcgctgcttttttaaaaggatattttctatgtcagtcgatcttcatgcccgtgaaataaagcccctgcgcaa  
 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040

T F S H T A S G T F A G H Q A Y L C G P P V M I E A  
 taccttttcgcatacagcagcggcaccttcgcccgggtcaccaggcctacctctcgggcccgcctgatgatgaagcct  
 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110 7120

C I A T L M Q G R L F E R D I Y T E K F L S A A D T N  
 gcacgccaccctgatgcagggagccttgttcgagcgggacatctacaccgagaagttcctctccgcagccgacaccaac  
 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200

**Stop ORF →|**

**Start *cbzT* →**

Q Q R S P L F K R V \* M F F D T R P K V S V H  
 cagcagcgcagtcctctgttcaagcgggtttgaaggggaataagcatgttcttcgacacccgccccagggtcagcgtgca  
 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280

V M Q T G E T F P C A T D E S L L Q G M L R L G R K  
 tgtcatgcaaacgggtgaaacctttccctgcgccacggatgagagtctgctgcaagggatgctgcgctgggcccgaagg  
 7290 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360

G I P V G C V N G G C G V C K V H V I E G Q C R P L G  
 gcatcccgggtgggctgctgcaacggcgctgtggggtctgcaaggtccatggtattgaggggtcaatgcccgcctctgggt  
 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440

P V S R A H V S A A E E A R G F T L A C R V A P V T P  
 cctgttagccgcgcatgtcagtgccgcagaggaagcacgcggcttcaccctggcctgcccgtgtggcggcgggtcacccc  
 7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520

V Q L E V V G K F E K V F S K G F V S S T N E I I N  
 ggttcaactggaggtggtgggcaagtttgaaaaggttttttcaaagggttcgtttcatcaacgaacgagattattaaca  
 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600

→| Stop *cbzT*      Start *cbzE* →  
 K \*                    M S I M R V G H V S I N V M D M A A A V K  
 aatgaaggagacacacatgagattatgagagttggccacgtcagcatcaacgtgatggacatggcccgcagcagtggaagc  
 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680

H Y E N V L G L K T T M Q D N A G N V Y L K C W D E W  
 actacgaaaacgtgctgggcctaaagacgaccatgcaggacaatgccgggaacgtgtacctgaaatgttgggacgagtg  
 7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760

D K Y S L I L T P S D R A G M N H V A Y K V T K D S D  
 gataaatattcccttatcctcaccccatcggacagggctggaatgaaccacgtcgcctacaagttaccaaagacagtg  
 7770 7780 7790 7800 7810 7820 7830 7840

L D A F Q A R I E A A G T K T T M M P D G T L P S T  
 tctggacgccttccaagctaggattgaagccgctggcaccacagaccacatgatgcccgatggcagcgtgccatccacgg  
 7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920

G R M L V F K L P S T H E M R L Y A M K E N V G T E V  
 ggcgcatgctggtgtttaaattgccaagcacgcacgaaatgctctttacgccatgaaagaaaacgtcggcaccgaggtg  
 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000

G S I N P D P W P D S I K G A G A H W L D H V L L T C  
 ggtagcatcaatcccgatccgtggccagacagcatcaaggggtgccggggcgcactgggtggatcacgtactactgacgtg  
 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080

E F D P G T G V N R V A D N T R F F I D V L D F F Q  
 tgagttcgatccgggactggtgtcaataggggtggcggacaacacacaggttcttcattgatgtgctggatTTTTccaga  
 8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160

T E Q L T V G P D G S F Q S V S F L S C S S K P H D I  
 ccgagcaattgaccgtcggccccgatggctcattccagtcggtatcgttctctgctgctcgagcaagccgcatgacatt  
 8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240

A F A D A P T P G L H H I S Y F L D S W H D I L K A G  
 gcgtttgctgatgcgccgactcccggcctgcaccatatttcgtatttctggactcgtggcagacattctcaagggcggg  
 8250 8260 8270 8280 8290 8300 8310 8320

D V M A K N K V R I D A S P T R H G F T R G Q T I Y  
 cgatgtcatggccaagaacaaggtacgtattgatgcgtcacctacacgccatggcttcacgcgcggccagacgatctatt  
 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400

F F D P S G N R N E T F A G L G Y Q A Q R D R P V T T  
 tcttcgaccctagcggcaaccgcaatgagaccttgcaggactggggtaccaggcgcagcgggaccgcccgggtgacgact  
 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480

W T E D Q A G R A V F F H T G E M V S S F I D V Y T \*  
 tggaccgaagatcaagcgggtcgcgcagttttctccacaccggcgagatgggtgctcgtcgttcatagatgtgtacacatg  
 8490 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560

Stop *cbzE* →|

atcgattgaatgaccagtgggggcccccaagtcttgattcatcagcttggggcgctttgtttcaataacggataaccacc  
8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640

**Start *cbzX* →**

M Q K T I S P Q A P N P T H S I V V P T I D W H A A  
catgcaaaagaccatttcaccgcaagcccctaaccgactcacagcatcgctggtgcccacgattgactggcagcgcgcac  
8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720

H E A V G A A V Q A A Q A M G I R V N V A V V D A S G  
acgaggcagttggtgcccagtcagggcgagccatgggtatacgcgtcaacgtcgcggtggtggacgcttccggt  
8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800

V L A A F L R M P G A P L H S V E I A I D K A Y T A V  
gtgctggcgccttcttgcgcatgcccggggccccgctgcatcggtcgaaatcgccatagacaaagcctacaccgagt  
8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880

S F G L A T S Q W H G A L Q Q H S V A V R E G I V L  
cagtttggcttggcagaccagccagtgccatggggcggtgagcagcattcagtgccggtgagcagggcattgtgttc  
8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960

R P R F V A F G G G L P V L E N G Q R I G G I G V S G  
ggccccgcttcttggcggttggcgggcggttgcgggtgctggaaaacggacagcgcattggcgccatcgccgcttccggt  
8970 8980 8990 9000 9010 9020 9030 9040

**Stop *cbzX* →|**

G S E Q E D E S C A R A G L A A L G L A A \*  
ggctccgagcaagaggatgaaagctgccccgcgcccgggttggccgcctgggttggcgccataaacagcaccgccccaa  
9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120

**Start *cbzG* →**

M K D I R N F I N G E Y V T N V S G K  
ttaccacttcaagagagagaaaaatgaaagacatcaggaacttcatcaacgggtaatacgtcaccaatgtcagcggcaag  
9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200

T Y E K R N P V D N S L I G M V H E A G Q P E V D A A  
acctacgagaagcgcaaccgggtgataacagcctaatacggcatggtccatgaagctggtcagcccaggtggatgccc  
9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280

V A A A R A A L N G P W G K L S V V D R C A M L D G  
ggtggccgcccgcgcccggcactgaacgggcccctggggcaagctctcgggtggtcgaccgctgcccattgctcgatggt  
9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360

V V A E I N R R F D D F L Q A E I A D T G K P A H L A  
tggttgcgagatcaaccgcccgttggatgatttctgagggccgaaattgcccataccggcaagcccgcgacctggca  
9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440

S H I D I P R G A A N F K I F T D T I K N V S T E S F  
tcgcacatcgacatcccgcggtgcccgaacttcaagatattcaccgacaccatcaaaaacgtctcgaccgaatcctt  
9450 9460 9470 9480 9490 9500 9510 9520

E M R T P D G K T A R S Y G V R T P R G V I A I I C  
tgagatgcccaccgggtaaaacagcgcgagctacggcggtgcccaccggcggtggtcattgcccattcatctgcc  
9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600

P W N L P L L L M T W K C G P A M A C G N T V V V K P  
catggaatttgcgctgctgctgatgacctggaatgtggcccggccatggcctgcccgaacactggtgctgctcaagcca  
9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680

S E A T P S T A T L L G E V M N K V G V P P G V Y N V  
tcagagccactcccagcaccgcccagctgttggggcgaagtcatacaaggtcggcgtaccgcccggctctacaacgt  
9690 9700 9710 9720 9730 9740 9750 9760

V N G F G V N S A G S F L T A H Q G V N G I T F T G  
ggtgaacggcttggcgctcaactcgggggctccttccctgaccgcccaccagggcggtcaacggcatcaccttaccgggt  
9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840

E T K T G T A I M K A G A D G I R P V S L E L G G K N  
aaaccaagactggcaccgccatcatgaaagccgggtgccgacggcatccgcccgggtgtcactcgaattggggcggaaaaac  
9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920

