



BERGISCHE UNIVERSITÄT WUPPERTAL

**Abbau von Chloraromaten in *Pseudomonas putida* GJ31 und
seinen Abkömmlingen:
Charakterisierung von Genclustern auf den Plasmiden**

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von
Dipl. Chem. Kay Frank Thorsten Zerlin
aus Solingen

im November 2004

Die vorgelegte Arbeit wurde im Arbeitskreis „Chemische Mikrobiologie“ von Prof. Dr. Walter Reineke im Fachbereich Chemie der Bergischen Universität Wuppertal im Zeitraum von August 2002 bis Oktober 2004 angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Walter Reineke für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit zur freien und selbständigen Bearbeitung, sowie für sein Interesse an Ergebnissen, dem Fortgang der Arbeit und den hilfreichen Diskussionen.

Herrn PD Dr. E. Schmidt danke ich für sein Einverständnis, die Korreferenz für diese Arbeit zu übernehmen und die kollegiale und freundliche Zusammenarbeit.

Dem Arbeitskreis Chemische Mikrobiologie möchte ich für seine gute Atmosphäre und die Zusammenarbeit danken. Insbesondere danke ich Oliver, Frank und ganz besonders dem „abtrünnigen“ Christian sowie natürlich auch Udo, Sabine, Yvonne, Heike und Petra und allen anderen Mitarbeitern der Chemischen Mikrobiologie für ihre freundschaftliche und helfende Art.

Herrn PD Dr. Ralf Kölling und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung des Isotopenlabors und die Unterstützung bei meiner Arbeit am Institut für Mikrobiologie von Prof. Dr. Hollenberg an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

Meinen Eltern, meinem Bruder, meiner Familie und nicht zuletzt Simone danke ich für ihre Unterstützung, Geduld und Liebe. Ein Dankeschön gilt auch allen andern hier nicht namentlich genannten Personen aus meinem Freundes- und Bekanntenkreis.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mikroorganismen als Helfer im Umweltbereich	1
1.2	Abbauwege in Mikroorganismen	2
1.2.1	Der obere Abbauweg von aromatischen Verbindungen	2
1.2.2	Degradation von Catecholen: Der modifizierte <i>ortho</i> - und der <i>meta</i> -Weg	4
1.3	Genetische Struktur von Abbauwegen und ihre Entstehung in Mikroorganismen	7
1.3.1	Transposons	8
1.3.2	Integrans	11
1.3.3	Beispiele katabolischer Plasmide	14
1.4	Der Wildstamm <i>P. putida</i> GJ31 und sein Plasmid pKW1	15
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Geräte	20
2.2	Biologische und Biochemische Methoden	21
2.2.1	Verwendete Organismen	21
2.2.2	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Pseudomonas</i> sp. und <i>Escherichia coli</i>	21
2.2.3	Anzucht und Stammerhaltung	23
2.2.4	Trübungsmessung	23
2.2.5	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	24
2.2.6	Gewinnung von zellfreiem Rohextrakt	24
2.2.7	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	24
2.2.8	Aktivität der 4-Oxalocrotonat Decarboxylase nach Harayama <i>et al.</i> (1989)	25
2.2.9	Aktivität der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase nach Sala-Trepat und Evans (1971)	25
2.2.10	Aktivität der 4-Oxalocrotonat Tautomerase nach Sala-Trepat und Evans (1971) sowie Harayama <i>et al.</i> (1989)	25
2.2.11	Aktivität der Catechol-2,3-Dioxygenase nach Nozaki <i>et al.</i> (1970)	26
2.2.12	Aktivität der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktase (DHB-Dehydrogenase) nach Reiner (1972)	26
2.2.13	Aktivität der (Chlor)-Acetaldehyd Dehydrogenase nach Shingler <i>et al.</i> , 1992	27
2.2.14	β -Galactosidase Aktivität nach Miller (1972)	27
2.3	Molekularbiologische Methoden	28
2.3.1	Verwendete Kits	28
2.3.2	Verwendete Vektoren und Plasmide	28

2.3.3	Verwendete Oligonukleotide	29
2.3.4	Konstruierte Plasmide	34
2.3.5	Agarosegelelektrophorese	39
2.3.6	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	39
2.3.7	Isolierung von Gesamt-DNA aus Plasmiden	39
2.3.8	Plasmidisolierung aus Pseudomonaden nach Wheatcroft und Williams (1981)	39
2.3.9	Vereinfachte Plasmidisolierung aus Pseudomonaden	40
2.3.10	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> Stämmen	40
2.3.11	Reinigung von DNA	40
2.3.12	<i>In vitro</i> -Manipulation von DNA	40
2.3.13	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach Hanahan (1983)	40
2.3.14	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen modifiziert nach Hanahan (1983) – Rubidiumchlorid-Methode	41
2.3.15	Transformation von <i>Escherichia coli</i> DH5 α	41
2.3.16	Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
2.3.17	PCR gestützte DNA-Sequenzierung (Genom Walk)	43
2.3.18	DNA-Sequenzierung	44
2.3.19	DNA-Blotting nach Southern (1975)	44
2.3.20	DNA-DNA Hybridisierung mittels Digoxigenin (DIG)	44
2.3.21	DNA-DNA Hybridisierung mittels radioaktiver Markierung von DNA	45
2.3.22	Computergestützte Analyse Nukleotid- und Proteinsequenzen	47
3	Experimente und Ergebnisse	48
3.1	<i>P. putida</i> GJ31 und seine Abkömmlinge: Generierung und Eigenschaften	48
3.1.1	Generierung von <i>P. putida</i> GJ31* aus <i>P. putida</i> GJ31	48
3.1.2	Generierung von <i>P. putida</i> QM1 aus <i>P. putida</i> GJ31	49
3.1.3	Wachstum von <i>P. putida</i> GJ31 und seinen Abkömmlingen auf Naphthalin und Biphenyl	49
3.1.4	Isolierung der Plasmide pKW1, pKW2 und pZSG1	49
3.1.5	Prüfung der Inkompatibilitätsgruppe von pKW1 nach Götz <i>et al.</i> (1996)	52
3.2	Der <i>nahINLOMKJX</i>-Cluster aus <i>P. putida</i> GJ31	53
3.2.1	Klonierungsstrategie zur vollständigen Sequenzierung	53
3.2.2	Lage auf pKW1	56
3.2.3	Analyse nichtkodierender Bereiche	57
3.2.4	Analyse kodierender Bereiche	57
3.2.4.1	Das Genprodukt NahI	57
3.2.4.2	Das Genprodukt NahN	58
3.2.4.3	Das Genprodukt NahL	59
3.2.4.4	Das Genprodukt NahO	60

3.2.4.5	Das Genprodukt NahM	61
3.2.4.6	Das Genprodukt NahK	62
3.2.4.7	Das Genprodukt NahJ	63
3.2.4.8	Das Genprodukt NahX	65
3.2.5	Der <i>nahINLOMKJX</i> -Cluster in den Abkömmlingen von <i>P. putida</i> GJ31	66
3.3	Der <i>cbzTEXG</i>-Cluster aus <i>P. putida</i> GJ31: Der Transposonbereich Tn5501	68
3.3.1	Klonierungsstrategie zur vollständigen Sequenzierung	68
3.3.2	Lage auf pKW1	69
3.3.3	Analyse nichtkodierender Bereiche	70
3.3.4	Analyse kodierender Bereiche	72
3.3.4.1	Das Genprodukt TnpR	72
3.3.4.2	Das Genprodukt TnpA	73
3.3.5	Tn5501 und <i>cbzTEXG</i> -Cluster in den Abkömmlingen von <i>P. putida</i> GJ31	75
3.4	Die Chloracetaldehyd-Dehydrogenase <i>aldA</i> aus <i>P. putida</i> GJ31	77
3.4.1	Klonierungsstrategie	77
3.4.2	Analyse nichtkodierender Bereiche	78
3.4.3	Analyse kodierender Bereiche – das Genprodukt AldA	79
3.5	Der <i>benRXABC</i>-Cluster aus <i>P. putida</i> GJ31 und <i>P. putida</i> GJ31*	81
3.5.1	Klonierungsstrategie zur vollständigen Sequenzierung	81
3.5.2	Lage auf pKW1 und pKW2	84
3.5.3	Analyse nichtkodierender Bereiche	86
3.5.4	Analyse kodierender Bereiche in <i>P. putida</i> GJ31 und <i>P. putida</i> GJ31*	88
3.5.4.1	ORF1 aus <i>P. putida</i> GJ31	88
3.5.4.2	Das Genprodukt BenR	88
3.5.4.3	Das Genprodukt BenX	92
3.5.4.4	Das Genprodukt BenA	93
3.5.4.5	Das Genprodukt BenB	95
3.5.4.6	Das Genprodukt BenC	97
3.5.5	Benzoat-Dioxygenase Aktivität: Umsatzraten verschiedener Benzoate	100
3.5.6	Der <i>benRXABC</i> -Cluster in dem Abkömmling <i>P. putida</i> QM1	100
3.5.7	Induktion des Benzoat-Abbaus und des <i>meta</i> -Weges in <i>P. putida</i> GJ31 und <i>P. putida</i> GJ31*	101
3.6	Suche nach einer Integrase <i>IntI</i> nach Nield <i>et al.</i> (2001)	103
3.6.1	Die Glucose-Dehydrogenase Gcd in <i>P. putida</i> GJ31	103
4	Diskussion	106
4.1	Gencluster in <i>P. putida</i> GJ31	108
4.1.1	Der <i>nahINLOMKJX</i> -Cluster in <i>P. putida</i> GJ31	109
4.1.2	Der <i>cbzTEXG</i> -Cluster aus <i>P. putida</i> GJ31 und die angrenzenden Sequenzbereiche <i>tra</i> -Operon und Transposonbereich Tn5501	112
4.1.3	Der <i>benRXABC</i> -Cluster aus <i>P. putida</i> GJ31	117

4.1.4	Spekulation über die Anpassung von Mikroorganismen an Xenobiotika und die Entstehung von Abbauwegen: Die Stämme <i>P. putida</i> GJ31 und <i>P. putida</i> GJ31*, ein Beispiel für die Anpassung an den Abbau von (Chlor-)Aromaten	120
4.2	Der <i>cbzTEXG</i>-Cluster in <i>P. putida</i> GJ31 und in dem Abkömmling QM1	125
4.3	Die katalytischen Schritte des <i>meta</i>-Weges in <i>P. putida</i> GJ31 zum Abbau von 3-Chlor- und 4-Chlorcatechol	127
4.4	Die Entstehung von <i>P. putida</i> GJ31* aus <i>P. putida</i> GJ31: Erklärungsmodelle für die Unterschiede in der Regulation der Benzoat-Dioxygenase-Aktivität	132
4.5	Ausblick	134
5	Zusammenfassung	137
6	Literatur	139

Abbkürzungen

Abb.	Abbildung
Bidest	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
C12O	Catechol-1,2-Dioxygenase
C23O	Catechol-2,3-Dioxygenase
CC23O	Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase
C _i /mmol	Curie pro mmol
Cl	Chlor
CoA	CoenzymA
dATP,	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat,
dCTP,	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat,
dGTP,	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat,
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
DHB	Dihydrodihydroxybenzoat oder 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTE	Dithioerythritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde
HMS	Hydroxymuconsäuresemialdehyd
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kbp	Kilobasenpaare
L	Liter
LB	Luria Broth
min.	Minute
mL	Milliliter
MPa	Megapascal
n	Nano-
NAD ⁺	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x in [nm]
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
pers. Mitteilung	persönliche Mitteilung
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> species

<i>P. stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
RNA	Ribonucleinsäure
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SSC	Sodiumchloride-Sodium-Citrate-
t	Tonne
Tab.	Tabelle
TAE-	Tris-Acetic acid-ETDA-
TE-	Tris-EDTA-
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Trypton Soy Broth
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
w/v	Masse pro Volumen
<i>X. citii</i>	<i>Xanthomonas citii</i>
<i>X. campestris</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>X. autotrophicans</i>	<i>Xanthomonas autotrophicans</i>
ε	Extinktionskoeffizient
μ	Mikro-

Sequenzen dieser Arbeit in Datenbanken

Die Sequenzdaten dieser Arbeit sind veröffentlicht unter folgenden NCBI Acc. No.:

GJ31- <i>nahINLOMKJX</i> :	AY831460
GJ31- <i>benRXABC</i> :	AY831458
GJ31*- <i>benRXABC</i> :	AY831457
GJ31- <i>aldA</i> :	AY831459
GJ31- <i>cbzTEXG</i> mit Tn5501:	AY831462

Abstract

The main topic of this thesis was the organization of the *meta* pathway genes and of the genes for benzoate degradation in *P. putida* GJ31. By cluster analysis it was assumed that it might be possible to clear further details of organization and structure of plasmid pKW1. In this study it was helpful to include progenies of *P. putida* GJ31 such as *P. putida* GJ31* and *P. putida* QM1 with different capabilities.

- The plasmids pKW1, pKW2 and pZSG1 were isolated from *P. putida* GJ31, *P. putida* GJ31* and *P. putida* QM1 and were obtained to have a size of 189 kbp, 180 kbp and 181 kbp by restriction analysis respectively.
- Plasmid pKW1's incompatibility group was analyzed by PCR-experiments reported by Götz *et al.* (1996) and was recognized not to be IncP, IncW, IncQ or IncN.
- A third gene cluster named *nahINLOMKJX* coding for *meta* pathway enzymes was sequenced on pKW1. Its supplements *cbzTEXG*-cluster and *meta*-operon which are located on pKW1, too. There were seven complete open reading frames and one incomplete one obtained from 5.9 kbp nucleotide sequence. Sequence alignments identified the following functions for the respective open reading frames: *nahI* (incomplete): 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase, *nahN*: 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase, *nahL*: 2-oxopent-4-enoate hydratase, *nahO*: acetaldehyde dehydrogenase, *nahM*: 2-oxo-pentanoate aldolase, *nahK*: 4-oxalocrotonate carboxylase, *nahJ*: 4-oxalocrotonate tautomerase, *nahX*: unknown function.
- The genes *nahO* (acetaldehyde dehydrogenase) and *nahK* (4-oxalocrotonate carboxylase) were successfully expressed in *E. coli*. The functions were proved by enzymatic activity tests.
- Downstream of the *cbzTEXG*-cluster on pKW1 in *P. putida* GJ31 a 5.5 kbp complete nucleotide sequence was obtained. It was identified as a Tn5501 like transposon domain. Through sequence alignments it was possible to allocate the following functions to the two complete open reading frames of Tn5501 in *P. putida* GJ31: *tnpR*: resolvase, *tnpA4*: transposase.
- In *P. putida* GJ31 a 2.1 kbp complete nucleotide sequence containing one complete open reading frame was obtained. This open reading frame *aldA* was proven to be a chloroacetaldehyde dehydrogenase. After the successful expression in *E. coli* the function

of AldA was tested. AldA is a NADH-dependent and CoA-independent chloroacetaldehyde dehydrogenase.

- In *P. putida* GJ31 and *P. putida* GJ31* the *benRXABC* gencluster on pKW1 and pKW2 respectively were sequenced. Thereby the nucleotide sequence with a size of 5.9 kbp in *P. putida* GJ31 contains five complete open reading frames and one incomplete one. The obtained 5.1 kbp nucleotide sequence in *P. putida* GJ31* contains four complete and one incomplete open reading frames. Through sequence alignments it was possible to allocate the following functions to the respective open reading frames: GJ31-ORF1: unknown function, *benR*: regulator, *benA*: benzoate dioxygenase subunit-A, *benB*: benzoate dioxygenase subunit-B, *benC* (incomplete): benzoate dioxygenase ferredoxin reductase.
- A difference in two positions of the *benR* nucleotide sequence in *P. putida* GJ31 and strain GJ31* was identified.
- The mutation of two nucleotides of *benR* in *P. putida* GJ31* compared to *benR* in wildstrain GJ31 lead to a change of two positions of the aminoacid sequence of the regulator BenR in *P. putida* GJ31*. The induction of *benR* in *P. putida* GJ31 and strain GJ31* with benzoate and 3-chlorobenzoate was analyzed by the method reported by Cowles *et al.* (2000). There were no differences by the induction of BenR with benzoate or 3-chlorobenzoate in *P. putida* GJ31 and strain GJ31*.
- The turnover rates with different substituted benzoates were measured to be a specific benzoate dioxygenase activity with *P. putida* GJ31 and strain GJ31*. The turnover rates with these benzoates were the same in both strains.
- The inductions of the *cis*-dihydrodiolbenzoate (DHB) dehydrogenase and the catechol 2,3-dioxygenase with benzoate and 3-chlorobenzoate were tested by measuring the enzymatic activity. 3-Chlorobenzoate caused in strain GJ31* the induction of the DHB dehydrogenase in contrast to wildstrain GJ31.
- In *P. putida* QM1 was found, that about 9 kbp nucleotide sequence of the *cbzTEXG*-cluster were cut out and substituted. *P. putida* QM1 is not equipped with the *nahINLOMKJX*- but with the *benRXABC*-cluster like *P. putida* GJ31.