A A V V F A D C D F E N A L A T V T R S A F E N C G Q  
gcggccgtgggtgtttgccgactgcgattttgaaaacgctctggccaccgtgaccgctctgcctttgagaactcggcca  
9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000

V C L G T E R V Y V E R P I F D K F V S A L K E R A  
ggctctgtctgggactgagcgcgtgtatgtggagcaccgatttttgacaaattcgtcagcgcctgaaagagcgcgccg  
10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080

A A I K P G R P F D A D T K I G P L V S K I H Q K K V  
cggccatcaagcccggccgctcgtttgatgccataccaaaattggcccgcgtggtagcaaaatccaccagaaaaagggtg  
10090 10100 10110 10120 10130 10140 10150 10160

L S Y Y A K A K A E G A N I V L G G G V P N M P D D L  
ctgtcttactacgccaaagcgaagcagaaggtgccaatattgttcttgggtggcggcgttcccaatattgacgatgacct  
10170 10180 10190 10200 10210 10220 10230 10240

K D G C W V E P T I W T G L P E S S P I V R E E I F  
gaaagcgggtgctgggtcgaacccaccatctggactggcctgcccagagattcacctattgtcgtgaagaaatctttg  
10250 10260 10270 10280 10290 10300 10310 10320

G P C C H I Q P F D T E E E V L N M V N D S P Y G L A  
gcccattgctgcatatccagccgtttgacaccgaagaagaggtgctgaatattggtcaacgacagcccctacggcctggcc  
10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400

T S I H T Q D I S R A S R L A T Q I E V G L C W I N S  
acttctattcacaccaggatattcagccgagccagcgtcttgcacgcaaatcgaggtgggtctgtgctggatcaacag  
10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480

W F L R D L R T P F G G S K Q S G I G R E G G L H S  
ctggttctctgctgatttgcgcacaccctttggcggctccaagcagtcgggtatcgggcgtgaaggtggcctgattcgc  
10490 10500 10510 10520 10530 10540 10550 10560

Stop *cbzG* →

L E F Y T E L R N V M I K Y \* **inv. repeat** **T-Box**  
tggagttctacaccgaactgcgcaacgtgatgatcaagattgagaaatattgtgccccattttttataagaaaatcctct  
10570 10580 10590 10600 10610 10620 10630 10640

Start GST →

M L Y Y S P G A C S L S P H I A L R E A G L D F D L  
ataatgctttattactctcctggcgttgcctgctgcacccacattgccctgcgcaagccggctctggactttgactt  
10650 10660 10670 10680 10690 10700 10710 10720

V K V D L K T K K T D A G D D Y F A V N P S G Y V P  
gggtcaaggtcgatctcaaaaccaagaaaaccgatgctggtagcattttgcagtgaaacccagcggctatgtgcct  
10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800

C L Q I D D G R M L T E G P A I V Q Y I A D Q A A G K  
gtttgcagatcgacgatgggtcgcatgctcaccgaagggccccgccatcgtgcaatacatcgctgaccaagcggctggcaaa  
10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880

K L A P L N G T F E R Y Q L Q Q W L N F I S T E I H K  
aaacttgcggcgtcaacggcagctttgagcgtatcaactacagcagtggttaactttatttccaccgagattcataa  
10890 10900 10910 10920 10930 10940 10950 10960

S F S P L F N P D A S A D S K A T A R K T L D A R L  
aagttttccccgctgttcaaccccgatgccagcgtgactccaaggctacggcgcgcaagactttggatgcccgcttgg  
10970 10980 10990 11000 11010 11020 11030 11040

A T A A A Q L S K T P Y L L G E S Y S V A D I Y L F V  
cgacagcagcagcacaactttccaagacaccctatttgcctggagagagctactctgtcggcagatctacctgtttgtt  
11050 11060 11070 11080 11090 11100 11110 11120

T L G W A G Y V G V D L A P W P A L Q H F S A R V A S  
 accttgggctgggctggctatgtgggtgtggacttggcgccatggcctgctgtgcaaacacttttcggccccgggtggcctc  
 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11200

**Stop GST →**

R D A V Q A T L R A E G L I Q A \*  
 ccgcatgccgttcaggccaccttgcgcgagaaagtttgattcaggcctgaacatgatgacaacatccaatccagaaat  
 11210 11220 11230 11240 11250 11260 11270 11280

gcacaatcgattgttgcctgctgggcatccgcaccaactaccatgatgtgggaccggcttcccggttctgttgattcacgg  
 11290 11300 11310 11320 11330 11340 11350 11360

tttccggccccggcggtgaccgcgtgggccaaccagccccaggccctacgtgcgaaagcgttcgagaaatctctggagt  
 11370 11380 11390 11400 11410 11420 11430 11440

cggcatcttgcggccagcgttttgcggcgcccgctgcgacgactgcgacacgacttctggctgccttctcgtgcaaa  
 11450 11460 11470 11480 11490 11500 11510 11520

**Start *tnpA*(2) →**

M A E T A A H L T D H V F P R  
 gcgggggtgtctgccccctcatgcaaacccggcgcatggctgagacggcgccacacctcaccgacctgtgttccccgc  
 11530 11540 11550 11560 11570 11580 11590 11600

L P V R Q W V L S V P K R L R Y Y M Q R E G P V L G M  
 ctgcccgtgcccagtggtgtgtcgggtgccaaacggctgcggtactacatgcagcgagagggccccgggtgtgggcat  
 11610 11620 11630 11640 11650 11660 11670 11680

V L R I F L R V I A Q T L Q A N S P G A A N V D K A  
 ggtgctgcgcatcttctacgcgtcatcgcgcaaacgctgcaagccaacagccctggctgcccgaatgtggacaaggcag  
 11690 11700 11710 11720 11730 11740 11750 11760

A L H I G A V A F I H R F G S N L N E H V H F H V C A  
 cactgcacataggcgcagtcgcttccaccgctttggctccaatctgaacgagcatgtgcacttccatgtctgcccga  
 11770 11780 11790 11800 11810 11820 11830 11840

V D G V F E E V A G E E G D A A D A A S Q S S P S R I  
 gtcgatggcgtgtttgaggaagtggcgggcgaggaggcgatgctgctgatgcagcttctcaaagctcaccatcgcgcat  
 11850 11860 11870 11880 11890 11900 11910 11920

I F H P A T G V T A D A V G Q V Q A S L R K R I L R  
 catcttccacccccgccaccggcgtgactgcggtgcccgggtcaggtgcaggccagcttacgcaaagcgcctctgcccgc  
 11930 11940 11950 11960 11970 11980 11990 12000

A F V G R G L L E S F E A Q E M L G Y K H S G F S A D  
 cctttgtcgggggggctgctgagagatttgcaggcccaagagatgctgggctacaagcacagcgggttttcggcggac  
 12010 12020 12030 12040 12050 12060 12070 12080

T S V C I A A H D R A G L E R L L R Y C A R P P F A M  
 accagcgtgtgcatagcggcgacgaccgcccgggtggagcggctgctgctgctactgcgcccccccgcttggccat  
 12090 12100 12110 12120 12130 12140 12150 12160

E R L R K A G S E L V Y R C A K Q H S E P G S L P H  
 ggagcggctgcccgaagcgggcagcagctggtctaccgctgcccgaagcagcagcagcagccccggcagcctgcctcaca  
 12170 12180 12190 12200 12210 12220 12230 12240

N K R G V K A D E I T L T P L E L I E R I A K L V P P  
 acaagcggcggcgtaaaggccgatgagatcaccctcaccggcggagctgattgaacgtatcgccaagctgggtgccccg  
 12250 12260 12270 12280 12290 12300 12310 12320

P R T H R H R Y F G V L A P N S P L R P A V T A L A R  
 ccgcgacgcaccgcccagcctactttggcgtgctggcaccgaactcacccttgaggcctgcccgtcacggcgtggcgcg  
 12330 12340 12350 12360 12370 12380 12390 12400

D A A V K P A Q V Q A E P A S T A A G E G A L G V R  
 tgatgcagcgggtgaaaccggcgaggtgcaagccgagccagccagcagcggctgcagggcgagggcgcaacttggggtaagaa  
 12410 12420 12430 12440 12450 12460 12470 12480

S P L P T Q T E P A Q P V P P K R P A H Y L W A V L M  
 gcccactgccaaaccagaccgagcccggcccagccgggtgccaccaagcggccggcgcaactatttggggcggtgctgatg  
 12490 12500 12510 12520 12530 12540 12550 12560