1 Einleitung

1.1 Mikroorganismen als Helfer im Umweltbereich

Mikroorganismen haben eine große Bedeutung für das Leben auf der Erde, da sie als Destruenten für das Funktionieren unseres Ökosystems sorgen: Durch die Zersetzung und Mineralisierung organischer Materie gewährleisten sie die Rückführung von Nährstoffen innerhalb der natürlichen Kreisläufe (siehe **Abb. 1.1**, oben). Die Abbauleistungen der Mikroorganismen kommen in allen natürlichen Ökosystemen vor. Technisch werden diese Fähigkeiten der Mikroorganismen besonders in Kläranlagen genutzt. Mikroorganismen haben damit einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität von Wasser und Boden.

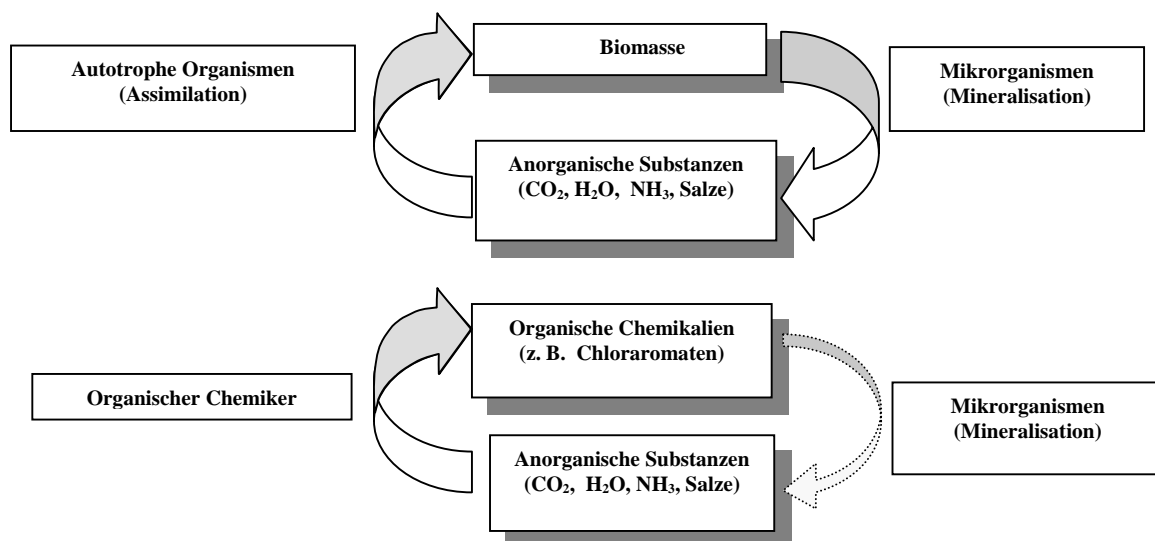


Abb. 1.1: Kreisläufe der Mineralisierung natürlicher organischer und anthropogener organischer Substanzen. Erläuterungen: oben: funktionierender Kreislauf, unten: eingeschränkter Kreislauf.

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte erfolgte die Freisetzung beträchtlicher Mengen anthropogener Schadstoffe in die Umwelt. Hierbei kann es sich um eine bewusste Freisetzung als Agrochemikalien oder unbeabsichtigt durch Produktionsprozesse über das Abwasser oder die Abluft handeln.

Eine großtechnisch universell eingesetzte und deshalb auch in erheblicher Menge freigesetzte Stoffklasse ist die der chlorierten Aromaten. Einige der Öffentlichkeit bekannte, besonders problematische Vertreter dieser Gruppe sind die chlorierten Biphenyle (früher z. B. in Transformatoren), Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane (Bildung bei der Müllverbrennung). Als globale Belastung mengenmäßig bedeutender sind Chlorbenzole (für Synthesen, als

Lösungsmittel) und Chlorphenole (zur Synthese von Herbiziden) mit einem jährlichen Verbrauch von derzeit etwa 700.000 bzw. 150.000 t weltweit (Reineke, 2000).

Trotz des relativ zügigen mikrobiellen Abbaus einer Vielzahl dieser Verbindungen kommt es in vielen Fällen zu einer Anreicherung beständiger, sogenannter persistenter Stoffe. Dies ist eine Beobachtung, die die Grenzen der natürlichen Fähigkeit zum Abbau von Schadstoffen durch Mikroorganismen widerspiegelt. Besonders Chemikalien, deren Strukturelemente oder Substituenten sich von natürlich vorkommenden Verbindungen unterscheiden, entziehen sich häufig einem schnellen Abbau (siehe **Abb. 1.1**, unten).

1.2 Abbauege in Mikroorganismen

Seit Beginn der industriellen Revolution wurden immer neue methylierte wie halogenierte anthropogene aromatische Verbindungen in die Umwelt freigesetzt. Trotz dieser aus evolutionärer Sicht kurzen Zeit sind viele Mikroorganismen entdeckt worden, die eine Degradation dieser Verbindungen katalysieren können. Ein sehr gutes Beispiel für die Entstehung von Abbauegen sind die Wege zur Degradation von aromatischen Verbindungen.

1.2.1 Der obere Abbaueweg von aromatischen Verbindungen

Die Abbauege für viele Polyaromaten und höherfunktionalisierte aromatische einkernige Verbindungen konvergieren durch charakteristische Reaktionen bei zentralen Metaboliten wie Catechol (siehe **Abb. 1.2.1.1**).

Der Abbau von Polyaromaten, die über keine Hydroxylgruppe verfügen, startet mit der Aktivierung der Verbindung durch Oxidation mit molekularem Sauerstoff. Dioxygenasen, wie die Naphthalin-1,2-Dioxygenase oder die Biphenyl-Dioxygenase katalysieren eine *cis*-Dihydroxylierung. Es schließt sich eine enzymatisch katalysierte Dehydrogenierung und Rearomatisierung der Verbindungen an. Der nächste Schritt ist in fast allen Fällen eine weitere Dioxygenierung. Unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff kommt es zu einer intradiolen Ringspaltung. Nach Abspaltung der offenkettigen Reste werden aromatische Vorstufen des Catechols erreicht, zum Beispiel Salicylat und Benzoat. Salicylat wird durch die Salicylat-Hydroxylase direkt in Catechol überführt.

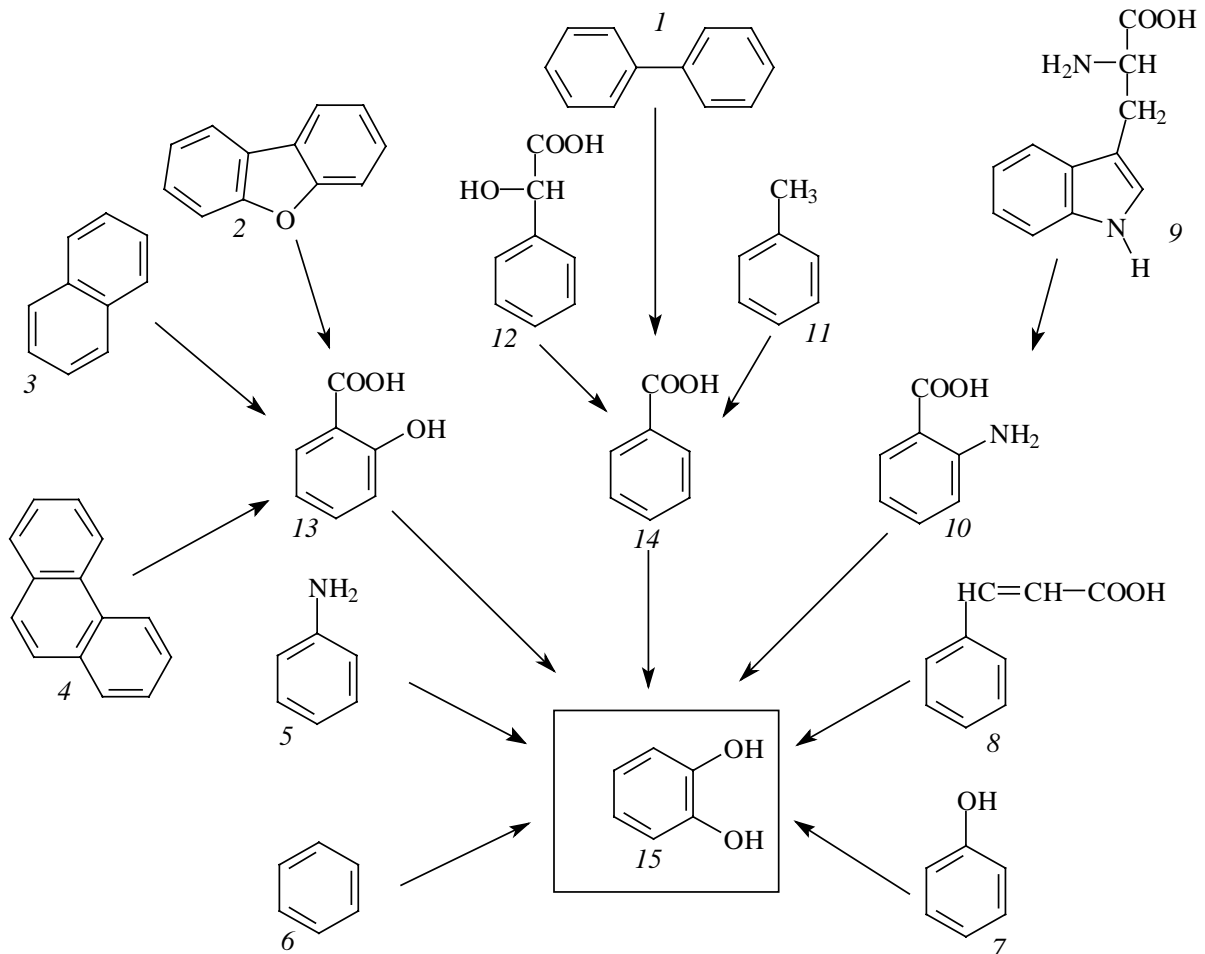


Abb. 1.2.1.1: Übersicht einiger ausgewählter Abbauewege von Aromaten, die bei Catechol konvergieren. Vereinfacht nach Harwood und Parales (1996) sowie Ellis *et al.* (2001). Erläuterungen: 1: Biphenyl, 2: Dibenzofuran, 3: Naphthalin, 4: Phenanthren, 5: Anilin, 6: Benzol, 7: Phenol, 8: Chinnamat, 9: Tryptophan, 10: Anthranilat, 11: Toluol, 12: D/L-Mandelat, 13: Salicylat, 14: Benzoat, 15: Catechol.

Benzol wird durch die Benzol-Dioxygenase unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff *cis*-dihydroxyliert. Durch Dehydrogenierung und Decarboxylierung, katalysiert durch die Benzol-*cis*-Dihydrodiol-Dehydrogenase, erfolgt die Rearomatisierung zum Catechol. Analog dazu erfolgt der Abbau von Benzoat zu Catechol (siehe **Abb. 1.2.1.2**).

Die Reaktionen zur Degradation von Benzol und Benzoat sind auch für die jeweiligen chlorierten Verbindungen intensiv untersucht worden.

Beim Abbau von Chlorbenzol entsteht zum Beispiel für die Stämme *Bacterium* WR1306 (Reineke und Knackmuss, 1984) und *P. putida* GJ31 (Mars *et al.*, 1997) ausschließlich 3-Chlorcatechol. Wird 3-Chlorbenzoat umgesetzt, kann theoretisch 3-Chlorcatechol und 4-Chlorcatechol entstehen. Das jeweilige Verhältniss der Catechole zueinander ist abhängig von der Regioselektivität der Benzoat-Dioxygenasen (Zerlin, 2002).

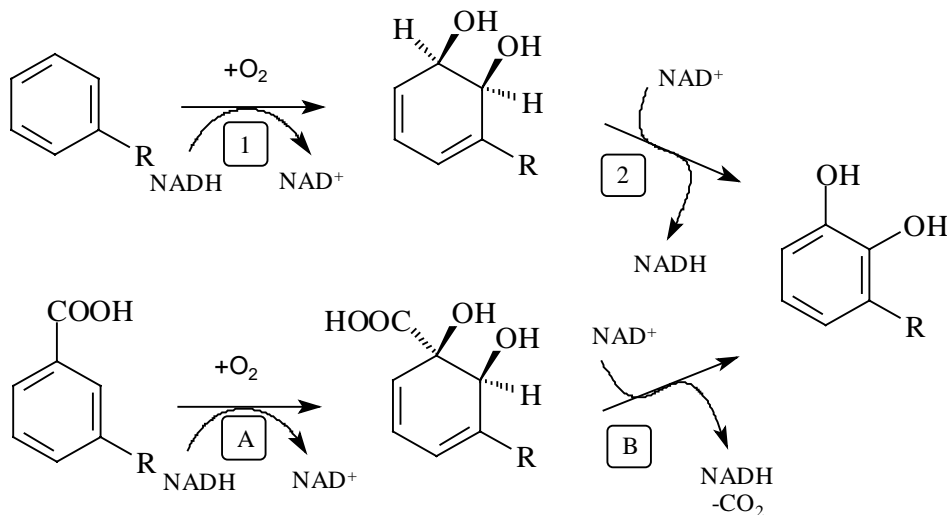


Abb. 1.2.1.2: Abbau von Benzol und Benzoat zu Catechol. Erläuterungen: R = H, Cl; 1: (Chlor-)Benzol-Dioxygenase; 2: (Chlor-)Benzoldihydrodiol-Dehydrogenase; A: (Chlor-)Benzoat-Dioxygenase; B: (Chlor-)Benzoat-*cis*-dihydrodiol-Dehydrogenase.

1.2.2 Degradation von Catecholen: Der modifizierte *ortho*- und der *meta*-Weg

Der modifizierte *ortho*- und *meta*-Weg sind zwei Möglichkeiten der Mikroorganismen zum Abbau des zentralen Metaboliten Catechol.

Prinzipiell kann die Ringspaltung des Catechols an verschiedenen potentiellen Schnittstellen erfolgen. Ein Schnitt intradiol, also zwischen den beiden Hydroxylgruppen, stellt den ersten Schritt des sogenannten *ortho*-Weges oder des modifizierten *ortho*-Weges dar. Katalysiert wird dies durch eine 1,2-Dioxygenase. Erfolgt der Schnitt extradiol, also zwischen dem C2 und dem C3 des Catechols, katalysiert durch eine 2,3-Dioxygenase, ist dies der erste Schritt des sogenannten *meta*-Weges.

Normalerweise sind der *ortho*- und der *meta*-Weg inkompatibel, das heißt, chlorierte Catechole werden über den *ortho*-Weg und methylierte Catechole über den *meta*-Weg metabolisiert. Der mikrobielle Abbau von Chloraromaten über Chlorcatechole und anschließend über den modifizierten *ortho*-Abbauweg ist gut untersucht (Evans und Gaunt, 1971; Dorn und Knackmuss, 1978 a, 1978 b; Schmidt und Knackmuss, 1980; Schwien *et al.*, 1988; Kaschabek und Reineke, 1992, 1995; Vollmer und Schlömann 1995; Müller *et al.*, 1996. Siehe **Abb. 1.2.2**). Es wurde gezeigt, 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).

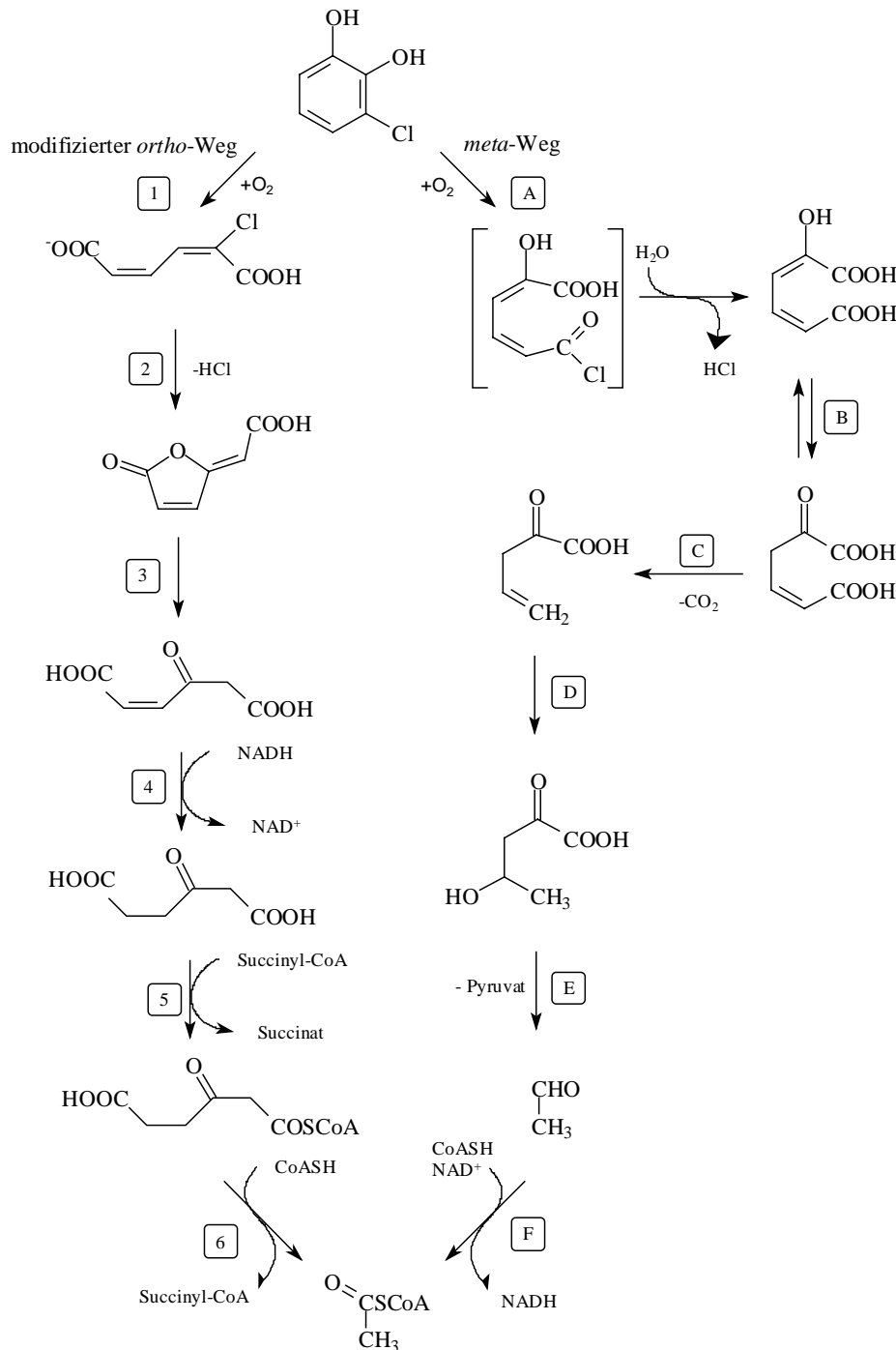


Abb. 1.2.2: Abbau von Chloraromaten: Der *meta*-Weg, eine Alternative zum modifizierten *ortho*-Weg? Gegenüberstellung von modifiziertem *ortho*-Weg nach Chatterjee *et al.* (1981) und beispielsweise Kasberg *et al.* (1995) und Göbel *et al.* (2002, 2003) sowie der *meta*-Weg nach Mars *et al.* (1997). Erläuterungen: 1 Catechol-1,2-Dioxygenase (Umsatz von 3-Chlorcatechol zu 2-Chlormuconat), 2 Chlormuconat-Isomerase (Umsatz von 2-Chlormuconat zu Dienlacton), 3 Dienlacton-Hydrolase (Umsatz von Dienlacton zu Maleylacetat), 4 Maleylacetat-Reduktase (Umsatz von Maleylacetat zu 3-Oxadipat), 5 3-Oxadipat Succinyl-CoA-Transferase (Umsatz von 3-Oxadipat zu 3-Oxadipyl-CoA), 6 3-Oxadipyl-CoA-Thiolase (Umsatz von 3-Oxadipyl-CoA zu Acetyl-CoA und Succinyl-CoA), A Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase (Umsatz von 3-Chlorcatechol zu 2-Hydroxymuconat), B 4-Oxalocrotonat-Tautomerase/Isomerase (Isomerisierung von 4-Oxalocrotonat zu 2-Hydroxymuconat), C 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase (Umsatz von 4-Oxalocrotonat zu 2-Oxo-4-pentenoat), D 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase (Umsatz von 2-Oxo-4-pentenoat zu 4-Hydroxy-2-oxovalerat), E 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase (Umsatz von 4-Hydroxy-2-oxovalerat zu Acetaldehyd und Pyruvat), F Acetaldehyd-Dehydrogenase (Umsatz von Acetaldehyd zu Acetyl-CoA).

Hingegen galt der *meta*-Weg (siehe **Abb. 1.2.2**) 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 Metabolit auftritt, da dieses als starker Inhibitor für extradiole Dioxygenasen wirkt (Klecka und Gibson, 1981; Bartels *et al.*, 1984; Haigler und Spain, 1989; Higson und Focht, 1992; Arensdorf und Focht, 1994; Hollender *et al.*, 1994).

Zwei Gründe für ein Versagen des *meta*-Weges für 3-Chlorcatechol wurden diskutiert:

- 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 6-Chlor-2-hydroxymuconsäure 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.
- Klecka und Gibson (1981) beobachteten, 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 und Bolin, 1996).

Der Abbau von methylierten Catecholen über den *meta*-Weg ist schon länger bekannt und wurde ausführlich an dem Bakterium *Pseudomonas putida* PaW1 (vormals: *P. arvilla* mt-2 oder *P. putida* mt-2) vor allem durch Murray *et al.* (1972) untersucht. Der Abbau von chlorierten Catecholen über den *meta*-Weg wurde erst über 20 Jahre später von Mars *et al.* (1997) gezeigt. Der Stamm *Pseudomonas putida* GJ31 verfügt demnach über Enzyme des *meta*-Wege und kann Chlor- und Methyларomaten über den *meta*-Weg abbauen. Die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase zeigt keine Suizidinaktivierung, 3-Chlorcatechol wird zu 2-Hydroxymuconsäure abgebaut. Das Gen, das für die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase von *P. putida* GJ31 kodiert, wird *cbzE* genannt und ist auf einem Plasmid zusammen mit anderen Enzymen des *meta*-Weges lokalisiert (Mars *et al.*, 1999).

Die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase CbzE aus *P. putida* GJ31 wurde von Kaschabek *et al.* (1998) charakterisiert. Es handelt sich um ein homotetrameres Protein mit einer Gesamtmasse von 135 ± 10 kDa.

Die Sequenz der Catechol-2,3-Dioxygenase CbzE zeigt eine 42 bis 73%ige Übereinstimmung mit bekannten Sequenzen von anderen Catechol-Dioxygenasen (73% mit der Catechol 2,3-Dioxygenase aus *Comamonas* sp. JS765, NCBI Acc. No. AAC79918.1). GJ31-CbzE kann ein breites Spektrum an methyl- oder chlosubstituierten Catecholen abbauen, insbesondere 3-Chlorcatechol, das um 30% schneller abgebaut wird als unsubstituiertes Catechol. Kaum verwertbar für GJ31-CbzE sind zweifach chlosubstituierte Catechole (Mars *et al.*, 1999; Kranz, 2001; Kunze, 2002; Mandt, 2004).

Bei einem Abbau von 3-Chlorcatechol über den *meta*-Weg (Assinder und Williams, 1990), wird im ersten Schritt, katalysiert durch die oben beschriebenen Catechol-2,3-Dioxygenasen, 6-Chlor-2-hydroxymuconat gebildet. Der Abbau (siehe **Abb.** 1.2.2) verläuft nun unter Abspaltung von Salzsäure über das 4-Oxalocrotonat. Dieses wird in der Enol-Form durch eine Hydrolase gebildet und durch eine Tautomerisierungsreaktion in die Keto-Form überführt und durch Decarboxylierung in 4-Oxopent-4-enoat umgewandelt. Nach Abspaltung von Pyruvat - katalysiert von einer Aldolase - entsteht Acetaldehyd. Acetaldehyd kann unter Verbrauch von NADH und Einfügung von Coenzym-A durch die Acetyl-CoA-Dehydrogenase in Acetyl-CoA überführt und somit in den Tricarbonsäurezyklus eingespeist werden.

1.3 Genetische Struktur von Abbauwegen und ihre Entstehung in Mikroorganismen

Halogenhaltige aromatische Organika sind in den letzten Jahren auf Grund anthropogener Freisetzung bedeutende Verbindungen in der Biosphäre geworden. Diese Zeitspanne ist verglichen mit den $4 \cdot 10^9$ Jahren der evolutionären Anpassung von Mikroorganismen an natürliche Verbindungen eine sehr kurze Zeitspanne.

Es wurde vermutet, dass entweder die Enzyme die anthropogen freigesetzten Verbindungen prinzipiell auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu natürlichen Komponenten abbauen können oder, dass die zum Abbau von anthropogenen Chemikalien nötigen Enzyme schon lange in ökologischen Nischen existierten und speziell zum Abbau der Xenobiotika in Abbauwege integriert wurden (Gibson, 1984).

Ein interessanter Punkt ist, dass die zu den Abbauwegen gehörenden Gene in komplizierten und mehrere Kilobasenpaaren großen Clustern organisiert sind (siehe **Abb.** 1.3).

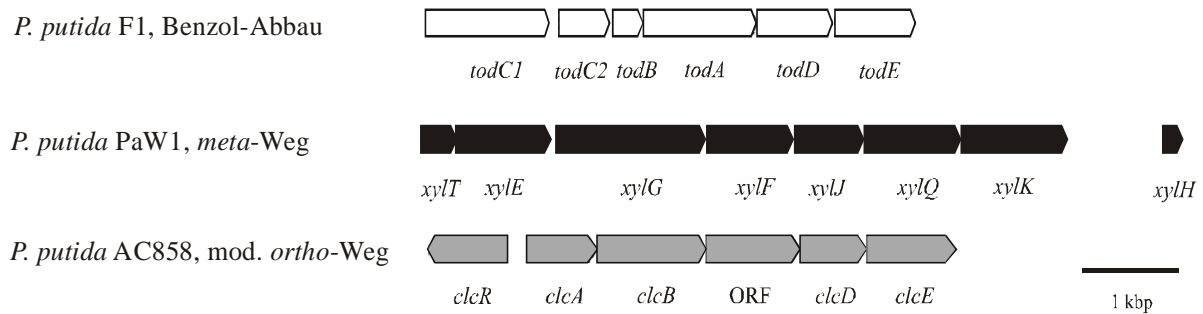


Abb. 1.3: Cluster von Genen, die für Enzyme des Abbaus von Benzol bzw. Catechol via *meta*-Weg und modifizierten *ortho*-Weg kodieren. Erläuterungen: *todC1*: Benzol-Dioxygenase α -Untereinheit, *todC2*: Benzol-Dioxygenase β -Untereinheit, *todB*: Ferredoxin, *todA*: Benzol-Dioxygenase-Reduktase, *todD*: *cis*-Dihydrodiol-Dehydrogenase, *todE*: Catechol-2,3-Dioxygenase, *xylT*: Ferredoxin, *xylE*: Catechol-2,3-Dioxygenase, *xylG*: 2-Hydroxyumuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, *xylF*: 2-Hydroxyumuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, *xylJ*: 2-Oxypent-4-enoat-Hydratase, *xylQ*: Acetaldehyd-Dehydrogenase, *xylK*: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, *XylH*: 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, *clcR*: Regulator, *clcA*: Chlorcatechol-1,2-Dioxygenase, *clcB*: Chlormuconat-Cycloisomerase, ORF: unbekanntes Element, *clcD*: Dienlacton-Hydrolase, *clcE*: Maleylacetat-Reduktase.

Weiterhin wurde festgestellt, dass Abbauwege häufig in einzelnen Bakterienstämmen aus unterschiedlichen evolutionären Quellen stammen könnten. Somit kann vermutet werden, dass Mikroorganismen die Abbauwege neu kombinieren können, um eine optimale Anpassung an verschiedene persistente Xenobiotika zu erreichen.

Diese Spekulationen waren in den vergangenen Jahren Gegenstand wichtiger Untersuchungen. Gerade durch verbesserte DNA-Sequenzierungsmethoden sind heute viele Nukleotidsequenz-Daten verfügbar, die eine Diskussion um die Evolution von Abbauwegen in viele Richtungen erweitern können. Hierzu zählten vor allem die umfangreichen Entdeckungen von unterschiedlichen mobilen genetischen Elementen, wie Transposons, Integrons, Insertionssequenzen etc. und natürlich auch die genaue Untersuchung kompletter katabolischer Plasmide, die als die „Werkzeuge“ der evolutionären Entwicklung von Abbauwegen gelten können.

1.3.1 Transposons

Die zu einer Sequenz eines Abbauweges gehörenden Gene sind meist in einem Gen-Cluster zusammen gefasst. Häufig sind die Cluster von sogenannten transponierbaren Elementen eingeschlossen. Die bisher identifizierten transponierbaren Elemente, sogenannte Transposons, lassen sich bezüglich ihrer Komplexität in mehrere Gruppen einteilen (Grindley und Reed, 1995). Eine Übersicht der verschiedenen Klassen ist Tabelle 1.3.1 zu entnehmen.

Durch die Integration eines katabolischen Transposons in einen DNA-Bereich können Mutationen mit verschiedenen Auswirkungen entstehen:

- Durch die Integration von Transposons kann es zu einer Unterbrechung der kodierenden Region eines Gens oder der für seine Expression benötigten regulatorischen Regionen durch Integrationsereignisse kommen (Galas und Chandler, 1989; Kallastu *et al.*, 1998).
- Umlagerungen, Insertionen bzw. Deletionen erfolgen durch Transpositionereignisse, die mehrere Gene unter die Kontrolle neuer regulatorischer Elemente bringen.
- Es kann eine Transkriptionsaktivierung von Genen erfolgen, in deren Nachbarschaft ein Transposon integriert wurde (Galas und Chandler, 1989; Kallastu *et al.*, 1998).
- Ursprünglich entfernt von einander lokalisierte Gene werden durch Transposon-vermittelte Umordnungen zu koordiniert regulierten Operons organisiert, so dass neue Proteine durch Verknüpfung zweier zuvor unabhängiger Genabschnitte gebildet werden können (Ohtsubo und Sekine, 1996).

In verschiedenen nicht miteinander verwandten Bakterienstämmen wurden identische Transposons gefunden (Tsuda *et al.*, 1989; Nakatsu *et al.*, 1991; van der Meer *et al.*, 1991b; Springael *et al.*, 1993). Dies ist ein Hinweis darauf, dass im Gegensatz zur allgemeinen Rekombination die Transposon-vermittelte Übertragung genetischer Information zwischen verschiedenen Organismen nicht auf verwandte Spezies beschränkt ist. So können verschiedene degradative Gene durch horizontalen Gentransfer auch in entfernt verwandte Organismen weiterverbreitet werden und somit zur Entwicklung und Organisation neuer Operons mit neuen bzw. verbesserten Abbaueigenschaften führen.

Im einfachsten Fall enthalten Transposons nur DNA-Elemente, die für die Transposition notwendig sind und/oder den Transpositionsprozess regulieren. Diese Elemente kodieren für eine Transposase TnpA, die die Rekombinationsereignisse katalysiert und die mit dem Transpositionereignis 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 und 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 kodieren (Beispiele für Klasse I Transposons siehe **Tab.** 1.3.1).

Tab. 1.3.1: Übersicht katabolischer Transposons in Bakterien.

Transposon	Größe (kb)	Katabolische Gene	IS	Lage	Organismus	Referenz
Klasse I Transposons						
Tn5271	17	Chlorbenzoat (<i>cbaABC</i>)	IS1071	pBRC60	<i>Alcaligenes</i> sp. BR60	1
Tn5280	8,5	Chlorbenzol (<i>tcbAB</i>)	IS1066 IS1067	pP51	<i>Pseudomonas</i> sp. P51	2
Tn5542	12	Benzol (<i>hedDC1C2BA</i>)	IS1489	pHMT112	<i>P. putida</i> ML2	3
Klasse II Transposons (Tn3 und verwandte)						
Tn4651	56	Toluol (<i>xyl</i>)	IR: 46 ^a	pWW0	<i>P. putida</i> mt-2	4
Tn4652	17	keine		Chromosom	<i>P. putida</i> PaW85	5
Tn4653	70	Toluol (<i>xyl</i>)	IR: 38 ^a	pWW0	<i>P. putida</i> PaW1	6
Tn4655	38	Naphthalin	IR: 38 ^a	NA117	<i>P. putida</i> G7	7
Tn4656	39	Toluol (<i>xyl</i>)	IR: 38 ^a	pWW53	<i>P. putida</i> MT53	8
Klasse III Transposons						
Genome der Bakteriophagen Mu und D108				Genom	Mu	9
				Genom	D108	10
Transposons unbekannter Klassen						
Tn4371	59	Chlorbiphenyl (z.B. <i>bph</i>)	nb	Chromosom	<i>Alcaligenes eutrophus</i> A5	11
	90	Biphenyl (z.B. <i>bph</i>)	nb	Chromosom	<i>P. putida</i> KF715	12
	26	Anilin (<i>tdnOTAIA2BR</i>)	IS1071	pTDN1	<i>P. putida</i> UCC22	13
	26	Bromacetat (<i>dhlB</i>)	IS1247	Chromosom	<i>X. autotrophicus</i> GJ10	14

Erläuterungen: IS, Insertions-Sequenz (nb: unbekannt), ^aGröße der Inverted repeats (IR, in Basenpaaren). Referenzen: 1: Nakatsu *et al.* (1991), 2: van der Meer *et al.* (1991b), 3: Fong *et al.* (1997), 4: Tsuda und Iino (1987), 5: Horak und Kivisaar (1998), 6: Tsuda und Iino (1988), 7: Tsuda und Iino (1990), 8: Williams *et al.* (1992), 9: Taylor (1963), 10: Mise (1971), 11: Springael *et al.* (1993), 12: Nishi *et al.* (1998), 13: Fukumori und Saint (1997), 14: van der Ploeg *et al.* (1995).