A R I Y E V F P L L C P I C G G Q M H I I A F I T H S  
 gcccgatctacaggggttcccggctgctgtgccccatctgcgggggcaaatgcacatcatgccttcatcacacag  
 12570 12580 12590 12600 12610 12620 12630 12640

A D I R Q I L E H I G V E T E P P H I T P A R G P P  
 tgccgatatccgcaaaactggagcacaatcggggtggagagcggagccggcgacatcaccccgccagcggggcgccac  
 12650 12660 12670 12680 12690 12700 12710 12720

L W D E C D A Q A A E G V E P A P D W D E A T Q P A P  
 tggggagcagtgcgagcgcgcaagccgagggcggtggagccagcccagactgggatgaagcgaccaaccggccccg  
 12730 12740 12750 12760 12770 12780 12790 12800

**Stop *mpA*(2) →**

D F E V D Q R V S W \*  
 gacttcgaggtcgatcagcgcgtcagttggttaggtggcaacagcgggttaacagtggttttgccaacgttgcgagggcagc  
 12810 12820 12830 12840 12850 12860 12870 12880

gctgcgctgtcaccgcaaaaaacgggtcataccgaaaaatctcgggcaactggctttgagaaatcaaccagcagctccc  
 12890 12900 12910 12920 12930 12940 12950 12960

ctgtgtgcatgcctgagacgccccaaacgtgtgctatacttgtgtcatgcgggtggatttcctatcctccgacctgcc  
 12970 12980 12990 13000 13010 13020 13030 13040

**Start *cbzJ*(2) →**

M T Q T P N Q L A E A I  
 tagccggcgcgccccaccctcaacctttccaggcggagcccccatgaccagacgccccaaactcgccgaagcgcgatc  
 13050 13060 13070 13080 13090 13100 13110 13120

W A A R Q A G R T L D A A A T I G T P D L A T A Y A I  
 tggggccccgcccagggcgggtcggacactggacgcgcgagccaccatcggcacgcccgaactcgccaccgcctacgccat  
 13130 13140 13150 13160 13170 13180 13190 13200

Q R A L L G L R L A A G E R V V G W K L G Y T S E V  
 ccagcgcgcgctgctcggcctgcgcctggcgcggcggagcgcggtggtcgggtggaagctgggttacacgtcggaagtga  
 13210 13220 13230 13240 13250 13260 13270 13280

M R R Q M G I A R P N I G P L T N R M L L N S G D A V  
 tgcgcccagatgggcatagcccggcccaacatcgggcccgtgaccaaccggatgctgctgaactcgggcgagcgggtgc  
 13290 13300 13310 13320 13330 13340 13350 13360

H E R L V Q P R V E P E I G L R L Q T A L D A R H A P  
 acgagcgcctggtgcagccgggtcgaaccggagatcgggctgcgcctccaaaccgcccctcgacgcgcggcacgcgcc  
 13370 13380 13390 13400 13410 13420 13430 13440

V D R H T V V A A V E G A Y A C L E V V H S T W T G  
 cgtcgaccgccacaccgtgggtgcgcgcgtggaggcgcctacgcctgctcgaagtcgtgcaactccacctggacaggct  
 13450 13460 13470 13480 13490 13500 13510 13520

Y R F N L E Q N T A D N S S A G Q V V V G P R L P V T  
 accgcttcaacctcgaacagaaaccgcccagcaactcgtccgcccaggtcgtcgtcggggccagcctgcccgggtgacc  
 13530 13540 13550 13560 13570 13580 13590 13600

D L M A A G T V A V R L H D G S H H T L G Q G V G A D  
 gacctgatggggcgggcaccgtggcggtgcgcctgcacgagccagccaccacacgctgggacagggcggtggcgccga  
 13610 13620 13630 13640 13650 13660 13670 13680

A D G H P L D A V A R L A R E L A A F G Q R L E A G  
 tgccgacggccacccctggacgcggtggcgcggtggcgcgggagctggccgcgtttggtcagcggctggagggcggtg  
 13690 13700 13710 13720 13730 13740 13750 13760

D L V I T G G L T K A C E L E V G G R L T G V F S F G  
 atctggtgatcacgggtgggctgacaaaggcttgtagctggaggtgggggggaggttgacgggagtggtttcgtttggg  
 13770 13780 13790 13800 13810 13820 13830 13840

**Stop *cbzJ*(2) →|**

D A W S V D V T V R R L \*  
 gacgcttggctcggtagatgtgactgtgcggcgtctgtgaaacgacacttgataggtgcggatcgctgcacatcaacccg  
 13850 13860 13870 13880 13890 13900 13910 13920

gtcaacgaacggctccatcaaagacgccagtgacgctgagcggctgcgctgacaccttgaccagtgagcggccggtggag  
 13930 13940 13950 13960 13970 13980 13990 14000

gcgctctacgatggcctgcagagaggtcgagtgacagccaccagccttgctgcggacttcggccgcgatcaaataagcgc  
 14010 14020 14030 14040 14050 14060 14070 14080

ctgccacgggtcgggcgccgagccgacccgcaagcccttctcaagcaactgtatgcctgcaaggggtatccgcttagct  
 14090 14100 14110 14120 14130 14140 14150 14160

ccatcagccccattgacactgcgatttcatccagcaatggatccgattgcctctccccgggtgttcttctcagacatc  
 14170 14180 14190 14200 14210 14220 14230 14240

cccatacgtcactggcggcgtcaccaccgcttgctgcagcaagcggttaaaccagcatcccgcgtgagctggatgtgcgcc  
 14250 14260 14270 14280 14290 14300 14310 14320

ggttgaacggaacacgaattcatcgagataggcgtccaggtgttcgggttgacagaaaccggtgcttcccagcacc  
 14330 14340 14350 14360 14370 14380 14390 14400

cagtgtgtaccaacgagggcgacccggtgcactcccgcctagagacatgggggtctcctcggtttcagtgcaataagtgga  
 14410 14420 14430 14440 14450 14460 14470 14480

**106 bp IS-Element von IS1071**

cggtacgcaaaagctagcactggcgcggggggtgctcgggtagaccggttgatttcattgactttcctggttcgcttgtaaa  
 14490 14500 14510 14520 14530 14540 14550 14560

**Start *tnpA*(3) →**

M Q G W H T T F L G M R G L P  
 cgggtatgggtggcctcccacttttgaggttcacgatgcagggtggcacacaacgttttggggatgctgggctcccc  
 14570 14580 14590 14600 14610 14620 14630 14640

R D I S D F E M K A F F T F D G A E R D A I N A R R G  
 gcgatcagcgcacttcgagatgaaggcattttcaccttcgatggtgccgagcgcgacgcaatcaatgcacgcggaggt  
 14650 14660 14670 14680 14690 14700 14710 14720

**Unterbrechung von *tnpA*(3) →|****Beginn von Tn5501 →**

D S H K L G L A L H I  
 gattcccacaagcttggctcggcgtccatattgggggtgtaagccggaaccagaaaatttccgctcagccgatcaacat  
 14730 14740 14750 14760 14770 14790 14800

ggcttgctcgcgcttggctgatgagtctctgcatgccccgatgacttcttcgtgggtgtacgacttggcgttggggctc  
 14810 14820 14830 14840 14850 14860 14870 14880

gtcggcctcctcgagagcttctcgacctcggggtcatccgcgcatattcttcggccacagcgttgcctccatgcgca  
 14890 14900 14910 14920 14930 14940 14950 14960

gcgacgctgcccagcaggtgcagcagggcgaacagccgcatgtcattgggtggcagcagctgctctcgaatccgctcc  
 14970 14980 14990 15000 15010 15020 15030 15040

tggatcacctcgcaggccccgatgcgctctggcgtgcgctgcctcgttagccggctgggagttctgcttcttcagcgt  
 15050 15060 15070 15080 15090 15100 15110 15120

---

```
tcgcgcccaagcgatagccagcgcctcgatggtggacagggttcatttgctcatccacttgcgcagcagacgctttttcag
 15130      15140      15150      15160      15170      15180      15190      15200

ggaggcgcgctcttgcgattgcgtcccttggtggcaatgcgatccgccgtggcgccctggcgcttgatgggccagt
 15210      15220      15230      15240      15250      15260      15270      15280

aggagcggccatccttaccatcgaccagacgcttgctgacctggttttccagtagaggcagatggcgcatagagcttcc
 15290      15300      15310      15320      15330      15340      15350      15360

ggcgacgcgctggccagcgcggtgcgctcgtgagttcgccagcgcgtgatgccagagtttcttgctcctcgcgctcgctacg
 15370      15380      15390      15400      15410      15420      15430      15440

gcaggcgtgtgcccacgatgggcgttttgcgcggtgcggtcatgatgtggttgtctccaagaa
 15450      15460      15470      15480      15490      15500
```

## 8.2 DNA-Sequenz des *meta*-Operons von *Ps. putida* Stamm GJ31

Angegeben ist die in dieser Arbeit ermittelte DNA-Sequenz des *meta*-Operons von Stamm GJ31 sowie die identifizierten offenen Leserahmen und deren abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Start und Stopbereiche der einzelnen Gene sind beschriftet. Postulierte Promotorbereiche sowie Hairpin-Strukturen als mögliche Terminations-signale sind fett gedruckt, letztere zusätzlich weiß gedruckt und grau hinterlegt. Potentielle Transkriptionsstartpunkte sind zusätzlich durch einen Pfeil gekennzeichnet.

L Q M Y G A G L R H G G L Q Y T L M L A T N R N D V  
 g t t a a c t g c a t g t a t c c a g c g c c c a a g c g g t g c c c a c c c a g c t g g t a g g t g a g c a t c a a c g c g g t g t t c c g g t t g t c t a c  
 10 20 30 40 50 60 70 80

K G A K S A G D E R S D Y F R F D S T L R G P G I E R  
 c t t c c c a g c t t t c g a a g c a c c g t c t t c g c g c g a a t c a t a a a a g c g g a a a t c a g a g g t c a a t c g a c c a g g t c c g a t t t c g c  
 90 100 110 120 130 140 150 160

N D V F G V Y N K D Y I D E L Q A Y Y Y K L T L N K  
 g g t t g t c c a c g a a g c c g a c g t a g t t c t t g t c g t a g a t a t c t t c a a g c t g c g c g t a g t a g t a c t t g a g g t a a g g t t c t t c  
 170 180 190 200 210 220 230 240

S W A Y D G G L F Y F T D S E A A G N F R G N P A A V  
 g a c c a c g c g t a a t c g c c t c c c a a g a a a t a g a a t g t a t c a g a t t c a g c t g c c c c a t t g a a g c g g c c a t t a g g t g c c g c t a c  
 250 260 270 280 290 300 310 320

R M K Q Y D T S D R L N I R D L W G A H L S L G D I D  
 c c g c a t c t t c t g g t a g t c a g t c g a g t c a c g c a g g t t g a t t c g g t c a a g c c a c c c a g c a t g c a g c g a c a g g c c a t c a a t g t  
 330 340 350 360 370 380 390 400

Q S R L Y T G R F T Q P L L R T P S A F A I P L F T  
 c c t g c g a a c g t a g g t a g g t g c c a c g g a a g g t c t g c g g c a g c a g a c g g g t t g g a c t c g c g a a g g c a a t t g g c a g a a t g t a  
 410 420 430 440 450 460 470 480

S V T G Y Q L E T K S I K M K A T L G L E S Y D R A P  
 c t g a c g g t a c c g t a c t g a a g c t c g g t c t t g g a g a t c t t c a t t t t g g c t g t c a a a c c c a g c t c g g a a t a a t c c c t g g c t g g  
 490 500 510 520 530 540 550 560

E R T S A S F P L L G T G V R D S S S D L R L G M M A  
 t t c t c t g g t g t a g c c g a a a a g g c a a c a g a c c c g t t c c g a c c c g a t c a c t c g a c g a g t c c a g t c g t a a c c c a t c a t g g  
 570 580 590 600 610 620 630 640

Q A D M G F G V P G D T F G S S F N V I F G Q A W E  
 c t t g a g c a t c c a t a c c a a g c c c a c c g c c c g t c a g t a a a g c c g g a a g a g a a a t t g a c g a t g a a t c c t t g g g c c a t t c c  
 650 660 670 680 690 700 710 720

R A A A Q P T E N I Y N R D F Y Y N R L T A K A K S D  
 c g g g c a g c a g c t t g c g g g t c t c g t t g a t g t a g t t g c g g t c a a a g t a g t a g t t g c g c a g g g t g g c c t t g g c t t t c g a g t c  
 730 740 750 760 770 780 790 800

← Start ORF1  
 E I F G A A Q I S T A Q A V L L G A L A A T R S R S M  
 t t c g a t g a a t c c c g c c c t g g a t g g a a g t c g c c t g t g t a c a a g c a a g c c t g c t a g g g t g c a g t t c t a g a t c t g t c a  
 810 820 830 840 850 860 870 880

← Stop ORF2  
 \* V V S A K L E P S K K  
 t g t c g t g t c t t c t t t t t t g t t c t t g t t g g t g a a g c t g g a g g t t c a a a c c a c g g a a g c t t t c a g c t c a g g g c t t t t t t t  
 890 900 910 920 930 940 950 960

L S S L Y F L S I A A L V I G P A S A L M V G S A G A  
 t a g t g a c g a c a g a t a g a a c a c a g a t g g c g g c g a g c a c g a t t c c a g g t g c a g a a g c c a g c a t g a c a c c g c t c g t c c t g  
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

G L V M M K G V V L P G A M A G V R G V A V A A G T  
caccgagaaccatcattttccctaccacgagagggcccgccatcgcacctaccggccaacggccactgctgcaccgggt  
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120

G T A R G N A P Y F Q P A L A Y L V C Q G G T T F I G  
ccggttgcgcgccggtggcgggatagaattgaggtgcgagcgcgtaaacgacgcattgcccgcagttgtgaagatccc  
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

A L F G A G I M A P L S I A A T L C A L S V L I G G Y  
cgcgaggaagcctgcccgaatcatggctggcagggagatagcagcagtcaggcagccagggaaacaagaatgccgcat  
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280

V L G P M A W I P L R D M A V G L M L T G V A A G L  
aaaccaaccctggcatggccagatcggaagccgatccatggcgacaccaacatcagggccccaccgagcacctaac  
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360

Q M S L V V I S A E S P K F G Q G I L I S P L W N I L  
tgcagggacaatacgaacaatgcttgcctcgctcggcttgaagccctgcccgatcaaaatgctcggcagccagttgatcag  
1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440

I Y T V M L T F F F S V W L L L T I K L T G G D V L I  
gatgtagtgaccatgaggggtaagaagaagctaaccataacagcaaatgattttgagcgttccaccgtcaacaaaa  
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520

S K T T P I E T S A V Q A N A Q K Y L D P L Y L L L  
tgccttggtagtagggatttcggctgaagcgcacttgagcatttgcctgcttgtacaaatcagggagatagagaagcagc  
1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600

L P V I V L P V V G G V Y F V L K W G V G F D L L G I  
agcgggacgataaccagaggcacaactccgcccagcgtaaaaaacaagtttccagcctacgcaaaatcgaggaggccaat  
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680

A A A L A A G L P V G C Y M L S V A T G R M R E G A A  
ggctgcagccaaggccgacccagcggaacaccgcagtacatcaagctaacagcagtgccacgcatgcgctcgccagctg  
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760

E S A L A I L N P L S A G L G V G T M L R A F L L A  
cctcagaagccagggcaatcaggtttggcagcagatgcgcccaatcccaccccggtcattagccgagcaaacagcagcgcg  
1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840

S F S W A I T T V L S F V G F L A V S V I L V K K R G  
ctgaagctccagggcattgtcgtgacgagcagagaacacaccgaatagtgccaccgacacgatgagcactttttttcgacc  
1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920

Y R D A L R G G I F A G P L M G L V G V S F V W G M Q  
gtatcggctggcaagtcggccgccaatgaaggccccggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000

L K D L G F D A S M G H A A I G P A Q L D L G E M L  
gcagtttgcagaccgaaatcggcagacataccatgcgctgcgattcccgggtgcttgagggttaagccctccatcaag  
2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080

← Start ORF2

A V L F C L A I T I F L K T K D T K D T M  
gcaaccagaaaagcacagtgcatagtgatgaagagtttggcttatccgttttgtcagtcagtaagcaacccttccaaagc  
2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160

tctcagaaaacttcggaacacaaagtgattgggtgtgaaacgctggaaagtcaggtaagcgaagacgctcatcagacac  
2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240

tcacaatgtgagaggtgcactcaaatcgcgcagcgtattctgggggtgctgacgacgatactttggcaaggcattcatat  
2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320

tgtaaagctctcttattgtttgtgc**T-Box** **inverted repeat** **ttaaaaccccctccctgaaggaagggg**catcgctgcggaacagcttgcgtggagct  
 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400