Eine weitere Gruppe transponierbarer Elemente bilden Klasse II-Transposons, zu denen das Transposon Tn3 und eine Familie verwandter Elemente gehört (Kleckner *et al.*, 1975; Gill *et al.*, 1978; Grindley und Reed, 1985). 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 wird von kurzen inverted repeats eingerahmt und enthält im zentralen Teil ein Gen für eine β -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; Faelen und Toussaint, 1980; Gill *et al.*, 1981). Bei ihnen gehört die replikative Transposition zum normalen Verlauf einer Infektion und der vegetativen Vermehrung des Phagengenoms. 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.

1.3.2 Integrons

Neben den Transposons sind Integron/Genkassetten-Systeme (Integrons) wichtige Elemente des lateralen Gentransfers (Holmes *et al.*, 2003). Integrons beinhalten ein ortsspezifisches Rekombinationssystem und wurden zuerst als Elemente mit Antibiotikaresistenzgenen in klinischen Isolaten entdeckt (Stokes und Hall, 1989; Martinez und de la Cruz, 1990; Collis *et al.*, 1993; Stokes *et al.*, 2001, 1997; Kovalevskaya, 2002). Sie sind Rekombinations- und Expressionssysteme, die Gene als Teil einer Genkassette integrieren. Genkassetten sind dabei einfache genetische Elemente, die ein promotorloses Gen und eine Rekombinationsstelle, das 59 Basen-Paar Element (59 be), beinhalten (siehe **Abb. 1.3.2.1**).

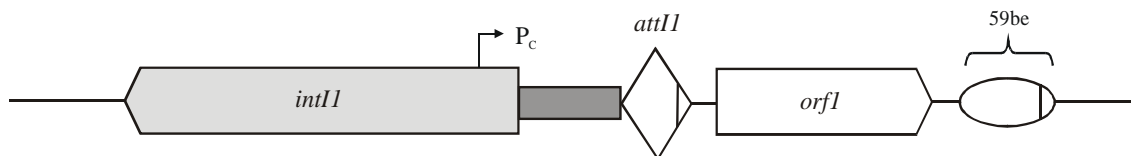


Abb. 1.3.2.1: Integronstruktur, generalisiert nach Nield *et al.* (2001). Dargestellt ist die generalisierte Darstellung eines Integrons der Klasse I mit der relativen Position von *intI1* (Integrase), *attI1* (Rekombinationsstelle) und P_c (Promotor). Das 59-Basenpaar-Element (59be) ist als Oval dargestellt.

Es gibt unterschiedliche Klassen von Integrons. Integrons der Klasse 1 verfügen über ein System zur Gen-Integration bestehend aus einer ortsspezifischen Rekombinase (IntI1) und einer Rekombinationsstelle (*attI1*). IntI1 (Collis *et al.*, 2001) katalysiert zwei Arten der stellenspezifischen Rekombination:

Rekombination zwischen *attI1* und ein 59 be

Rekombination zwischen zwei 59 be

In beiden Fällen befinden sich diese neu integrierten Gene stromabwärts des Promotors P_c .

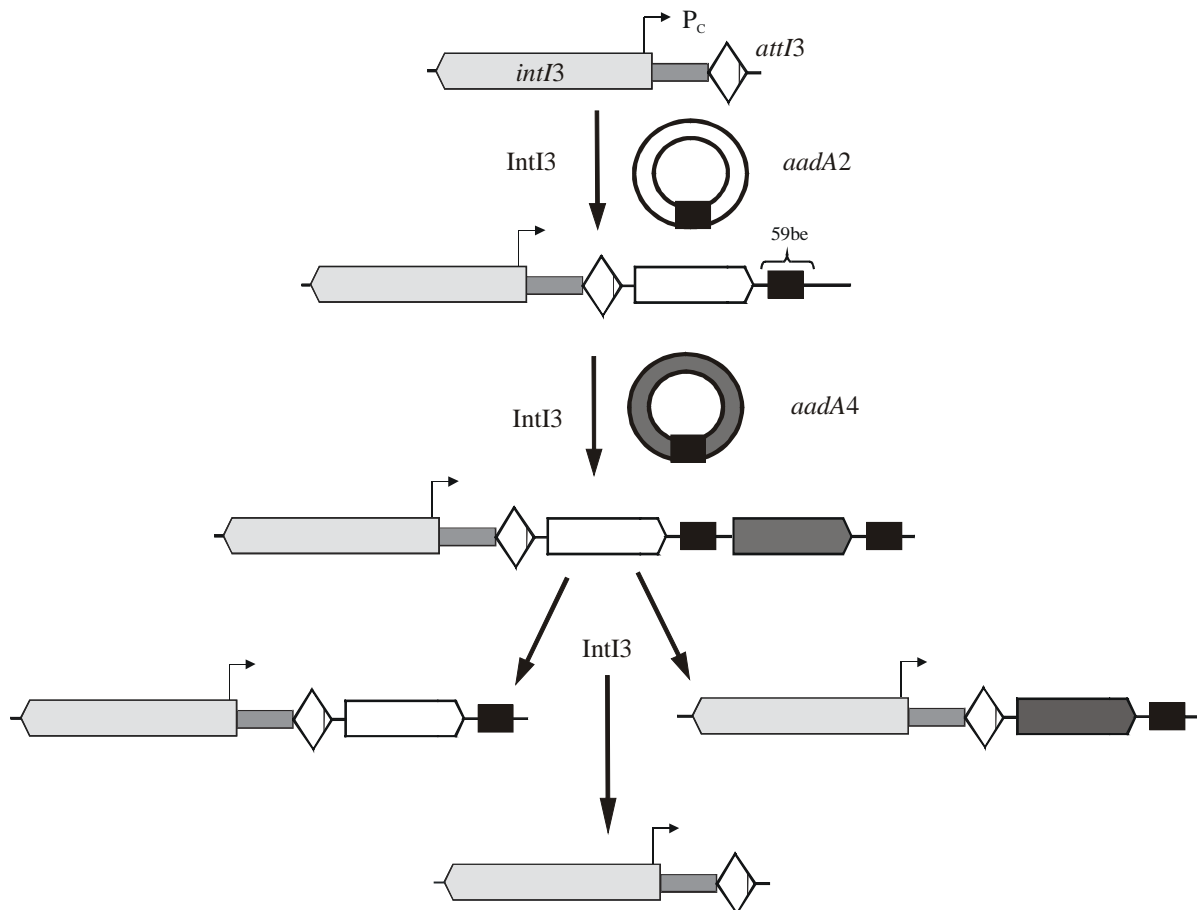


Abb. 1.3.2.2: Insertion und Excision von Genkassetten nach Collis *et al.* (2002). Erläuterungen: *intI3* (hellgrau): Integrase-Gen der Klasse 3, IntI3: Integrase-Enzym der Klasse 3, P_c : Promotor, *attI3* (Raute): Rekombinationsstelle aus Integrons der Klasse 3, *aadA2* und *aadA4*: Gene, an denen die Insertion und Excision untersucht und beobachtet wurde, 59 be (schwarze Box): 59 Basenpaarelement.

Neben den Integrons der Klasse 1 existieren auch noch weitere Klassen, die sich nur durch geringe Veränderungen unterscheiden. Zum Beispiel besitzt die ortsspezifische Rekombinase IntI2* ein Stopp-Codon und wird in Transposons wie Tn7 gefunden (Tietze *et al.*, 1987; Hall *et al.*, 1991; Sundström *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1994). Das einzige bekannte Integron der Klasse 3 ist bezüglich der Elemente IntI3, *attI3* und dem Promotor P_c gleich aufgebaut wie Integrons der Klasse 1. Sie unterscheiden sich nur in der Sequenz von *attI1* und *attI3* (Arakawa *et al.*, 1995; Collis *et al.* 2002).

Integrans katalysieren sowohl die Integration zirkulärer Genkassetten in die *attI*-Stelle, als auch die Excision bereits integrierter Kassetten (siehe **Abb. 1.3.2.2**).

Die Beteiligung eines Integrasesystems am horizontalen Gentransfer wurde am Beispiel des *clc* Elements in *Pseudomonas* sp. B13 berichtet (Ravatt *et al.*, 1998a; Ravatt *et al.*, 1998b; Hacker und Carniel, 2001; van der Meer *et al.*, 2001; Sentchilo *et al.*, 2003). Hierbei besteht das rund 100 kbp große *clc* Element aus einer Integrase, einer spezifischen Rekombinationsstelle sowie Genen für den Abbau von Chlorcatecholen (*clcABORFDE*) und ist auf dem Chromosom lokalisiert. 3-Chlorbenzoat stimuliert den Transfer des *clc* Elements durch Aktivierung der Integrase Genexpression und so den Transfer in andere Stämme per Konjugation mittels Plasmid (siehe **Abb. 1.3.2.3**).

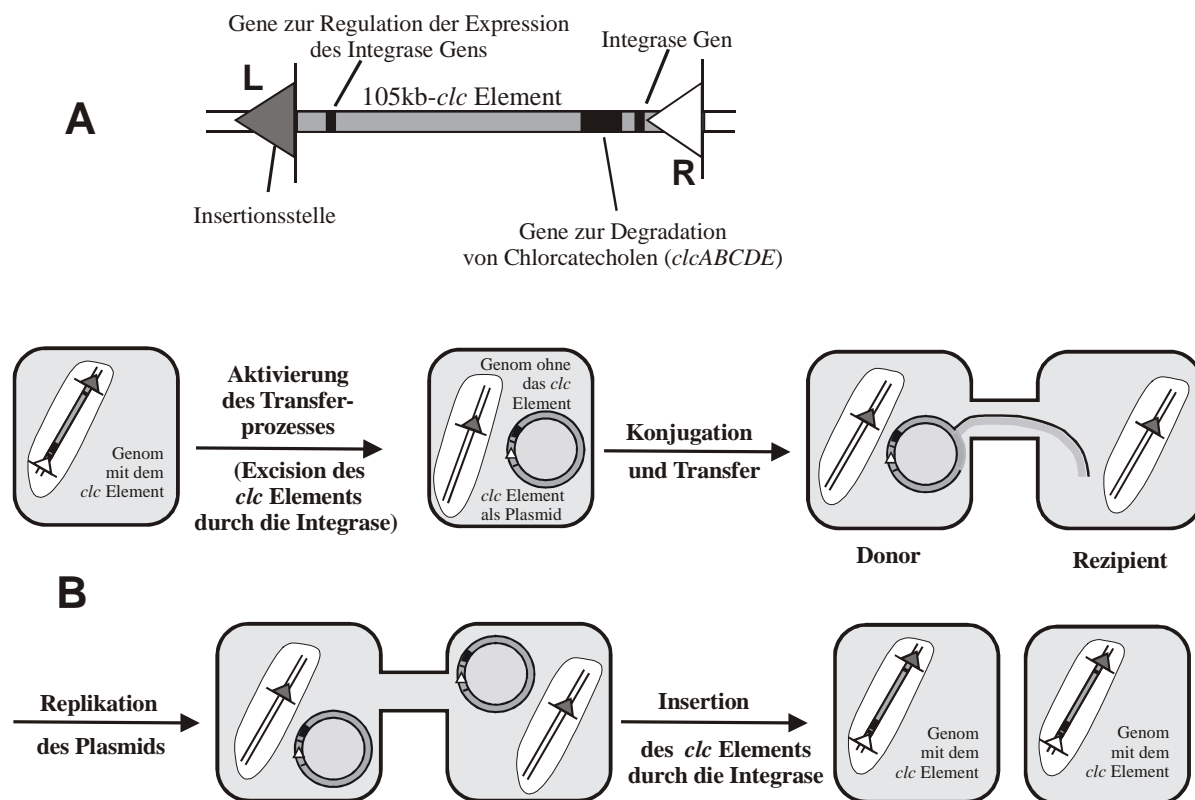


Abb. 1.3.2.3: Das *clc* Element als genomische Insel im horizontalen Gentransfer nach van der Meer (2003). **A:** Aufbau des *clc* Elements aus *Pseudomonas* sp. B13. Das 105 kb große Element ist von Insertionsstellen eingerahmt und beinhaltet neben den Genen zur Degradation von Chlorcatecholen (*clcABCDE*) auch das Integrasegen, sowie ein Gen, dass für die Regulation der Expression des Integrase Gens verantwortlich zu sein scheint. **B:** Mechanismus des horizontalen Gentransfers des *clc* Elements.

1.3.3 Beispiele katabolischer Plasmide

Bis 1970 wurde die Rolle von Plasmiden einzig als Hilfsmittel in Bakterien gesehen. Sie wurden als Träger von Resistenzgenen und Genen für die Synthese von für andere Organismen giftige Substanzen angesehen. Erst danach wurde entdeckt, dass Plasmide auch katabolische Funktionen kodieren, so zum Erschließen von Kohlenstoff- und Energiequellen. Es wurden dann Stämme beschrieben, die vielfältige Kohlenstoffquellen nutzen konnten, wie zum Beispiel: Salicylat (Chakrabarty, 1972), Kampher (Rheinwald *et al.*, 1973), Oktan und kurzkettige Alkane (Chakrabarty *et al.*, 1973) und Naphthalin (Dunn und Gunsalus, 1973). Seit dem sind katabolische Plasmide interessante Objekte intensiver Forschungen. In den letzten Jahren gelang auf Grund verbesserter Techniken die Sequenzierung kompletter katabolischer Plasmide (um 50 bis über 100 kbp). Hierdurch wurde es möglich, die Struktur und Organisation der Plasmid in ihrer Gesamtheit besser verstehen zu können (siehe Beispiele in **Tab. 1.3.3**).

Tab. 1.3.3: Beispiele katabolischer Plasmide.

Plasmid	Größe (kbp)	Stamm	Plasmidrückrat		MGE	Katabolische Region	Ref.
			Inc-Gruppe	Größe (kbp)			
pWW0	117	<i>P. putida</i> PaW1	IncP-9	46	Tn4651 Tn4653	Toluol, Xylol Abbau Toluol, Xylol Abbau	1
pJP4	87	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	IncP-1 β	42	ISJP4 Tn501 IS1071	<i>tfd</i> -II Gencluster Quecksilber Resistenz putative Antibiotikaresistenz	2
pCAR1	199	<i>P. resinovorans</i> CA10	nb	nb	Tn4651 Tn4676	Toluol, Xylol Abbau Carbazol, Dioxin Abbau	3
pADP-1	109	<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	IncP β	37	Tn5053 (IS1071)	Atrazin Abbau	4
pNL1	184	<i>Shingomonas aromaticivorans</i> F199	nb	115	nb nb	Biphenyl, Naphthalin Abbau <i>p</i> -Kresol Abbau	5
pUO1	67	<i>Delftia acidovorans</i> B	IncP-1 β	40	Tn4671 Tn4672	Quecksilber Resistenz unbekannte Funktion	6

Erläuterungen: Inc-Gruppe: Inkompatibilitätsgruppe der Plasmide, nb: unbekannt, MGE: mobile genetische Elemente (Transposons, IS: Insertionssequenzen), *tfd*-II Gencluster: Gene zum Abbau von 2,4-Dichlorphenoxyacetat und 3-Chlorbenzoat, Ref.: Referenzen 1: Greated *et al.* (2002), 2: Trefault *et al.* (2004), 3: Maeda *et al.* (2003), 4: Martinez *et al.* (2001), 5: Romine *et al.* (1999), 6: Sota *et al.* (2003).

Das TOL-Plasmid pWW0 (117 kbp) aus *P. putida* PaW1, als erstes beschrieben von Murray *et al.* (1972), sowie Williams and Murray (1974), kann als das am besten untersuchte

degradative Plasmid gelten. *P. putida* PaW1 kann Toluol, Xylol und Benzoat als Kohlenstoffquelle verwenden. Weiterhin verfügt der Stamm über die Fähigkeit, das als Metabolit auftretende (Methyl-)Catechol über den *meta*-Weg abzubauen.

Das Plasmid pWW0 besteht aus einem IncP-9 Rückrat, das neben den Funktionen für Replikation, Erhaltung und Stabilität des Plasmids, phänotypische Bestimmung, Genregulation und Genexpression auch für Transpositionereignisse kodiert. Alle diese Kernfunktionen des Plasmidrückrats liegen auf 46 kbp. Die Gene für den Toluol- und Xylol-Abbauweg (*xyl*-Gene) trägt das TOL-Plasmid in den katabolischen Transposons Tn4651 und Tn4653 (Greated *et al.*, 2002).

Das katabolische Plasmid pJP4 aus *Ralstonia eutropha* JMP134 ist mit 87 kbp etwas kleiner als pWW0. *Ralstonia eutropha* JMP134 kann 2,4-Dichlorphenoxyacetat und 3-Chlorbenzoat als Substrate verwerten. Die Gene für den Abbau der chlorierten Verbindungen liegen auf dem Plasmid in den *tfd*-I und *tfd*-II Genclustern. Plasmid pJP4 besteht aus einem 42 kbp großen IncP-1 β Rückrat in welches die mobilen genetischen Elemente ISJP4, Tn501 und IS1071 insertiert vorliegen (Trefault *et al.*, 2004).