← Stop *cbzK*

\* R K L L D L A V D V I M D E Q G G V M R R K  
 gtctgcaacctcagcgcttcagcagatccagggcgagctcaacgatcatgtcttcctgaccgcccaccatccggcgctt  
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480

G L E V L I D V A K I G Y R A S A V E A H R L F S S Y  
 gccaaagctcaacgagaatgtcgacagccttaatgccgtagcgagccgaagctacctccgcatgacgaaggaagctggagt  
 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560

V G A Y G L A L T E R D I R V P R D Q L P R V L D D  
 acacgcccggcgtaacctagagccagggtttcaggtcgatgcgcactggcgatcttgacgtggacgcaccagatcatct  
 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640

A A D M L A Y L D T G H N W G L K N A A A I F V E L P  
 gcagcatccataagggcgtagagatcagtgccgtggttccaaccagcttgttcgcccgcgaataaatacttcagcgg  
 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720

A N G A G A G M G S L S V D I R D C R Q E V A V I S N  
 ggcgttacctgcaccggcgcccataaccggaaaggtgacatcaatccgatcacaccgttgttcgacggcaacaatcgagt  
 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800

A V G L S L N H H A H I G T H T A P D L V A K V A R  
 tggcaacaccgagactcaagttatgggtgggcatggatgccggtgtgggtagctggatcgagaacagctttgacagcacgg  
 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880

F R A R I D E M N M A G G S D V V Y I C T A G Y S E M  
 aagcgcgcggatgtcctccatgttcacgcaccgcctgagtcacgcagtagatgcaggtggcaccgtagctttccat  
 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960

L K A Q Q A L G E P D A Y P E D H P L R G H G D G L E  
 cagcttcgcctgctggcgagaccttcagggctgcatatggctcatcatgaggaagccgaccgtgtccatccccaaagct  
 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040

R A Y E I H Q K S V D A E T C H T A V R V V R A G A  
 cacgggcatattcgatgtgctgcttcgacacatcagcttcgggtgcaatgggtggctacacgaaccaccgagcaccggcc  
 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120

A Y A A K L D H L T G I G P L L L T A I K A H K V V D  
 gcataagctgctttgagatcgtgcagagtaccgataaccaggaagcagcagggctcgcatcttgccgtgtttgacgacatc  
 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200

A A A E I W E I D T H A G F G Y N F S S G Q L G D G H  
 agcagcggcttcaatccactcgatgtcggtatgcgcacaaaaccgtagttgaagctggaacctgcaggccatcgccgt  
 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280

A V E I S D V K A A D L A R A I A Q V Q D L S Y Q H  
 gagccacttcgatagaatccactttggcagcatcaagcgcgcgagcaattgcttgcacctggccagcgaataactgatgg  
 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360

← Start *cbzK*

← Stop *cbzQ*

R I A H M G D R L T V D S I Y L K K G N M \* A  
 cgaatggcgtgcatgccatcgcgagggtcacatcggagatgtagagctttttaccgctcataactgcgctcctcagggc  
 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440

Q S M S Q A M R E A T A L A A S T M I D L N G A Y A P  
 tggctcatcgactgtgcatgcttcagcagtcgccaacgcagcagaagtcagatgtcgagattgcccgcatacgcgg  
 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520

L Y H A A G E V E I F V S T K L G S F E G H G P I N L  
 cagataatgggacggcccttcaacctcgataaacacagaggtcttcagaccgctgaattcgccgtggcctgggatgttca  
 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600

P A T D P I V E F Q V K Q K L R Y G P V Y A N V A A  
 cgggcgccgtgtccgggatcacttcgaactgcactttctgcttcaaccgatagcccgggtacataagcattcaccgcagca  
 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680

V M E E I S A E V H D Q D A A E S L V Y V T D R M M L  
 accatctcttcgatggaggcctcaacatggcttggctgctgcttcagaaaggacatacacagtgtcacgcatcatcaa  
 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760

P P E A P N M I I I A K G K A A G G I A E I A K S T T  
 cggcggtccgctgggttcgatgatgatggctttaccctttgccgcaccgcccgatcgctcgtatggccttcgaggtgg  
 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840

E T F E D I N A R T G P G A S K S A I S A V I E A Y  
 tttcagtgaactcgtcgtatgttcgctcgcagctacctggaccagcggatttagaggcaatcgatgcaacaatttccgcgtaa  
 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920

H V K A V R S V A A V M P I T A Q G G C T V M N L N E  
 tgcactttggcgacgcgcgatacagcagccaccatgggaatggctgcttggccgcccgcaggtgaccatgttgaggttctc  
 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000

A N V H Q E L N V V P V C Y P G I A A P T L D I V R I  
 agcgttgacgtgctcaaggtttacgacgggaacgcagtatggaccaatagccgcccggagtcaggtcgatcaccgcga  
 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080

G P K T A R L L A D N K V H A G A S T A D F V F D V  
 tgcaggttgggttggctcgcagcagcgcgtgctttttgacgtgagcaccggcgctagtggcatcgaacacgaaatcgaca  
 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160

D A F E P M K V L G A V G E H T T A V G M R G A R A L  
 tcagcgaattccggcattttcacaagaccgcgaacaccctcgtgggttgcgcaacgccatacagccggcacgggccag  
 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240

G D S A P D I G V M V A M E L H E A N R L I K I M L D  
 gccatctgagggcgggatcaataccgaccatcactgccatttccaagtgcctggcattacgcaagatcttgatcatcagat  
 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320

← Start *cbzQ*

T G V N G S G V I A V K R K T T M  
 |← Stop *cbzJ(2)*  
 \* K L V E T V D V S F  
 cggtgccgacgtttccggagccaacgatggcaactttcagtttggtagtcatttcaaacctccgtcacatcgacactga  
 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400

S V G V R G L G E I E A E F H D G A S V G V M P G L  
 acgacacgcccgactcggccaaggccttcgatttcggcttcaaatgatcaccgcccgtgacacctaccatcgggtcccag  
 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480

A G T L I I D G A K L P E G F E A M T R A L W V A A N  
 gctccggtgagaatgatgtcaccggccttgagaggctcaccgaactcgccatgggtgcccggctagccatacagcagcatt  
 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560

L P N G L C E G G S G S S V V E G N K S M R M T A G R  
 cagcggattaccagcattcaccgcccactgccagagctcacgacttcaccgcttcttgacatgcgcatgggtcgcgcctc  
 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640

L D L G D I R R A P G G L V F C G S S A N D A V T D  
 gcaggtcgagcccgtcgatacgcgagctggaccgcccgaagcgaagcagccactagaagcgttggcagccacgggtgca  
 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720

A F K I N W G E I R S G V V E L A P V V W G T A A I V  
 gcgaatttgatgttccaaccttcgatcgggtgcccgaacttccagtgctgggacaaccagcgggttcagcaatgac  
 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800

D A F T T S A S P L D R E L I L A I E A E I K P Q L V  
 atctgcaaacgtgtagatgcactcggcaggtcacgctccaggattaatgcgatctcagcctcgatcttcgggtgaagga  
 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880

R E F P I V E N D G Y A M D A F L C G F D P Q D V G  
 cgcgctcaaatggaatgacctcgttatcgccataggccatgtcagcaacaagcaaccaagtcgggtgatccacaccg  
 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960

L Q A Q V K P N T L G I K R G V L R R G N A I A Y A Q  
 agctggcctgaacctttggattgggtcaacccgattttgcgggcccaccagacgcccggcattggcaatggcataagcctg  
 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040

N L R Q I A Y A H E V N T A G I V D R L P G V P E G K  
 gttcaaacgttgaatcgcatagggcatgctccacatttggcgccgatgacgtcacgcagtgcccaacaggttcgacct  
 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120

← Start *cbzJ*(2) |← Stop *cbzF*

G E A K R L E A A L R E L T E Q S T N M \* H  
 ttccctcagctttgcgagctcagccgctaagcgctcaagggtctcttgtgaagtgttcacgctgacctcggtcagtg  
 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200

T L F D L V M R N F T D A H E W Q A W H G C K N F V H  
 gtaaggaatcaagaaccatgcggttaaagggtcccgctgctcccactgcccgaatgtccgcacttgttgaacacatg  
 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280

L Q S N S I G A V L R L G T D L P V F R D N R G W I V  
 cagctgggagttagagatgcccagcaaccaggcgcagccgggtgctcagagtggaacgaaacggctcgttacgccccagataa  
 5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360

L T E A N I E G L R H G F D P F Q K L N A A L S A T  
 ccaaggtctctcgtttgatttaccacaagcgatggccgaaatccgggaattgcttcaggttggcggcaaggttcgagtg  
 5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440

F N E L H D K R A L M N D L R T Q F L E E T L D S T D  
 aaattctcaagatgggtctttgccccagcatgttgtccaaccgctctggaacagctcctcagtcagatcgctgggtgct  
 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520

Y V F I S M M K K L N E I T P E R Y L G N L L K I G E  
 gtagacaagatgctcatcttcttgggttttcgatcgtaggctcgcgatacaagccattgagcagtttgatgcctt  
 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600

S P M P V F P S V G G T G G G M L V L K G V R E P W  
 cgcttgcatcggcacaaacgggctcacaccgcccgtaccgctcccacagaccagtttgcaaccgctcctggccag  
 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680

T L S F A V A T H G G M S N G L I H I K D L D L K D V  
 gtcagagagaaggcaactgcggtgtgccccccatggaattaccgaggatgtgaatcttgtccaggtcgagcttctgcag  
 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760

L G K L V R A N L D S R S G T S V I S D S K S W G P C  
 cagacctttgagcacgccccgcttcagatcagagcgagagccgggtgctcacgatcgaatcgcttttgctccaacctgggc  
 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840

D M L I V R F G A N V L P E I N R N F N A W G S A G  
 agtccatcaggatgacgcgaaagccggcgtttaccagtggtcgtatgttccgattgaagtggcccagccactcgcacca  
 5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920

P G S G H L M V V T E K G E G C D N Y H I N L D L D G  
 ggacctgagccgtggagcatcacaacgggtttcttgccttcaccgagtcggttagtgatgttcaaatccagatcgcc  
 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000

D Q I R V F K S T E K E T I A T V I L D G H L H I L A  
 |← Stop *cbzE*(2)  
 \* R  
 atcctggatgcgaacgaatttgcggtttctttttcagtgattgcagtcacgattaagtctccgtgaagggtgattagcg  
 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080

← Start *cbzF*  
 P H A C Q Y L R L R R D V  
 Q T H A S I S G F G A I W E P I P R Y Y R D T A T Y A  
 ctgggtgtgcgcactgatagagccgaagcctgcgatccactcaggaatcggtcggtagtagcggtcggtagcggtgtagg  
 6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160

G H A A L A S F A A V W A K V E H T S K G A L E S L  
 cgccgtgagccccaaggccgaaacgcagcagccagccttgacctcatgcgtcgtattgcccggccagctccgagaga  
 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240

H S N S L D D L Q S V L D Q E V V D L F Y Q D W K P N  
 tgggagttactgaggatcaagctggctcaccagatcctgctcaacgacatccaggaagtagctgatccacttgggatt  
 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320

L P H L T N Q D E V F R E A A V V V Q Q T R A D R E E  
 cagtggatgaagggtgttctgatcttcaacaaatcgttcagcagccacgacgacttgttgagtacgggcatcgctctt  
 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400

P P L D R G S G M L R D A M R A D V K A L E P V P P  
 caggcgtagatcccaccactgcccacagccggctgcggccatgcgtgcatcgaccttggccaactctggcactgggggc  
 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480

Q H S L G G S G L F L V R K N L G R T F R G I A E G L  
 tgatgagacagcccggccgagcccaagaacagcaccgcttgttgagcccgcgggtgaagcggccaatcgcttaccgag  
 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560

L R V R E F T P L P P A V C N V F V P L V P Y K D L G  
 caaccggacacgctcaaacgctcggcagaggtggtgccacacagttcacgaaaacaggaagaacgggatatttgcaccgac  
 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640

G L L F E L P Q A F G H D V Q M R Y S V A L D I G S  
 cgccgagcagaaaactcaagtggctgagcgaagccatgatgcacctgcctctgtaggacacggccagatcgattcccagc  
 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720

T L V S E A C A E A L E K P V S L T G V L S G F D G I  
 gtcagaacagatcagcacaggcttcggcaagtcttgggtacagatagcgtgcccagcaagtgaaacaaaatcgccgat  
 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800

A E A A M G L C F P P M V D Y F F G N Y H D P A F L V  
 agcttccgcccatacctaagcagaaaaggcggcatcagctcgtagaaaaagccggtttagtgatcaggcgcaagagca  
 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880

V L E P N F A E I R A R A A R V V E A V E D L V D Q  
 ccacgagctctgggtgaaggcctcgcactccgcgctcagcggcccgaaaccacttcggccacttcacccagcagctcttgg  
 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960

T P D F H G I L P T H S L C H L Y A N M P V S G K R R  
 gttgggtcgaaaatgcccataaggggggtgtgcgacagccaatgtaggtaagcgttcatcggtacggaacctttacgtcg  
 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040

← Start *cbzE*(2)  
 H G L A P R R A S P R C S R F G S V G M L R R S L A M  
 atgccccagtgaggccgctcgcactgggacggcatgagcggaaaccctgatacggccatgaggcggcgggataacgcca  
 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110 7120

-35-Region (gntR) -10-Region ↗  
 tgcaggtagatttgtgtgtctgcccaatcatcatgcacgctagaatgcttagcatgcaagtacaacaaggcccgcctcat  
 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200

cgctctgtgatcgaccgccagcaccagaacgagagcagcccgcgacgagcgacaacagcgaatgactgaaatctgg  
7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280

**Start *gntR* →**

⏪ **-10-Region** (*cbzE(2)*) **-35-Region** M

tttactatcagaaatgctagaatgtaagcctgatcctgacatcaattcgcaacaaccgacctgggaattcgactcgaatg  
7290 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360

Q V A N K K T A I Y Q H I L E R L L T C R Y E F G Q K  
caagtggcaataaaaaagaccgctatctaccaacatatcttggagcgcctactcacttgccgatatgagttcgggcaaaa  
7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440

I L V K E I G E E T G V S R Q P I M T A L N S L Q E  
gattctgggtcaaggaaattgggtgaagagaccggagtcagccgaccgacccgatcatgactgcactgaacagcctgcaagaaa  
7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520

R G F V V I T A Q V G C E V V H P T Q L E V A D F Y E  
ggggcttcgtgggtgatcacggcccaggtcggatgccaagtggtacaccctactcagttggaggttggcggatcttctacgag  
7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600

M F A N N E A L I A G L A A E R G S P E E V L R M T E  
atgttcgcaaaacaacgagcactcattgccgggcttcgagccgagcgcgggatcgcccgaagaagtcttgagaatgaccga  
7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680

I N D K I R S I N P Q H S D A S E S Y R A L N V D F  
aatcaacgacaaaatcaggagatcaatccgcagcacagtgacgcacccgaaagctatcgcgcgctcaatgtcgacttcc  
7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760

H R L L H S M A K S P I L S A R Q I A N F E L S D F F  
atcgactgctgcactccatggctaagtctcccatccttccggcccgtcaaattgcaactttgaattgtccgacttcttc  
7770 7780 7790 7800 7810 7820 7830 7840

I V Q T C G F Q V H L G A A T D E H D G I I A A L K T  
atcgtccagacttgccggtttcaagtacacctggcgagcagacagatgagcacgatggaattattgcagcgctgaaaac  
7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920

R N K K A A A E A A A S H I H S V A R D V A S K M S  
tagaaacaaaaaggccgagccgaagcggctgagccatattcatagcgttgccgaggatgtggcttctaaaatgtctg  
7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000

**Stop *gntR* →**

A D A K L A S \*

**← Stop ORF3**

\* L P F A F E L W L S D G K P G N R V S T  
ccgacgcgaagcttgccctcatagaggaagcgaactccagccagagagaatcaccctgggaccggttctaacggaggt  
8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080

E R M W K L V V G S T Q D F A Y F I Q P G I A F K R L  
ctcgcgcactccacttcaagacaaccccagaggtttgggtcaaaggcgtaaaaaatctgcggcccgatagcaaatattgcgca  
8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160

R N G D D L E G H D W Q D D T V Q K T Y Y G V L G L  
ggcgatttccatcatccagctcaccgtgatcccactgatcatcggtgacctgcttgggtgtagtagcccaccagaccaagc  
8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240