Das 64,5 kbp große IncP-1 β Antibiotikaresistenz-Plasmid pB10 ist eines unter vielen Plasmiden (pB1-pB12), die von Dröge *et al.* (2000) aus Schlamm-Bakterien isoliert worden sind. pB10 verfügt neben vielen Resistenz-Genen und Resistenz-Transposons auch über ein IS1071. Dieses Insertionselement wurde ursprünglich auf den Atrazin-katabolischen Plasmiden pADP-1, pTSA sowie auf Plasmid pJP4 gefunden (siehe **Tab.** 1.3.3 und Martinez *et al.*, 2001, Trefault *et al.*, 2004). Plasmid pB10 ist das einzige bekannte Plasmid mit einem IS1071 ohne degradative assoziierte genetische Information (Schlüter *et al.*, 2003)

Insgesamt kann festgestellt werden, dass Transposons, Insertionssequenzen und Integrons wesentliche Bestandteile bei der strukturellen Zusammensetzung von Plasmiden aus Plasmidrückrat (mit Replikations- und Konjugationsregionen), sowie insertierten katabolischen Regionen sind (Trefault *et al.*, 2004).

1.4 Der Wildstamm *P. putida* GJ31 und sein Plasmid pKW1

Bisher sind drei Bakterienstämme isoliert worden, die natürlicherweise zu einem Abbau von 3-Chlorcatechol über den *meta*-Weg befähigt sind. Dies ist, wie oben erwähnt, *P. putida* GJ31, ein Isolat nach Chlorbenzoleselektion aus Rhein-Wasserproben (Oldenhuis *et al.*, 1989). Weiterhin bekannt ist *Pseudomonas fluorescens* SK1 und *Pseudomonas veronii* 16-6A (Göbel *et al.*, 2004).

Im Vergleich zu den Stämmen *Pseudomonas fluorescens* SK1 und *Pseudomonas veronii* 16-6A kann der Stamm *Pseudomonas putida* GJ31 als der best untersuchte Vertreter des Abbaus von Chlorbenzol über den *meta*-Weg gelten, der über eine Chlorcatechol 2,3-Dioxygenase verfügt. Es gelang bisher in *P. putida* GJ31 viele Gene des *meta*-Weges zu sequenzieren und zu amplifizieren (Kunze, 2002; Mars *et al.*, 1999; siehe **Tab.** 1.4). Es konnten zwei Gen-Cluster (*cbz*TEXG-Cluster und *meta*-Operon) auf dem Plasmid pKW1 analysiert werden. Durch Hybridisierungsexperimente gelang die grobe Strukturaufklärung von etwa 100 kb von insgesamt 180 kb des Plasmids pKW1 (siehe **Abb.** 1.4).

*cbz*TEXG-Cluster und *meta*-Operon liegen rund 14 kbp von einander entfernt auf dem Plasmid pKW1. Ausgehend von den Ergebnissen von Mars *et al.* (1997 und 1999) gelang es vor kurzem Kunze (2002) rund 15 kbp des *cbz*TEXG-Clusters zu sequenzieren, der unter anderem das Gen der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase (*cbzE*) enthält. Außerdem konnten Gene von weiteren Enzymen des *meta*-Weges identifiziert werden.

Ein weiterer Cluster (*meta*-Operon) enthielt darüber hinaus auch Gene, die für Enzyme des *meta*-Weges kodieren. Hier konnten rund 11 kbp sequenziert und die identifizierten Gene charakterisiert werden.

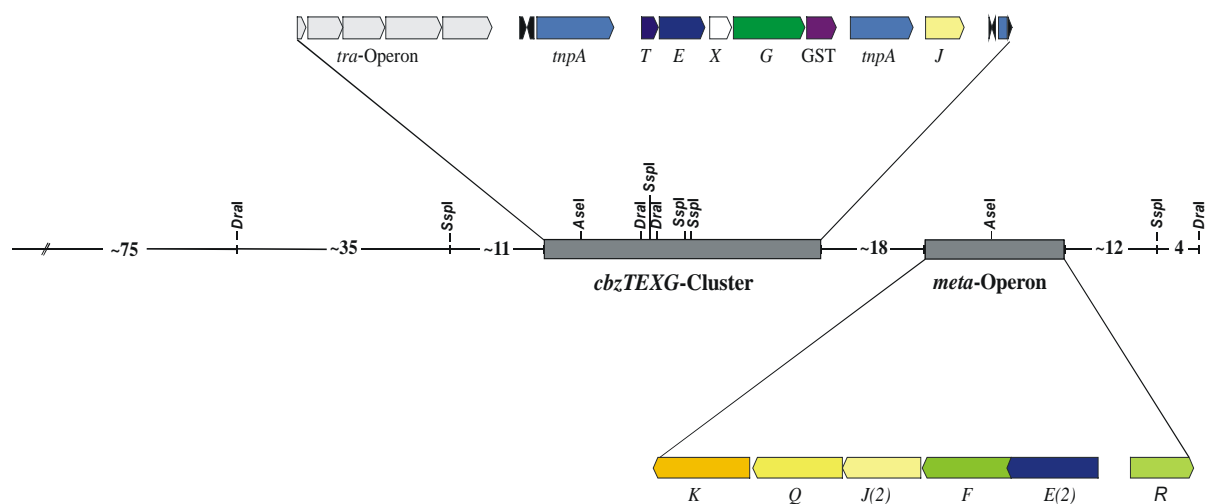


Abb. 1.4: *cbz*TEXG-Cluster und *meta*-Operon auf pKW1. Das Plasmid pKW1 ist ca. 180 kbp groß. Der *cbz*TEXG-Cluster umfasst folgende Gene des *meta*-Weges: *cbzT* (Ferredoxin), *cbzE* (Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase), *cbzX* (unbekannte Funktion), *cbzG* (2-Hydroxyumuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase), *GST* (putative Glutathion S-Transferase), *cbzJ* (2-Oxopent-4-enoat-Hydratase). Das *meta*-Operon beinhaltet weitere Gene des *meta*-Weges: *cbzK* (4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase), *cbzQ* (Acetaldehyd-Dehydrogenase), *cbzJ*(2) (2-Oxopent-4-enoat-Hydratase), *cbzF* (2-Hydroxy-6-ketonona-2,4-dienoat-Hydrolase), *cbzE*(2) (Catechol-2,3-Dioxygenase).

Des Weiteren konnte eine dritte Catechol-2,3-Dioxygenase auf dem Chromosom entdeckt werden. Sie wurde als *cbzE3* bezeichnet. Das Gen *cbzE3* weist eine Punktmutation auf, die zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zur Inaktivierung führt. Gen *cbzE3* liegt

stromabwärts von Genen, die für Enzyme zum Abbau von Chlorbenzol zum 3-Chlorcatechol (u.a. Chlorbenzol-1,2-Dioxygenase) kodieren.

Eine Übersicht aller in *P. putida* GJ31 identifizierter Gene von *meta*-Weg-Enzymen ist in Tabelle 1.4 zu finden. Sie zeigt zudem auf, für welche postulierten enzymatischen Abbauschritte des *meta*-Wegs noch kein zugehöriges Gen in *P. putida* GJ31 entdeckt werden konnte.

Tab. 1.4: Übersicht über bisher sequenzierte Gene und nicht gefundenen Gene des Chlorbenzol-Abbauweges.

Enzymfunktion	Enzyme in GJ31	Höchste Identität der Proteinsequenz, Stamm (NCBI Accession No.)	Lage der Gene
Benzol-Dioxygenase α -Untereinheit	CbzAa ^b	99% <i>P. putida</i> (AAA26005.1)	Chromosom
Benzol-Dioxygenase β -Untereinheit	CbzAb ^b	100% <i>P. putida</i> (AAA26006.1)	Chromosom
Ferredoxin	CbzAc ^b	100% <i>P. putida</i> (AAA26007.1)	Chromosom
NADH-Reduktase	CbzAd ^b	99% <i>P. putida</i> (AAA26008.1)	Chromosom
Chlorbenzol-dihydrodiol-Dehydrogenase	CbzB ^b	99% <i>P. putida</i> (AAA26009.1)	Chromosom
Ferredoxin	CbzT ^a	100% <i>P. fluorescens</i> (AAP51202.1)	<i>cbzTEGX</i> -Cluster
Catechol-2,3-Dioxygenase	CbzE ^a	97% <i>P. fluorescens</i> (AAP51203.1)	<i>cbzTEXG</i> -Cluster
	CbzE2 ^b	95% <i>P. putida</i> (AF176355)	<i>meta</i> -Operon
	CbzE3 ^b	99% <i>P. putida</i> (J04996)	Chromosom
2-HMS-Dehydrogenase	CbzG ^a	73% <i>P. putida</i> (BAB62052)	<i>cbzTEXG</i> -Cluster
2-HMS-Hydrolase	cbzF ^b	46% <i>Rubrivivax gelatinosus</i> (ZP_00245306)	<i>meta</i> -Operon
4-Oxalocrotonat-Tautomerase	nb		
4-Oxalocrotonat-Decarboxylase	nb		
2-Oxopent-4-enoat-Hydratase	CbzJ ^b	35% <i>C. testosteroni</i> (AB029044)	<i>cbzTEXG</i> -Cluster
	CbzJ2 ^b	67% <i>E. coli</i> (AP002551)	<i>meta</i> -Operon
2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolasen	CbzK ^b	84% <i>E. coli</i> (AE000142)	<i>meta</i> -Operon
Acetaldehyd-Dehydrogenase	CbzQ ^b	82% <i>P. putida</i> (M94186)	<i>meta</i> -Operon
Chloracetaldehyd-Dehydrogenase	nb		

Erläuterungen a: Mars *et al.* (1999), b: Kunze (2002), nb: bisher nicht in *P. putida* GJ31 gefundenes Enzym mit beschriebener Aktivität, HMS: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit galten der Organisation der Gene des *meta*-Weges auf dem Plasmid pKW1:

- Welche Gene des *meta*-Weges befinden sich neben *cbzE* auf dem Plasmid und gibt es Gene, die für den Chlorbenzol- bzw. Chlorbenzoatabbau wichtig sind, aber auf dem Chromosom liegen?
- Wie ist das gesamte Plasmid organisiert?
- Lassen sich durch Vergleich der Gene von *P. putida* GJ31 mit den Genen anderer Stämme Hinweise auf die Evolution der Abbauewege gewinnen?

Ziel der Arbeit sollte die Reinigung und nachfolgende Aufklärung der Struktur des Plasmids pKW1 aus *P. putida* GJ31 durch Cluster-Analyse sein. Hierbei sollte versucht werden, Gene und die zugehörigen Gen-Cluster in *P. putida* GJ31 aufzuspüren, deren Vorhandensein sich auf Grund des Phänotyps, also der Fähigkeit des Abbaus von Chloraromaten über den *meta*-Weg, vermuten ließ.

Hierbei war es hilfreich, Abkömmlinge von *P. putida* GJ31 mit anderen Eigenschaften in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Dies ist zum einen *P. putida* GJ31*. Dieser Stamm entstand aus *P. putida* GJ31* durch 3-Chlorbenzoatselektion (Zerlin, 2002) und kann im Gegensatz zu *P. putida* GJ31 neben Chlorbenzol und Benzoat auch 3-Chlorbenzoat verwerten. Ein weiterer Abkömmling ist *P. putida* QM1 (Kunze, 2002). Dieser Abkömmling entstand durch längere Anzucht auf Benzoat aus *P. putida* GJ31 und hat die Fähigkeit verloren, auf Chlorbenzol zu wachsen.

Insbesondere sollte in dieser Arbeit die folgenden Aufgabenkomplexe bearbeitet werden:

- Der Abbau von Benzoat in *P. putida* GJ31 sollte untersucht werden. Insbesondere sollte nach den Benzoat-Dioxygenase-Genen und dem Unterschied zwischen *P. putida* GJ31* und *P. putida* GJ31 gesucht werden, der die Fähigkeit zum Abbau von 3-Chlorbenzoat bewirkt.
- Die Gene der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und -Tautomerase sollten gesucht, die Gene sequenziert und die Proteine durch Enzymtests charakterisiert werden.
- Es sollte nach einem Gen gesucht werden, das für eine Chloracetaldehyd-Dehydrogenase in *P. putida* GJ31 kodiert.
- Die Sequenz des *cbz*TEXG-Clusters, insbesondere des von Kunze (2002) postulierten Transposonbereiches, sollte vervollständigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

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

Chemikalien des Arbeitskreises

Folgende Chemikalien wurden im Arbeitskreis synthetisiert, charakterisiert und freundlicherweise für die Experimente zur Verfügung gestellt:

- 3-Chlorcatechol
- 3-Brom-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure
- Chloracetaldehyd

Enzyme

DNA Polymerase I Klenow Fragment	Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland)
T4-DNA Ligase	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Taq-Polymerase	Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland), New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland), Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Advantage cDNA-Polymerase	Clontech (Heidelberg, Deutschland)

Antibiotika

Ampicillin

Gentamycin

Medienbestandteile

Difco, Detroit (USA)

Fluka, Buchs (Schweiz)

Gibco BRL, Eggenstein (Deutschland)

Merck, Darmstadt (Deutschland)

Oxoid, Wesel (Deutschland)

Serva, Heidelberg (Deutschland)

Sigma, Deisenhofen (Deutschland)

2.1.2 Geräte

Rundschüttler

Gyrotory® Water Bath Shaker Model G76, New Brunswick Scientific, Edison, N.J. (USA)

UV-Leuchttisch

UV-Transilluminator, UVP Inc. (USA)

Videodokumentationssystem

Videokamera der Firma Intas gekoppelt mit dem computer-gestützten Geldokumentationssystem PDQUEST 7.0.1. von Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)

Zentrifugen

Sorvall Ultracentrifuge OTD Combi, Du Pont, (Bad Nauheim, Deutschland)

Sigma 3K-1, Sigma (Stedt am Harz, Deutschland)

Biofuge Pico, Heraeus (Osterode, Deutschland)

Hermle Z233M Hermle Labortechnik (Wehingen, Deutschland)

French Presse

French Pressure Cell Press, American Instrument Company, Silver Spring, Maryland (USA)

Peristaltische Pumpe

LKB Bromma 2115 Multiplex (Schweden)

Spectrophotometer

CARY 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer Varian (Australien)

Photoelektrisches Kolorimeter

Klett-Summerson, Klett MFG. Co. INC. NY
(USA)

Thermocycler

Personal Cycler Biometra (Göttingen, Deutschland)

2.2 Biologische und Biochemische Methoden

2.2.1 Verwendete Organismen

Die bei der Anfertigung der Arbeit verwendeten Organismen können der Tabelle 2.2.1 entnommen werden.

Tab. 2.2.1: Übersicht der verwendeten Organismen

Stamm	Merkmal	Referenz
<i>Pseudomonas putida</i> GJ31	CB ⁺ , 3CBA ⁻	Oldenhuis <i>et al.</i> (1989)
<i>Pseudomonas putida</i> GJ31*	CB ⁺ , 3CBA ⁺ , 4CBA ⁻ , 3CT ⁺ , 4CT ⁻ , Tln ⁺ , Nic ⁻	Zerlin (2002)
<i>Pseudomonas putida</i> QM1	CB ⁻ , BA ⁺	Kunze (2002)
<i>Pseudomonas putida</i> PaW1	TOL-Plasmid, 3MBA ⁺ , Xyl ⁺ , Nic ⁺	Murray <i>et al.</i> (1972)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> AN10	Nah ⁺ , Genomovar 3	Rossello <i>et al.</i> (1991)
<i>P. putida</i> GJ31(pCCH101)	<i>P. putida</i> GJ31 mit Plasmid pCCH101 (siehe Tabelle 2.3.2)	Schmidt, pers. Mitteilung
<i>P. putida</i> GJ31*(pCCH101)	<i>P. putida</i> GJ31* mit Plasmid pCCH101 (siehe Tabelle 2.3.2)	Schmidt, pers. Mitteilung
<i>Escherichia coli</i> XL10-Gold® Kan	Tet ^R Δ(<i>mcrA</i>) 183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R) Tn5 (Kann ^R) Amy]	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
<i>Escherichia coli</i> One Shot TOP10	F' <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Californien, USA); Grant <i>et al.</i> (1990)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supEΔlacK169</i> (φ80 <i>lacZΔM15</i>) <i>hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>hsdS gal</i>	Studier und Moffatt (1986)

2.2.2 Nährmedien zur Kultivierung von *Pseudomonas* sp. und *Escherichia coli*

Durch Autoklavieren (20 min bei 121°C), wurden alle Nährmedien sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden durch Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert und dem Medium nach Abkühlen auf unter 50 °C zugesetzt.

Mineralmedium nach Dorn *et al.* (1974)

Die Phosphatpufferkonzentration nach Dorn *et al.* (1974) wurde verdoppelt, um eine bessere pH-Stabilisierung zu gewährleisten.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,0	g
KH_2PO_4	2,0	g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,05	g
$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{III})\text{-citrat} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0	g
Spurenelementlösung (nach Pfennig und Lippert, 1966, ohne EDTA und FeSO_4)	1,0	ml
bidest. H_2O	ad. 1000	ml
pH 7,2		

Mineralmedium Agar nach Dorn *et al.* (1974)

Mineralmedium	1000	ml
Agar	15	g

LB-Medium nach Miller *et al.* (1972)

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	10	g
bidest. H_2O	ad. 1000	ml
pH 7,2		

LB-Agar nach Miller *et al.* (1972)

LB-Medium	1000	ml
Agar	15	g

SOB-Medium

Bacto-Trypton	20	g
Bacto-Yeast	50	g
NaCl	0,58	g
KCl	0,19	g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2,03	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	46	g
bidest. H_2O	ad. 1000	ml
pH 7,2		

SOC-Medium

SOC-Medium

Glucose 20 mM

2.2.3 Anzucht und Stammerhaltung

Die Anzucht der Stämme erfolgte in Flüssigkulturen oder auf Agarplatten. Für kurzfristige Lagerung wurden die Platten bei 4°C aufbewahrt. Als Dauerkulturen wurden Glycerinkonserven mit mindestens 40% Glycerin angelegt und bei –80°C gelagert.

Anzucht von Pseudomonaden

Pseudomonaden, wie *P. putida* GJ31, wurden auf Rundschüttlern in Schikanenkolben mit Mineralmedium bei 30°C inkubiert. Substrate wie z.B. 3-Chlorbenzoat, Benzoat und Acetat, wurden direkt in das Mineralmedium gegeben, so dass eine Endkonzentration von 5 bzw. 10 mM erreicht wurde. Chlorbenzol wurde über einen Verdampfer hinzugegeben.

Anzucht von *E. coli* Stämmen

Die Anzucht von *E. coli* Stämmen erfolgte auf LB-Medium in Schikanenkolben auf Rundschüttlern bei 37°C. Dem LB-Medium wurden verschiedene Antibiotika zugesetzt.

Herstellung von Expressionsstämmen

Die Überexpression von Proteinen erfolgte mit dem L-Rhamnose induzierbaren Vektor pJOE2702 in *E. coli* DH5 α . Dazu wurden von den betreffenden Genen mittels PCR *Nde*I-*Bam*HI-Fragmente erzeugt und in mit *Nde*I und *Bam*HI behandelten pJOE2702 ligiert. Nach Transformation in *E. coli* DH5 α wurden die Zellen, wie obig beschrieben, angezogen. Zur Induktion des Promotors P_{thaBAD} wurde das Medium mit 0,2% L-Rhamnose angereichert. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt wie unter Material und Methoden 2.2.8 bis 2.2.13 beschrieben.

2.2.4 Trübungsmessung

Die Messung der optischen Dichte einer Bakterienkultur erfolgte mit dem Cary50 Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 546 nm (OD₅₄₆) in geeigneter Verdünnung. Eine andere Methode war die direkte Messung der optischen Dichte in Klett-Einheiten unter Verwendung von Klett-Kolben und eines Klett-Spektrometers. In Klett-Kolben (300 mL) wurden Kulturen aus Pseudomonaden-Vorkulturen auf Mineralmedium angeimpft. Dem Mineralmedium wurde Acetat in einer Konzentration von 10 mM als Kohlenstoffquelle

zugesetzt. In regelmässigen Zeitabständen wurde die Trübung mittels Klett's photoelektrischem Kolorimeter (Klett-Summerson, Klett Mit freundlichen Grüßen. Co. INC. NY, USA) bestimmt.

2.2.5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC wurde zur Quantifizierung von wasserlöslichen Substraten und Metaboliten eingesetzt.

Das verwendete System bestand aus folgenden Komponenten:

Säule (Typ LiChrosphor 100 RP18, Korngröße 5 µm, Innendurchmesser 4 mm, Säulenlänge 300 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland)

ASI-100 Automated Sample Injector (Dionex, Sunnyvale, USA)

P580 Pump (Dionex, Sunnyvale, USA)

UVD 340S Detektor (Dionex, Sunnyvale, USA)

PC-gestütztes HPLC-Steuerungsprogramm Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, USA)

Zur Analyse von Benzoatlösungen wurde als mobile Phase eine 60%ige Lösungen von Methanol in Wasser verwendet, der 0,2% (w/v) Phosphorsäure zugesetzt wurde. Die durch Zentrifugation von Zellen befreiten Proben wurden über einen Autosampler direkt injiziert (jeweils 10 µL). Die Flussrate des verwendeten Systems betrug 1 mL/min. Die Messung erfolgte bei 220 nm.

2.2.6 Gewinnung von zellfreiem Rohextrakt

Die Zellkulturen wurden bei 4500 U/min (4°C, 15 min) sedimentiert, mehrfach in Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl, 1 mM DTE) resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 5 mL Aufschlusspuffer resuspendiert, DNase hinzugefügt und mittels French-Press aufgeschlossen. Dies geschah mit einem Druck von 14 MPa. Der so gewonnene Rohextrakt wurde in der Ultrazentrifuge bei 35.000 U/min (4°C, 45 min) von Zelltrümmern befreit.

2.2.7 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Bestimmung des Proteingehalts in zellfreien Extrakten erfolgte nach der Coomassie-Blue-Methode von Bradford (1976) mit dem BIO-RAD PROTEIN ASSAY (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard.

2.2.8 Aktivität der 4-Oxalocrotonat Decarboxylase nach Harayama *et al.* (1989)

In einer Küvette wurden Tris-HCl-Puffer, MgSO₄ und 4-Oxalocrotonat vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µL Rohextrakt gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 265 nm ($\epsilon = 2400 \text{ L/mol cm}$) verfolgt.

Reaktionslösung:

50 µmol	Tris-HCl-Puffer pH 7,0
1 µmol	MgSO ₄
0,1 µmol	4-Oxalocrotonat
10 µL	Rohextrakt

2.2.9 Aktivität der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase nach Sala-Trepat und Evans (1971)

In einer Küvette wurden 456 µl, Tris-HCl-Puffer, MgSO₄ 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. Die Abnahme der Extinktion ließ sich verfolgen, indem die Reaktionszeit immer weiter verlängert wurde und so die 4-Oxalocrotonatkonzentration linear abnahm.

Reaktionslösung: 466 µl

50	µmol Tris-HCl-Puffer, pH 7,4
1	µmol MgSO ₄
0,1	µmol 4-Oxalocrotonat
10	µl Rohextrakt

Stopplösung: 534 µl

150	µmol NaOH
8	µmol EDTA

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

2.2.10 Aktivität der 4-Oxalocrotonat Tautomerase nach Sala-Trepat und Evans (1971) sowie Harayama *et al.* (1989)

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 (Whitman *et al.*, 1992). Die Messung erfolgte nach

Einstellung des Gleichgewichts (Whitman *et al.*, 1991). Der Blindwert ohne Zellextrakt wurde von der enzymbedingten Abnahme subtrahiert.

1 mL Reaktionsansatz enthielt:

10 μmol	10 mM Phosphatpuffer, pH 7,3
0,08 μmol	4-Oxalocrotonat
10 μL	Rohextrakt

2.2.11 Aktivität der Catechol-2,3-Dioxygenase nach Nozaki (1970)

Beobachtet wurde der Abbau verschiedener Catecholderivate durch die Catechol-2,3-Dioxygenase über die Extinktionszunahme bei der Bildung der entsprechenden 2-Hydroxy-muconsäuresemialdehyde. Der genutzte Wellenlängenbereich lag bei 375 und bei 290 nm.

Das Volumen der Quarz-Messküvette von 1 mL enthielt folgende Mengen:

45 μmol	Phosphatpuffer, pH 7,4
0,5 μmol	Catechol(derivat)
8-20 μL	Rohextrakt

Tab. 2.2.11.1: Wellenlängen und Extinktionskoeffizienten für die Ringöffnungsprodukte.

Substrat	R ₁	R ₂	Wellenlänge [nm]	Extinktionskoeffizient [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Catechol	H	H	375	36000
3-Chlor-Catechol	Cl	H	290	12500

Bemerkungen: Die Wellenlängen und Extinktionskoeffizienten für die im Enzymtest entstehenden Ringöffnungsprodukte wurden aus Mars *et al.* (1999) entnommen.

2.2.12 Aktivität der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktase (DHB-Dehydrogenase) nach Reiner (1972)

Beobachtet wurde die NAD⁺-abhängige Dehydrogenierung von 3-Brom-DHB durch die DHB-Dehydrogenase bei einer Wellenlänge von 340 nm über die Bildung von NADH. Der Extinktionskoeffizient von NADH bei dieser Wellenlänge betrug 6300 L mol⁻¹ cm⁻¹. Die Reaktion wurde mit der Zugabe des Rohextraktes gestartet.

Der Enzymtest erfolgte mit dem 3-Brom-Derivat des DHB aus Gründen der Verfügbarkeit von 3-Brom-DHB bei den Laborchemikalien.

Das Volumen der Quarz-Messküvette von 1 mL enthielt folgende Mengen:

20 μ mole	Tris/HCl-Puffer pH 8,4
2 μ mole	NAD ⁺
0,4 μ mole	3-Brom-DHB
10 μ L	Rohextrakt

2.2.13 Aktivität der (Chlor)-Acetaldehyd Dehydrogenase nach Shingler *et al.*, 1992

Die Oxidation von (Chlor)-Acetaldehyd zu Acetyl-CoA ist NAD⁺-abhängig. Die Reduktion von NAD⁺ zu NADH wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm über die Extinktionsänderung verfolgt. Der Extinktionskoeffizient von NADH bei dieser Wellenlänge betrug 6300 L mol⁻¹ cm⁻¹. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Coenzym A gestartet. Als eine Unit wurde die Menge Enzym definiert, die 1 μ mol NAD⁺ in Anwesenheit von Coenzym A pro Minute reduziert.

Das Volumen der Messküvette von 1 mL enthielt folgende Mengen:

50 μ mole	Phosphat-Puffer pH 7,5
30 μ mole	(Chlor-)Acetaldehyd
0,9 μ mole	NAD ⁺
100 μ L	Rohextrakt
0,3 μ mol	Coenzym A

2.2.14 β -Galactosidase Aktivität nach Miller (1972)

Exponentiell bei 30°C im Schüttelwasserbad auf 100 mL Mineralmedium wachsenden Kulturen *P. putida* GJ31(pCCH101) und *P. putida* GJ31*(pCCH101), dem 50 μ L Gentamycin (20 mg/mL) und 2 mL Succinat (0,5 M) zugesetzt worden war, wurden bis zu einer optische Dichte OD₆₀₀ = 0,1 angezogen. Bei Erreichen dieser optischen Dichte wurde jeweils 1 mM Benzoat oder 1mM 3-Chlorbenzoat zugegeben. Für den Enzymtest wurden 0,1 mL Aliquots aus den Kulturen (OD₆₀₀ = 0,2) entnommen und mit 0,7 mL Z-Puffer (0,06 M Na₂HPO₄, 0,04 M NaHPO₄, 0,01 M KCl, 0,001 M MgSO₄ und 0,05 M β -Mercaptoethanol, pH = 7,0) aufgefüllt. Es wurden 20 μ L Chloroform und 10 μ L 0,1%iges SDS hinzugegeben und gevortext. Die Reaktion der β -Galactosidase mit *o*-Nitrophenyl- β -D-Galactosid (ONPG) zu Galactose und *o*-Nitrophenol wurde durch Zugabe von ONPG gestartet und nach 15 min. durch Zugabe von Na₂CO₃ gestoppt. Nach dem Stopp der Reaktion wurde die optische Dichte bei den Wellenlängen 420 nm und 550 nm bestimmt und die jeweiligen Miller-Einheiten mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Units} = 1000 \times (\text{OD}_{420} - 1,75 \times \text{OD}_{550}) \div (t \times v \times \text{OD}_{600})$$

t: Reaktionszeit [min.], v: Volumen der getesteten Kultur im Test [mL]

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete Kits

Tab. 2.3.1: Übersicht der verwendeten Kits

Bezeichnung	Firma
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
DNeasy [™] Tissue Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PCR-Script [™] Amp Cloning Kit	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
Zero Blunt [®] TOPO [®] PCR Cloning Kit for sequencing	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
TOPO TA PCR Cloning Kit for sequencing	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Universal Genom Walker [™] Kit	BD-Biosciences, Clontech (Heidelberg)
Nucleobond AX100	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
DIG High Primer DNA Labeling and Detection Kit I	Roche Diagnostics (Penzberg, Deutschland)
Ready-To-Go DNA Labelling Beads [α - ³² P]-dCTP	Amersham (Buckinghamshire, GB)

2.3.2 Verwendete Vektoren und Plasmide

Tab. 2.3.2: Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide

Plasmid	Genotyp/Eigenschaften	Referenz
pWK1	<i>cbzE</i>	GJ31, Oldenhuis <i>et al.</i> , 1989
pKW2	<i>cbzE</i>	GJ31*, diese Arbeit
pZSG1	$\Delta(cbzE)$	QM1, diese Arbeit
pPCR script Amp SK(+)	ColE1 <i>f1 lacZ'</i> Ap ^r	Stratagene, Heidelberg
pCR [®] 4Blunt-TOPO [®]	<i>lacZ'</i> <i>ccdb</i> , ori pUC, bla, neo	Invitrogene, USA
pJOE2702	ColE1, bla, P _{thaBAD} , rrnB	Volff <i>et al.</i> , 1996
pUCPU21	ColE1, bla, ori, <i>lacZ'</i>	Wehmeier, pers. Mitteilung
pCCH101	Gm ^r , Sm ^r , Sp ^r , <i>benA-lacZ</i> Fusion in pHRP309	Cowles <i>et al.</i> , 2000
pCCH106	Ap ^r , der offene Leserahmen von <i>benR</i> (<i>NdeI/PstI</i> geschnitten) in pT7-7	Cowles <i>et al.</i> , 2000

Bemerkungen: Sp^r: Spectinomycin-resistent, Gm^r: Gentamycin-resistent, Sm^r: Streptomycin-resistent

2.3.3 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden unter Verwendung der Software Primer-Find v. 3.0 generiert und von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tab. 2.3.3: Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz	Gen
Kay 1	5´-CT(C/G)GA(A/G)A(A/C)CTGCA(C/G)A(A/G)CTGCAGG-3´	<i>nahK</i>
Kay 2	5´-C(C/T)AGGTG(A/G)TTGGCCAGCATGGC-3´	<i>nahK</i>
Kay 3	5´-CC(G/T)GT(G/T)TTCGG(C/G)TTTCTGG(C/T)(C/G/T)G-3´	<i>nahK</i>
Kay 4	5´-CATGACATCC(A/C)CAAGGT(C/G)AC-3´	<i>nahK</i>
Kay 5	5´-GCGCAC(C/G)GTGATGTTGTGCGC-3´	<i>nahK</i>
Kay 6	5´-ATGCC(C/T)AT(C/T)GCCCAG(A/T)T-3´	<i>nahl</i>
Kay 7	5´-G(C/G)CGATGCCGAAGTGG-3´	<i>nahl</i>
Kay 8	5´-TGAA(A/G)CACATCTTCGAGG-3´	<i>benA</i>
Kay 9	5´-GATGCAGTAGATGGTGAT-3´	<i>benA</i>
Kay9a	5´-CTACTGCATCGC(C/G)CC(C/G)AA(A/G)GG(C/T)-3´	<i>benB</i>
Kay 10	5´-TTCCTCTACCG(C/T)(C/G)A(A/G)-3´	<i>benB</i>
Kay 11	5´-GA(C/T)G(A/T)(C/G)GTAGA(C/T)GTC-3´	<i>benB</i>
Kay 12	5´-CGA(A/G)GACGG(C/G)GT(C/G)AC(C/T)CG(C/T)TTC-3´	<i>benC</i>
Kay 12KR	5´-GAA(A/G)CG(A/G)GT(C/T)AC(C/G)CCGTCT(C/T)CG-3´	<i>benC</i>
Kay 12a	5´-GGCAGTC(C/G)AG(A/C/G)GG(A/G)ATGT-3´	<i>benC</i>
Kay 13	5´-A(A/G)TG(A/G)C(A/C/G)(A/G)ACCGCCTCGACCAT-3´	<i>benC</i>
Kay 14	5´-CGCAACCT(C/G)TGCCT(C/G)TACCC-3´	<i>benA</i>
Kay 15	5´-TC(C/T)TC(C/G)AGGCC(A/G)CC(A/G)CGGTT-3´	<i>benB</i>
Kay 15KR	5´-AACCG(C/T)GG(C/T)GGCCT(C/G)GA(A/G)GA-3´	<i>benB</i>
Kay 16	5´-GCAAGGT(C/T)G(C/T)C(A/C/G)T(C/G/T)GTCACCG-3´	<i>benD</i>
Kay 17	5´-GGCCTCGTC(A/C/G)GA(A/G)GC(C/G)AGGAA-3´	<i>benD</i>
Kay 18	5´-C(C/G)GG(C/G)CAGTACGT(C/G)AAC(A/C)TC-3´	<i>benC</i>
Kay 19	5´-CCA(A/G)A(G/T)GGTGCC(A/G)CCGACGT-3´	<i>benD</i>
Kay25	5´-ACCAGGTCTAAACAATAACAAGGGAG-3´	<i>benA</i>
Kay26	5´-CTTGCCGCTGTTGTTGAAGGTCCAGC-3´	<i>benA</i>
Kay27	5´-GCGCGACTTCCTTTTCCGCGAAGCGC-3´	<i>benBC</i>
Kay28	5´-AGCTCAGGGTGTGCCAGTTGAAGCGC-3´	<i>benBC</i>
Kay29	5´-GAACTATTGTTGATCAACCCCGACGA-3´	<i>benRA</i>
Kay30	5´-GAAGTCGTTTTTCTCGGGTATCTGGC-3´	<i>benRA</i>
Kay33	5´-GGAGCGGCCATCCTTACCCATCGA-3´	<i>Tn5501</i>
Kay34	5´-TCATCGACCGTCCTTCCCGCACCACG-3´	<i>Tn5501</i>
Kay35	5´-ACCACTCATCCGCAAGCCAGCCTCAG-3´	<i>benR</i>