Q V K P N S Q L R Y G L L Y D I N L V N G S R Y D T D  
tggaccttcgggttcgactgcagtctgtatcccagtaaagtgcgatgttcagcacggtccctgaccggtagtcagtgct  
8250 8260 8270 8280 8290 8300 8310 8320

D N K A N I T F T P A V S V E W D P H P F W T L D F E  
atcggtttttgcgttgatgggtgaaggtggggctactgagacctccagctctgggtgcgggaaccaggtcagatcgaact  
8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400



### 8.3 DNA-Sequenz des oberen Abbauweges von *Ps. putida* Stamm GJ31

Angegeben ist die in dieser Arbeit ermittelte DNA-Sequenz des oberen Abbauweges von Stamm GJ31 sowie die identifizierten offenen Leserahmen und deren abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Start und Stopbereiche der einzelnen Gene sind beschriftet. Die postulierte Aminosäuresequenz des C-Terminus von CbzE(3) ist kursiv gedruckt.

accatccggttctgaaagcacgtcatcggcaattgcctgccaagtaccgcgccatccactaccttgaaaagtgagaagacaa  
 10 20 30 40 50 60 70 80

**Start *cbzAa* →**

M N Q T D T S P I K L R R S W N T S E I E A L F D E H  
 tgaatcagaccgacacatcacctatcaagctgvcgagagctggaacaccagcgagatagaagcgctctttgacgagcat  
 90 100 110 120 130 140 150 160

A G R I D P R I Y T D E D L Y Q L E L E R V F A R S W  
 gcggacgtatcgatccgcgcatttataccgatgaggatctgtaccaactcgaactggagcgtgtcttcgcccggctcctg  
 170 180 190 200 210 220 230 240

L L L G H E T Q I R K P G D Y I T T Y M G E D P V V  
 gctgctgttggggcatgaaaccagattcgcaagccggggcattacatcacgacctacatgggggaagaccctgtcgtgg  
 250 260 270 280 290 300 310 320

V V R Q K D A S I A V F L N Q C R H R G M R I C R A D  
 tcgtccggcagaaagacgccagcattgcccgtgttcctgaaccagtgccgccaccgtggcatgvcgcatctgccgcgcggat  
 330 340 350 360 370 380 390 400

A G N A K A F T C S Y H G W A Y D T A G N L V N V P Y  
 gccggaacgcgaagggcgttcacttgacgtaccacgggtgggcttacgacaccgcggcaatcttgtcaatgtgcctta  
 410 420 430 440 450 460 470 480

E A E S F A C L N K K E W S P L K A R V E T Y K G L  
 cgaggcgaatccttcgctgcctgaacaagaaggaatggagcccgcctgaaggcccggtagaacctacaagggcctga  
 490 500 510 520 530 540 550 560

I F A N W D E N A V D L D T Y L G E A K F Y M D H M L  
 ttttcgccaactgggatgagaacgctgttagacctgcacagctatctgggagggcgaagtctacatggaccacatgctc  
 570 580 590 600 610 620 630 640

D R T E A G T E A I P G V Q K W V I P C N W K F A A E  
 gaccgcaccgagggccgcgaccgaagcgatcccgggctgcagaagtgggtcattccctgtaactggaaatccgcgcgaga  
 650 660 670 680 690 700 710 720

Q F C S D M Y H A G T T S H L S G I L A G L P E D L  
 gcagttttgcagcgacatgtaccatgccgggacgacctgcacatctgttggcatcctggcaggcctgccagaagaccttg  
 730 740 750 760 770 780 790 800

E M A D L A P P T V G K Q Y R A S W G G H G S G F Y V  
 aaatggccgaccttgctccgcccagcttggcaagcagctaccgtgcctcatggggcggacatggaagtggcttctatgct  
 810 820 830 840 850 860 870 880

G D P N L M L A I M G P K V T S Y W T E G P A S E K A  
 ggcgaccccaatctgatgcttgcctatcggggccaaaggctaccagctactggaccgaaggcccgcgctcggaaggc  
 890 900 910 920 930 940 950 960

A E R L G S V E R G S K L M V E H M T V F P T C S F  
 ggccgaacgtctgggtagcgtggagcgcggctcgaactcatggtcagcagacatgacctcttccccagctgttccttcc  
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

L P G I N T V R T W H P R G P N E V E V W A F T V V D  
 tcccaggtatcaatacgggtccggacatggcatccgcgcgggcccgaacgaggtcgaggtatggcggtttacgggtggtcgat  
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120

A D A P D D I K E E F R R Q T L R T F S A G G V F E Q  
 gctgatgctcctgacgatataaggaagagttccggcgcagacgctgcgcaccttctctgcccgggtggcggtggtcgagca  
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

D D G E N W V E I Q H I L R G H K A R S R P F N A E  
 ggacgacgggggagaactgggtcgagatccagcacatctcgcgagggccacaaggcgcgcagccgccctttcaatgccgaga  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280

M S M D Q T V D N D P V Y P G R I S N N V Y S E E A A  
 tgagcatggaccagaccgtcgacaacgaccgggtttatcccggcggatcagcaacaacgtctacagcgaggaagctgcc  
 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360

**Stop cbzAa →**

R G L Y A H W L R M M T S P D W D A L K A T R \*  
 cgcgggctctatgccattgggtgcggatgatgacatccccgactgggacgcgctgaaggcgacacgggtgaatccagag  
 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440

acagcttgcgccacgcagtgggcggcggccagagggccgcatcttgacttcgacccaggttgatgcgggtggaccttggccat  
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520

**Start cbzAb →**

M I D S A N R A D V F L R K P A P V A  
 ttgaaatctacaaggaacgacctgattgattcagccaacagacggcagctcttctccgcaacggcggcaccctgtagcgc  
 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600

P E L Q H E V E Q F Y Y W E A K L L N D R R F E E W F  
 ccgaactgcagcacgaagtcgagcagttctactattgggaggccaagcttctcaacgatcgccgcttcgaggagtggttc  
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680

A L L A E D I H Y F M P I R T T R I M R D S R L E Y S  
 gcgctgctcgcggaagacattcactactcatgccattcgcaccacgcggatcatgcgggactcgcgcccttgaatactc  
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760

G S R E Y A H F D D D A T M M K G R L R K I T S D V  
 aggtcccggagagtacgcgcacttcgatgacgacgccacgatgatgaaggacgcttgcgcaagatcacgtccgacgtga  
 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840

S W S E N P A S R T R H L V S N V M I V G A E A E G E  
 gctgggtccgagaaccccgcacgcggaccggcatctcgtgagcaacgtgatgatcgtcggcgcagaggcagaaggggag  
 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920

Y E I S S A F I V Y R N R L E R Q L D I F A G E R R D  
 tacgaaatctcaagcgccttcattgtgtaccgcaatcgtctggagcggcagctcgacatctttgcccgggtgagcgtcgcgga  
 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000

T L R R N T S E A G F E I V N R T I L I D Q S T I L  
 tacggttgcgcgtaaacacgagcgggcccgggttcgagatcgtcaatcggaccatcctgatcgaccagagcaccatcctg  
 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080

**Stop cbzAb →**

**Start cbzAc →**

A N N L S F F F \* M T W T Y I L R Q G D L P P G  
 ccaataacctcagtttcttctaggtgatgcatgacttgacatacatattgcccagggtgacctgccaccgggtg  
 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160

E M Q R Y E G G P E P V M V C N V D G E F F A V Q D T  
 agatgcagcgtctacgaaggcggcccgaacctgtgatggtctgcaacgtcgatggcgagttcttcgcccgtgcaggatacc  
 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240

C T H G D W A L S D G Y L D G D I V E C T L H F G K F  
 tgcacgcatggggactggcggtgtcggatggttacctggacgggtgatattgtcgaatgcacgttgcatttcggcaagt  
 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320

C V R T G K V K A L P A C K P I K V F P I K V E G D  
 ctgCGTgCGgaccGGggaaggtgaagggcgtgcttGcaaacctatcaaggtattcccaatcaaggtcgaagggcgatg  
 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400

Start *cbzAd* →

M A T H V A I I G N G V G G

Stop *cbzAc* →

E V H V D L D N G E L K \*  
 aagtgcacgtcgatctcgacaacggggagttgaagtgatggctacccatgtggcgatcatcggcaatggcgtgggtggct  
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480

F T T A Q A L R A E G F E G R I S L I G D E P H L P Y  
 tcacgaccgCGcaggccctacgtgCGcaggggcttcgaggggagaatctcgctgattggggacgaaccgcatctcccctat  
 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560