Bezeichnung	Sequenz	Gen
Kay36	5´-GAGTAGGTCAGGTCAACCGGGTCGT-3´	<i>benR</i>
Kay37	5´-ACCGTCGAGGACGCCACCACATCTC-3´	<i>nahN</i>
Kay38	5´-GAAGTGGCCGAGGGTGTGGCCAGCCAG-3´	<i>nahO</i>
Kay39	5´-CGCCTACCACATCTCCCTGCGCAT-3´	<i>nahP</i>
Kay40	5´-GATGCCGAAGTGGCCGAGGGTGT-3´	<i>nahP</i>
Kay41	5´-GAAGGAATTGACCGGCCGCACCGA-3´	<i>tnpA</i>
Kay41a	5´-GGGGTTGTACGCCGAATCCCAGA-3´	<i>IR</i>
Kay41b	5´-CTGGCAGGCAGCAATATTCACGCTTA-3´	<i>IR</i>
Kay43	5´-TCGACCCACAACAAAGAGAAAAGGTG-3´	<i>nahNIH</i>
Kay44	5´-AATCGTCGGTCAGGCCGGTCCAGATG-3´	<i>nahNIH</i>
Kay45	5´-GCCCCGGCCATGTGCAGCTGCGTGTACTGGAC-3´	<i>nahH</i>
Kay46	5´-CGGTCGTGATAGAAGATCGCCTTGCCCAGGTC-3´	<i>nahH</i>
Kay47	5´-GACTTATTGCAGAGATTGCGCAGA-3´	<i>nahI</i>
Kay48	5´-AGGCAGACTTGCCCGCAGTTGGCG-3´	<i>nahI</i>
Kay49	5´-CATGACCGTGCTGACCTGATGGTT-3´	<i>nahI</i>
Kay50.1	5´-GACTTATTGCAGAGATTGCGCAGATG-3´	<i>nahI</i>
Kay50.2	5´-CAGATGAAAGAGATCAAGCATTTTCATT-3´	<i>nahI</i>
GSP1A	5´-TTGAGCAGCTTGCCGCTGTTGTTGAAGG-3´	<i>benA</i>
GSP2A	5´-GTAGATCCAGTTGCCCTCGAAGATGTGC-3´	<i>benA</i>
GSP1B	5´-TGCACTGGAACATGCCGCCACCCAGAA-3´	<i>benA</i>
GSP2B	5´-AACTGTGCCTGTACCGAACGTGTACCTG-3´	<i>benA</i>
GSP1C	5´-TCTTCGGATGGATCAGCTTGGAGCAA-3´	<i>nahK</i>
GSP2C	5´-TCGTTGGTCACCTTGTGGATGTCATG-3´	<i>nahK</i>
GSP1D	5´-AGAACGGTGAGGTGGTAGAACTTGGT-3´	<i>nahK</i>
GSP2D	5´-GCACATTCATCATGACCGGTGGCATCA-3´	<i>nahK</i>
GSP1Aa-2	5´-CTACCTGCTCCGCAGACCGCCTATGAA-3´	<i>benA</i>
GSP2Aa-2	5´-AACGCTCAGCCGCTAACGTTGCACAT-3´	<i>benA</i>
GSP1Ab-2	5´-TCAATAGATATTGCCGGGCGACTGGTCA-3´	<i>benA</i>
GSP2Ab-2	5´-CGTAGAAAGAGCACGCTCTAGTGTATGT-3´	<i>benA</i>
GSP1B-2.1	5´-AATCTCGCTGATCTGGTACGGCAACCGA-3´	<i>benA</i>
GSP2B-2.1	5´-GCATCTTCGGCACAACATCAGCAACATCG-3´	<i>benA</i>
GSP1D.2	5´-TGATGGAGAAGAACGGTGAGGTGGTAGA-3´	<i>nahK</i>
GSP2D.2	5´-GCACATTCATCATGACCGGTGGCATCAC-3´	<i>nahK</i>
GSP1C.2	5´-ATCTTCGCCCAAGAGGTCAGGCCCATCT-3´	<i>nahK</i>
GSP2C.2	5´-CATCTCGGGATAATCGTTGGTCACCTTG-3´	<i>nahK</i>
GSP1Ab-3.2	5´-TATCTGTTGCGTAAAGTTCTGGCTGAAC-3´	<i>benA</i>
GSP1Ab-3.2	5´-GCACTAGCTACTTAACCAGCGAAAGG-3´	<i>benA</i>
GSP1Aa-2.2	5´-TTGCCTGATCTCCTGAAGCTCCTTGGCT-3´	<i>benA</i>
GSP1Aa-2.2	5´-GCACTAAAACGCTCAGCCGCTAACGTTG-3´	<i>benA</i>

Bezeichnung	Sequenz	Gen
GSPAU-1	5´-GATGAACGCGGGCTCGGCCCTGCATGA-3´	<i>aldA</i>
GSPAU-2	5´-TATTCGCCGACCTGCCACCCAGTTCA-3´	<i>aldA</i>
GSPAD-1	5´-ACTACATCCAGCCGACCCCTGCCTCAAG-3´	<i>aldA</i>
GSPAD-2	5´-TCAAGGCCGGGCGCGTGTGGACCAAC-3´	<i>aldA</i>
GSPRup-1	5´-CACCTTGAGGATGAATTTCTCGCAGTCT-3´	<i>benR</i>
GSPRup-2	5´-GTAGATGGTTTCCAGTGCCGGCGAGGTA-3´	<i>benR</i>
GSPAup-1.2	5´-CTGCAAGTAGGAAAGAATCTTGTCGT-3´	<i>aldA</i>
GSPAup-2.2	5´-GATCTTGGCGATCTTCTTCATCACCT-3´	<i>aldA</i>
GSPRup-1.2	5´-AGGATGAATTTCTCGCAGTCTCCGA-3´	<i>benR</i>
GSPRup-2.2	5´-AGATGGTTTCCAGTGCCGGCGAGGTA-3´	<i>benR</i>
GSP4ODdo-1.2	5´-GATGGAGAAGAACGGTGAGGTGGTAG-3´	<i>nahKI</i>
GSP4ODdo-2.2	5´-ACATTCATCATGACCGGTGGCATCAC-3´	<i>nahKI</i>
GSP4ODup-1.2	5´-TTTCCGCCTCGATCTTCGGATGGATC-3´	<i>nahK</i>
GSP4ODup-2.2	5´-GAGAAAGCCGTAGATCGGGCGTCTCCA-3´	<i>nahK</i>
GSPbenRupII-1	5´-AGCAAAAAGCGGGGGTTGGGCAATG-3´	<i>benR</i>
GSPbenRupII-2	5´-GTTTATCGAACGGTGTTCCTGTGC-3´	<i>ben^r</i>
GSPaldAupII-1	5´-AACCGGTGAACGCGATCTTGGCGATG-3´	<i>aldA</i>
GSPaldAupII-2	5´-AACGCGATCTTGGCGATGCGCTTGCTG-3´	<i>aldA</i>
GSPnahMup-1	5´-GCCATCATCAGAAAGCCGACGGTAT-3´	<i>nahH</i>
GSPnahMup-2	5´-ACGAATGGTGGAGACGCCACAGTCGA-3´	<i>nahM</i>
GSP4OTdo-1	5´-GATGCATTCACCATCGAGTAGGATCG-3´	<i>nahI</i>
GSPaldAupIII-1	5´-TTCGACGGTGGACGGGATGATGTTCTCG-3´	<i>aldA</i>
GSPaldAupIII-2	5´-TGAACGCGATCTTGGCGATGCGCTTGCT-3´	<i>aldA</i>
GSPnahOupI-1	5´-ATTTCCAGCGTGCCGACGTGCTGCTTG-3´	<i>nahO</i>
GSPnahOupI-2	5´-TGTACATAGGCGGAGGTGGCATCGAAG-3´	<i>nahO</i>
GSPnahNup-1	5´-TCAATGGCTTCCTCCTCGCTGTGAA-3´	<i>nahN</i>
GSPnahNup-2	5´-TATGGCAGCAGGGGCCGAAGATTTCCCTC-3´	<i>nahN</i>
GSPtnpAdo-1	5´-ACGAAGTAGGCAGCTGGCAATGCCA-3´	<i>IR</i>
GSPtnpAdo-2	5´-ACATCCTGCTGAACGGGCATTACACCTT-3´	<i>IR</i>
GSPnahPup-1	5´-GCTCATCAGGCTGTCTCGATCAGATG-3´	<i>nahP</i>
GSPnahPup-2	5´-TGAAATCACCGGCCTTGACCGGTTCCA-3´	<i>nahP</i>
GSPnahNup2-1	5´-TCGATGGCTTCCGCTTCCGTGTGAA-3´	<i>nahN</i>
GSPnahNup2-2	5´-TGGTAGTAAC TGAGGACTTTTTCACG-3´	<i>nahN</i>
GSPnahIup-1	5´-ATCACCTGGCCATTGACCGGGTTG-3´	<i>nahI</i>
GSPnahIup-2	5´-TTGATCTCTTTCATCTGCGCAATC-3´	<i>nahI</i>
GSPnahIup2-1	5´-AATGAAATGCTTGATCTCTTTCATCTG-3´	<i>nahI</i>
GSPnahIup2-2	5´-CATCTGCGCAATCTCTGCAATAAGTC-3´	<i>nahI</i>
aldA-1	5´-AAGGCCCGCTACGGCAAC-3´	<i>aldA</i>
aldA-2	5´-ATGSGCVGGATAGGCGTGRTAG-5´	<i>aldA</i>

Bezeichnung	Sequenz	Gen
aldA-3	5´-CGCATCGCCAAGAT (C/T)GC (C/G)TTCA-3´	<i>aldA</i>
aldA-4	5´-TGTTCTTGGTCTGCTG (A/G)TA (A/G)TG-3´	<i>aldA</i>
KTbenBC-1	5´-CGCATCAAGACCGAGCGCTCCA-3´	<i>benBC</i>
KTbenBC-2	5´-CTCCAGCATCGCGGTGAACGGT-3´	<i>benBC</i>
Tn5501A-1	5´-CAACATGGCTTGTCTCGCTCTTGGTC-3´	<i>Tn5501</i>
Tn5501A-2	5´-CGCGTCGCGGTAAGTCCGTGCTCTGG-3´	<i>Tn5501</i>
Tn5501M-1	5´-CAAATCCTTGTGGCTGCTCGCGATCC-3´	<i>tnpR</i>
Tn5501M-2	5´-TTGACGCTCATGCCGTGCGCCGTGTT-3´	<i>tnpR</i>
Tn5501E-1	5´-CGCCAACGCGCCTACAAAATCATGTC-3´	<i>tnpA</i>
Tn5501E-2	5´-TCAGCCCAGCTCCAGTCCC GCCACGA-3´	<i>tnpA</i>
4ODOT-1	5´-(C/G)GTCGG (C/T)GGCCAGGAAGA-3´	<i>nahKI</i>
4ODOT-2	5´-CGAT (A/G)CCGAAGTGGCCCTTGG-5´	<i>nahKI</i>
TEXG-P1A	5´-CAAGCGCTGTTGGTACTGCCATGCAG-3´	<i>TEXG-Cluster</i>
TEXG-P2A	5´-AGGAACTCATCGACCAAGCGCGAGAC-3´	<i>TEXG-Cluster</i>
TEXG-P1B	5´-CGACCTGGCTTTAGCAGACATGGACA-3´	<i>TEXG-Cluster</i>
QES1	5´-CATGTCCGGCCTTGGTAATTGCCCTCGT-3´	<i>traE</i>
QES2	5´-CGCATGAATAGCGCCCGGTACTACTG-3´	<i>traF</i>
QES3	5´-GACCACGGCTCAGGTCCTGAACAC-3´	<i>traF</i>
QES39	5´-GGCCAGCGCGGTGCGCTCGTGAGTTCG-3´	<i>Tn5501</i>
QES41	5´-GACGAACTGACTCCCCGAGAATTTTCGATACC-3´	<i>Tn5501</i>
Nah1.1	5´-CCGACGCCCTCCATTCCTGAGAGAGA-3´	<i>nahLO</i>
Nah1.2	5´-TTGCCCTTCCTTGGCCCCGCCGACCTG-3´	<i>nahLO</i>
Nah2.1	5´-CAGCCACAAGCACCGTGAAAAAGTCC-3´	<i>nahN</i>
Nah2.2	5´-TCGAGCATGCGCAGGGAGATGTGGTA-3´	<i>nahN</i>
Nah3.1	5´-CGGCAAGACCATCTACTTCTTCGACC-3´	<i>nahHIN</i>
Nah3.2	5´-TCAATGGCTTCCTCCTCGCTGTGCAA-3´	<i>nahHIN</i>
Nah4.1	5´-TGCAAACCAATAACAAGAGTTCGTTCC-3´	<i>nahTH</i>
Nah4.2	5´-CGAACCATCAGGTCAGCACGGTCATG-3´	<i>nahTH</i>
KayMod-1	5´-CCAGAAGGTGAGCATATGAACCGTACCC-3´	<i>nahK</i>
KayMod-2	5´-TGCCGCGGATCCATTCACCATCGAG-3´	<i>nahI</i>
KayMod3	5´-GATCCGAGTGCCTTGCATATGGAAAG-3´	<i>benR</i>
KayMod4	5´-GGCGAAGGATCCAGACTTCTTCATCC-3´	<i>benR</i>
KayMod5	5´-CCTGAGGATCCAACGCTCGCAACTGG-3´	<i>benR</i>
AldAMod-1	5´-CCAGGAGACACATATGCGTTACGCA-3´	<i>aldA</i>
AldAMod-2	5´-TGAACCGGATCCTACAGGGGTGTACAG-3´	<i>aldA</i>
NahOMod-1	5´-GATCGAGGACAGCCATATGAGCAAGA-3´	<i>nahO</i>
NahOMod-2	5´-TCGCGCAGGATCCTGTCTGTCAGGGT-3´	<i>nahO</i>
AP1 ^a	5´-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3´	Adaptor
AP2 ^a	5´-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3´	Adaptor