D R P S L S K A V L D G S L E R P P I L A E A D W Y G  
 gaccgaccatccttgtccaagggcgttctcgacggcagccttgagcggcggccatactggccgagggcgattggtacgg  
 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640

E A R I D M L T G P E V T A L D V Q T R T I S L D D  
 cgaggcccgcatcgacatgctgaccggcccgaagtcactgccccttgatgtgcagacaaggacgatcagtctggatgatg  
 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720

G T T L S A D A I V I A T G S R A R T M A L P G S Q L  
 gcaccagctctctcgCGgacgccatcgtcatcgCGcagggcagtcgagcCGgacgatggcgttgcCGcagccaactg  
 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800

P G V V T L R T Y G D V Q V L R D S W T S A T R L L I  
 cccggcgtcgtaacgctgCGcactacggtagcgtgCGgatttgcCGgatagttggacttccgCGcagcgggctgctgat  
 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880

V G G G L I G C E V A T T A R K L G L S V T I L E A  
 tgtgggtggcggattgatcggctgtgaggtcgCGcagcagggcCGcgaagctcggcctgtcggtcacgatcctggaggcag  
 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960

G D E L L V R V L G R R I G A W L R G L L T E L G V Q  
 gtgatgaactgctggtccgagtacttggcggcgtatcggtgcccctggcCGcggcctgctgacagaacttggtagcag  
 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040

V E L G T G V V G F S G E G Q L E Q V M A S D G R S F  
 gtcgagttgggaaagggtgctgtaggttttctggtgagggccagctcgaacaagtcagggccagcagtgggcagcagctt  
 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120

V A D S A L I C V G A E P A D Q L A R Q A G L A C D  
 cgtagccgatagcgcactcatttgcgtcggcCGgagcccCGgattcaacttgcCGcgaagcgggcttggcagtgacc  
 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200

R G V I V D H C G A T L A K G V F A V G D V A S W P L  
 gcggcgtcattgtcgatcactgCGgtgCGcagccttgccaaaggcgtattcCGcgtcggagatgtggccagttggcCGctg  
 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280

R A G G R R S L E T Y M N A Q R Q A A A V A A A I L G  
 cgcCGcggcggcggcgttctcgctcgaaacctatatgaacCGcagcCGcgaagcCGcgggctgCGcggccattctggg  
 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360

K N V S A P Q L P V S W T E I A G H R M Q M A G D I  
 gaaaaacgtatcggcaccgcaactgcccgtgtcctggacggagatcCGcgggcatcCGatgcagatggcggggcagatcCG  
 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440

E G P G D F V S R G M P G S G A A L L F R L Q E R R I  
 aaggacctggtgatttctgctcCGcggcagtcCGcggtagtggcCGctgcccctgtgttctgctcagagcgaaggatt  
 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520

Q A V V A V D A P R D F A L A T R L V E A R A A I E P  
 caggcggctcgtcgcggctgatgcaccccgctgacttcgcgcttgcaccccgattggtagaagcccgcggaatcgagcc  
 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600

Start *cbzB* →

V R L E G

Stop *cbzAd* →|

A R L A D L S N S M R D L V R A N E G D L T \*  
 agcacggctggcagatctttcaaacagatgacgagcttctgttcgctgcaatgaaggagacctaactgagacttgaagg  
 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680

E V A L V T G G G A G L G R A I V D R Y V A E G A R  
 cgaagtggccttggtagcaggcgggtggcgcaggcctgggcagagcgcgatcgtggatcgttatgtcgcggaagggtgcgcgctg  
 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760

V A V L D K S A A G L E A L R K L H G D A I V G V E G  
 tcgcagtgctggataaatccgcggcaggcctggaagcctcaggaaactccatggcagatgcaatcgtggcggtggagggg  
 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840

D V R S L D S H R E A V A R C V E A F G K L D C L V G  
 gatggttcgctcgcctcgcagccatcgtgaggctgtggcccgcctcgcgcaagcgttcgcaagctggactgcctgggtgg  
 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920

N A G V W D Y L T Q L V D I P D D L I S E A F E E M  
 caatgctggcgttgggactacctgacccaactgggtgatattcccgacgacctcatctcggaggcattcagggaaatgt  
 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000

F E V N V K G Y I L A A K A A L P A L Y Q S K G S A I  
 tcgaggtcaatgtcaagggtacatcctggcggcaaggctgcgctacctgcgctttatcagagcaaggcagcgcgata  
 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080

F T L S N A G F Y P G G G G V L Y T A G K H A V I G L  
 ttcactctgtcgaatgccgggttctaccggggcgggtggcggtgttctgtatacagctggcaagcatgccgtgattggatt  
 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160

I K Q L A H E W G P R I R V N G I A P G G I L G S D  
 gatcaagcagctcgcgcacgaatggggccgcgtatccgcgcaacgcgcatcgcgggggtggcattttggggagcgcgatc  
 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240

L R G L K S L D L Q D K S I S T F P L D D M L K S V L  
 tcgcggggctgaagagccttgatttacaagacaagagcatttcgacctttccattggacgacatgctgaaatccgttctt  
 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320

P T G R A A T A E E Y A G A Y V F F A T R G D T V P L  
 ccgaccggggcggccgactgcccaggaatacgcggcgcctatgtcttcttcgcgacgcgcggcgacacgggtccgct  
 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400

T G S V L N F D G G M G V R G L F E A S L G A Q L D  
 caccggtagcgtgttgacttcgatggcggcagtgggcgtgcgcttggcttgcgaagccagcctaggcgcacagctcgaca  
 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480

Stop *cbzB* →|

Start *cbzE(3)* →

K H F G \* M S I Q R L G Y L G F E V A D V R  
 agcacttcgggtgagacaggagaagtgtcatgagcattcaaagattgggctacctcggcttcgaagtcgcagatgtgcgt  
 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560

S W R T L A T T R L G M M E A S A S E T E A T F R I D  
 tcattggcgtaccctcgcactaccaggctggggatgatggaagcctcagccagcagagcggaggcagcgtttcgaatcga  
 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640

S R A W R L S V S R G P A D D Y L F A G F E V D S E  
 ctcacgtgcctggcagctgtcggctcagcagaggccccgcagacgactacctgttggcgggtttcaggtggatagtgaa  
 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720

vorzeitiger Stop *cbzE(3)* →|

Q G L Q E V K E S L Q A H G V T V K V E G G S \*  
 E L I A K  
 aggggctacaggaggtcaaggaaagcctgcaggccacggcggtaccgtcaaggtcgaaggaggagctgattgccaaac  
 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800

R G V L G L I S C T D P F G N R V E I Y Y G A T E L F  
 gcggtgtgcttggttgatttcatgcaccgatccgttcggcaatcgctcgagatctactacggtgccaccgaactgttc  
 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880

E R P F A S P T G V S G F Q T G D Q G L G H Y V L S V  
 gagcgaccattcgcttcgccaccgggtgtttctggatttcaaactggagaccagggttaggtcactatgtgttgagcgt  
 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960

A D V D A A L A F Y T K A L G F Q L A D V I D W T I  
 cgcagatgtggacgcagcgtcgccttctataccaaggcattgggctttcagcttgccgatgtcatcgactggaccattg  
 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040

G D G L S V T L Y F L Y C N G R H H S F P F A K L P G  
 gtgacgggttatccgtgaccctcacttctgtactgcaatggcgtcaccactccttccccctttgccagttgccggga  
 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120

S K R L H H F M L Q A N G M D D V G L A Y D K F D A E  
 tcgaagcggctccatcacttcatgctgcaagctaattggcatggatgacgtgggctggcatacgacaaatttgatgcgga  
 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200

R A V V M S L G R H T N D H M I S F Y G A T P S G F  
 gcgtgcgggtcggttatgtcacttgggtcgacacacgaacgaccacatgatttcgcttctacggtgccacgcctcgggcttcg  
 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280

A V E Y G W G A R E V T R H W S V V R Y D R I S I W G  
 cggctcagtagcggctggggcgcacgtgaggtgacccgccactggctcggtgggtgcgctacgaccgatcagcatctgggga  
 5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360

Stop *cbzE(3)* →| (ohne Punktmutation)

H K F Q A P A \*  
 cacaagttccaggcgcctgaccggccagcctggcgggtgctagtctgcttctacctgcatgcccatatgccagaac  
 5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440

gtgctggacggcagggcagcacacgcaaaaatcctggaaggtgttaatcgagg  
 5450 5460 5470 5480 5490