Bezeichnung	Sequenz	Gen
Qno17 ^b	5' -GTCAGCGGCAAGACCTACGAGAAGCGCAAC-3'	<i>cbzG</i>
Qno18 ^b	5' -GTAGATACGGGCCATCAGCACCGCCACAA-3'	<i>tnpA2</i>
Qno30 ^b	5' -CTACGAGAGCTGGCTGGAGCTGGCTTGCGA-3'	<i>tnpA1</i>
Qno31 ^b	5' -AAAACCCGCTGTGCTTGTAGCCCAGCATCT-3'	<i>tnpA1</i>
Qno32 ^b	5' -CATGGACATGGCCCTGGCGGCGGCGAACTT-3'	<i>traG</i>
Qno33 ^b	5' -CGGGTCGTACAGGATTTCCAGCACTTCACG-3'	<i>traG</i>
Qno34 ^b	5' -ATCAGCGCGTCAGTTGGTAGGGTGGCAACA-3'	Tn5501
Qno35 ^b	5' -AGGCGCCTCCACCGGCCGCTCACTGGTCAA-3'	Tn5501
Qno36 ^b	5' -CGGCTGCGGCTCAATGATGTGGTTGTCTCCA-3'	<i>ORF16/17</i>
Qno37 ^b	5' -TCCGACGACACGCGCATGTAGCCAACCAAC-3'	<i>ORF16/17</i>
Qno38 ^b	5' -CTGCAGGCTAGGCCGGCTGCTGG-3'	<i>ORF16/17</i>
Qno39 ^b	5' -ACGTACCCAGGCATAGCACAGCAGGTAGAG-3'	<i>ORF16/17</i>
Qno40 ^b	5' -GCACAAATGCCGGTGTGCAAGCTATCGTC-3'	<i>ORF16/17</i>
Qno41 ^b	5' -GTTGCGGTACCAGATGTGCAACACGTGGTG-3'	<i>ORF16/17</i>
Qno42 ^b	5' -GGTTGTACGCCGGAATCCCAGAAATTTCCG-3'	<i>ORF16/17</i>
C230-3 ^c	5' -AGGGTTCATTTTCATCAACGAACGAG-3'	<i>cbzE</i>
C230-4 ^c	5' -CAAGCTGATGAATCAAGACTTGGGG-3'	<i>cbzE</i>
IncN rep 1 ^d	5' -AGTTCACCACCTACTCGCTCCG-3'	<i>rep</i>
IncN rep 2 ^d	5' -CAAGTTCTTCTGTTGGGATTCCG-3'	<i>rep</i>
IncN kika 1 ^d	5' -ACTTACCTTTTATCAACATTTCTGGCG-3'	<i>kika</i>
IncN kika 2 ^d	5' -CGACTGGTTACTTCCACCTTCGC-3'	<i>kika</i>
IncN oriT 1 ^d	5' -TTGGGCTTCATAGTACCC-3'	<i>oriT</i>
IncN oriT 2 ^d	5' -GTGTGATAGCGTGATTTATGC-3'	<i>oriT</i>
IncP oriT 1 ^d	5' -CAGCCTCGCAGAGCAGGAT-3'	<i>oriT</i>
IncP oriT 2 ^d	5' -CAGCCGGCAGGATAGGTGAAGT-3'	<i>oriT</i>
IncP trfA1 1 ^d	5' -ATGACGACCAAGAAGCG-3'	<i>trfA1</i>
IncP trfA1 2 ^d	5' -AACCCCGAGCCGGAAGT-3'	<i>trfA1</i>
IncP trfA2 1 ^d	5' -CGAAATTCRTRTGGGAGAAGTA-3'	<i>trfA2</i>
IncP trfA2 2 ^d	5' -CGYTTGCAATGCACCAGGTC-3'	<i>trfA2</i>
IncP korA 1 ^d	5' -ATGAAGAAACGGCTNACCGA-3'	<i>korA</i>
IncP korA 2 ^d	5' -TTCCTGTTTTYYTCTTGGCGTC-3'	<i>korA</i>
IncP traG 1 ^d	5' -CTGCGTCACGATGAACAGGCTTACC-3'	<i>traG</i>
IncP traG 2 ^d	5' -ACTTCCAGCGGCGTCTATGTGG-3'	<i>traG</i>
IncQ repB 1 ^d	5' -TCGTGGTCGCGTTCAAGGTACG-3'	<i>repB</i>
IncQ repB 2 ^d	5' -CTGTAAGTCGATGATCTGGGCGTT-3'	<i>repB</i>
IncQ oriV 1 ^d	5' -CTCCCGTACTAACTGTACAG-3'	<i>oriV</i>
IncQ oriV 2 ^d	5' -ATCGACCGAGACAGGCCCTGC-3'	<i>oriV</i>
IncQ oriT 1 ^d	5' -TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC-3'	<i>oriT</i>
IncQ oriT 2 ^d	5' -GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG-3'	<i>oriT</i>

Bezeichnung	Sequenz	Gen
IncW oriV 1 ^d	5´-GACCCGGAAAACCAAAAATA-3´	<i>oriV</i>
IncW oriV 2 ^d	5´-GTGAGGGTGAGGGTGCATC-3´	<i>oriV</i>
IncW oriT 1 ^d	5´-TCTGCATCATTTGTAGCACC-3´	<i>oriT</i>
IncW oriT 2 ^d	5´-CCGTAGTGTACTGTAGTGG-3´	<i>oriT</i>
IncW trwAB 1 ^d	5´-AGCGTATGAAGCCCGTGAAGGG-3´	<i>trwAB</i>
IncW trwAB 2 ^d	5´-AAAGATAAGCGGCAGGACAATAACG-3´	<i>trwAB</i>
HS298 ^e	5´-TGGATCCCAC(A/G)TG(A/C/G/T)GT(A/G)TA(G/A/T)ATCA T(A/C/G/T)GT-3´	<i>intI</i>
HS286 ^e	5´-GGGATCCTC(G/C)GCT(G/T)GA(A/G)CGA(A/C)TTGTTAG (G/A/C)C-3´	<i>intI</i>

Referenzen: a: BD Biosciences: Genom Walker Kit, b: Kunze (2002), c: Göbel *et al.* (2004), d: Götz *et al.* (1996) e; Nield *et al.* (2001). Nicht gekennzeichnete Primer-Bezeichnungen: diese Arbeit. Modifikationen der Primer zum Einbau von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (*NdeI*, *BamHI*) sind unterstrichen.

2.3.4 Konstruierte Plasmide

Tab. 2.3.4: Übersicht der konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaft
pKF01	902 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern Kay8 und Kay9 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF05	684 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern Kay4 und Kay5 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>nahK</i>
pKF03	902 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31* mit den Primern Kay8 und Kay9 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF08	350 bp-PCR-Produkt aus <i>EcoRV</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP2A und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF09	350 bp-PCR-Produkt aus <i>EcoRV</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31*, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP2A und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF10	441 bp-PCR-Produkt aus <i>AseI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP2A und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF11	582 bp-PCR-Produkt aus <i>SspI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31*, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP2A und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaft
pKF12	400 bp-PCR-Produkt aus <i>SspI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31*, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP2A und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF13	755 bp-PCR-Produkt aus <i>PvuII</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP2B und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF14	357 bp-PCR-Produkt aus <i>StuI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP2B und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF15	756 bp-PCR-Produkt aus <i>PvuII</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31*, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP2B und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF16	400 bp-PCR-Produkt aus <i>StuI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31*, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP2B und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF18	314 bp-PCR-Produkt aus <i>PvuII</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP2D und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>nahK</i>
pKF21	800 bp-PCR-Produkt aus <i>StuI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP1Aa-2 und AP2, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF25	1020 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern KTbenBC-1 und KTbenBC-2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benBC</i>
pKF27	620 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern benR-1 und benR-2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benR</i>
pKF29	620 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern benR-1 und benR-2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benR</i>
pKF31	1020 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31*, mit den Primern KTbenBC-1 und KTbenBC-2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benBC</i>
pKF32	780 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern aldA-3 und aldA-4 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>aldA</i>

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaft
pKF33	1250 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern Qno36 und Qno37 erhalten, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	Tn5501
pKF35	2000 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern Tn5501A-1 und Tn5501A-2 erhalten, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	Tn5501
pKF36	2000 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern Tn5501M-1 und Tn5501M-2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>tnpR</i>
pKF37	2000 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern Tn5501E-1 und Tn5501E-2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>tnpA</i>
pKF38	395 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern Kay25 und Kay26 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF39	395 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31*, mit den Primern Kay25 und Kay26 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benA</i>
pKF40	357 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern Kay27 und Kay28 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benBC</i>
pKF41	357 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31*, mit den Primern Kay27 und Kay28 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benBC</i>
pKF42	300 bp-PCR-Produkt aus <i>StuI</i> hydrolysierter Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSPAD-2 und AP2, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>aldA</i>
pKF43	1972 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern Kay29 und Kay30 erhalten, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	<i>benRXA</i>
pKF44	1972 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31*, mit den Primern Kay29 und Kay30 erhalten, pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	<i>benRXA</i>
pKF46	487 bp-PCR-Produkt aus <i>EcoRV</i> hydrolysierter Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSPbenRupI-2 und AP2, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	<i>benR</i>

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaft
pKF48	589 bp-PCR-Produkt aus <i>EcoRV</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31*, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSPbenRupI-2 und AP2, in pCR® 4Blunt-TOPO® ligiert.	<i>benR</i>
pKF49	180 bp-PCR-Produkt aus <i>NruI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSPaldAupI-2 und AP2, in pCR® 4Blunt-TOPO® ligiert.	<i>aldA</i>
pKF50	967 bp-PCR-Produkt aus <i>PvuII</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSP4ODup-2 und AP2, in pCR® 4Blunt-TOPO® ligiert.	<i>nahK</i>
pKF51	3100 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> QM1 mit den Primern TEXG-P1A und Tn5501E-2 erhalten, in pCR® 4Blunt-TOPO® ligiert.	unbekannte Sequenz
pKF53	600 bp-PCR-Produkt aus <i>StuI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSPbenRupII-2 und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>benR</i>
pKF54	1000 bp-PCR-Produkt aus <i>AseI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSPaldAupII-2 und AP2 erhalten, in pPCR script Amp SK(+) ligiert.	<i>aldA</i>
pKF55	1072 bp-PCR-Produkt aus <i>EcoRV</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSPnahMupI-2 und AP2 erhalten, in pCR® 4Blunt-TOPO® ligiert.	<i>nahM</i>
pKF56	1500 bp-PCR-Produkt aus <i>StuI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSPbenRupII-2 und AP2 erhalten, in pCR® 4Blunt-TOPO® ligiert.	<i>benR</i>
pKF57	750 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern GSP2D und GSP4OTdo-1 erhalten, in pCR® 4Blunt-TOPO® ligiert.	<i>nahI</i>
pKF58	500 bp-PCR-Produkt aus <i>StuI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSPaldAupII-2 und AP2 erhalten, in pCR® 4Blunt-TOPO® ligiert.	<i>aldA</i>
pKF59	886 bp-PCR-Produkt aus <i>AseI</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, eingesetzt im Genom Walk, mit den Primern GSPbenRupII-2 und AP2 erhalten, in pCR® 4Blunt-TOPO® ligiert.	<i>benR</i>

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaft
pKF60	1500 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31, mit den Primern KayMod-1 und KayMod-2 erhalten. Nach Restriktion mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pJOE2702 ligiert.	<i>nahK</i> und <i>nahJ</i>
pKF61	980 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern KayMod-3 und KayMod-4 erhalten. Nach Restriktion mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pUCPU21 ligiert.	<i>benR</i>
pKF62	980 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31* mit den Primern KayMod-3 und KayMod-4 erhalten. Nach Restriktion mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pUCPU21 ligiert.	<i>benR</i>
pKF63	1500 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern HS286 und HS298 erhalten, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	<i>intI</i>
pKF66	1100 bp-PCR-Produkt aus <i>PvuII</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern GSPaldAIII-2 und AP2 erhalten, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	<i>aldA</i>
pKF69	491 bp-PCR-Produkt aus <i>PvuII</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern GSPnahOup-2 und AP2 erhalten, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	<i>nahO</i>
pKF70	1400 bp PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern nah2.1 und nah2.2 erhalten, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	<i>nahN</i>
pKF71	1600 bp PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern aldAMod-1 und aldAMod-2 erhalten. Nach Restriktion mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pJOE2702 ligiert.	<i>aldA</i>
pKF74	1010 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern nahOmod-1 und nahOmod-2 erhalten. Nach Restriktion mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pJOE2702 ligiert.	<i>nahO</i>
pKF76	307 bp-PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern Kay41 und Kay42a erhalten, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	<i>Tn5501 IR</i>
pKF77	550 bp PCR-Produkt aus Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern Kay39 und Kay40 erhalten, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	<i>nahL</i>
pKF78	300 bp PCR-Produkt aus <i>PvuII</i> hydrolysiertes Gesamt-DNA von <i>P. putida</i> GJ31 mit den Primern AP2 und GSPnahNup2-2 erhalten, in pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] ligiert.	<i>nahI</i>

2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Die zu untersuchende DNA bzw. ihre Fragmente, wurden mit Auftragungspuffer (0.5 g/mL Saccharose; 160 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 mg/mL Bromphenol-Blau; 0,5 mg/mL Xylencyanol) in der entsprechenden Menge gemischt und nach Auftragen in einem 0,5 bis 1,0%igen (w/v) Agarosegel (Agarose NEEO Ultra-Qualität, Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland), das mit (0,1 µg/mL) Ethidiumbromid versetzt war, in horizontaler Richtung aufgetrennt. TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3 – 8,5) diente als Elektrophoresepuffer. Die Größe oder Menge der DNA-Fragmente wurde unter langwelligem UV-Licht (366 nm), durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids im Vergleich zu einem Längenmarker oder Mengenmarker bestimmt.

2.3.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde DNA einer enzymatischen Hydrolyse unterworfen und die Fragmente mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (Material und Methoden 2.3.5) aufgetrennt. Eine Bande, die das gewünschte Fragment enthielt, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA daraus mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit II der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben eluiert.

2.3.7 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pseudomonaden

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus Pseudomonaden erfolgte unter Verwendung des DNeasy Tissue Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben.

2.3.8 Plasmidisolierung aus Pseudomonaden nach Wheatcroft und Williams (1981)

Pseudomonaden aus einer 50 mL Kultur (LB-Komplettmedium oder selektives Mineralmedium) wurden durch Zentrifugation (4.500 U/min, 15 min, 4°C) sedimentiert und in 2 mL Reagenz A (TE-Puffer (50 mM Tris, 50 mM Na₂EDTA), 0,1 mg/mL Xylencyanol, 5% Sigma Antifoam B Emulsion) resuspendiert. Zu 1,6 mL der Zellsuspension wurde 0,4 mL Reagenz B (1 M NaOH, gesättigt bei 20°C mit SDS) gegeben und die Zellen durch fünfminütiges Vortexen aufgeschlossen.

Die so präparierte Suspension wurde auf einen 12,5 mL Saccharose-Gradienten in einem 16,5 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Der Saccharose-Gradienten war durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen einer sterilen 20%igen Saccharose-Lösung erzeugt worden. Durch Zentrifugation (26.000 U/mL, 60 min, 20°C) wurde die plasmidische DNA über den Gradienten von chromosomaler DNA getrennt.

Nach Beendigung der Zentrifugation wurde eine Nadel in den Saccharose-Gradienten gegeben und mittels peristaltischer Pumpe Fraktionen entnommen. Die zu untersuchenden Fraktionen wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (Material und Methoden 2.3.5) auf plasmidische und chromosomale DNA untersucht.

2.3.9 Vereinfachte Plasmidisolierung aus Pseudomonaden

Pseudomonaden aus einer 50 bis 100 mL Übernachtskultur (LB-Komplettmedium) wurden durch Zentrifugation (4.500 U/min, 15 min, 4°C) sedimentiert und unter Verwendung des Nucleobond AX100 Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 10 mM TE-Puffer aufgenommen.

2.3.10 Plasmidisolierung aus *E. coli* Stämmen

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* Stämmen erfolgte mittels QIAprep[®] Spin Miniprep Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben.

2.3.11 Reinigung von DNA

DNA wurde unter Verwendung des QIAquick[®] Gel Extraction Kit II der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.3.12 *In vitro*-Manipulation von DNA

Für die Hydrolyse der DNA in einzelne Fragmente, wurden Restriktionsendonukleasen (Roche, Invitrogen oder NEB) verwendet. Sie wurden nach Herstellerangaben bezüglich ihrer Inkubationsbedingungen und Pufferung eingesetzt. Die Fragmentgröße der DNA wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese bestimmt (Material und Methoden 2.3.5).

T4-DNA Ligase und Klenow-Fragment der DNA Polymerase I zur Entfernung von 3'- oder 5'-Überhängen wurden nach Empfehlung der Hersteller verwendet. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte durch Inkubation bei 65°C.

Zur Generierung von Adenosin-Überhängen an den PCR-Produkten wurde Taq-Polymerase (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.13 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen nach Hanahan (1983)

Diese Methode wurde für die Herstellung transformationskompetenter Zellen von *E. coli* DH5 α verwendet. Alle Schritte mit Ausnahme der Anzucht der Bakterien sind auf Eis oder bei 4 °C ausgeführt worden.

Mit einer über Nacht bei 37 °C in SOB-Medium angezogenen Vorkultur wurden 50 mL SOB-Medium angeimpft ($OD_{578} = 0,03$). Dieser Ansatz wurde bei 37 °C und 180 upm im Rundschtüttler bis zu einer OD_{546} von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis gestellt und anschließend durch Zentrifugation (3500 upm, 4 °C) sedimentiert. Das Sediment wurde in 17 mL eiskaltem FSB-Puffer (10 mM Kaliumacetat, 100 mM Kaliumchlorid, 45 mM Mangan(II)chlorid, 10 mM Calciumchlorid, 3mM Hexa-Ammonium-Cobalt(III) Chlorid, 10% (v/v) Glycerin, pH 6,4) resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (3500 upm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 4 mL eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 140 µL DMSO wurden die Zellen für 5 min aus Eis gekühlt und erneut mit 140 µL DMSO versetzt. Die Zellen wurden in Aliquots von 200 µL aufgeteilt, für 20 h bei -20 °C eingefroren und dann bei -80 °C gelagert.

2.3.14 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen modifiziert nach Hanahan (1983) - Rubidiumchlorid-Methode

Diese Methode wurde für die Herstellung transformationskompetenter Zellen von *E. coli* DH5α verwendet. Alle Schritte mit Ausnahme der Anzucht der Bakterien sind auf Eis oder bei 4 °C ausgeführt worden

Mit einer über Nacht bei 37 °C in SOB-Medium angezogenen Vorkultur wurden 50 mL SOB-Medium angeimpft ($OD_{546} = 0,05$). Dieser Ansatz wurde bei 37 °C und 180 upm im Rundschtüttler bis zu einer OD_{578} von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3500 upm, 4 °C) sedimentiert. Das Sediment wurde in 25 mL eiskaltem TMFI-Puffer (100 mM Calciumchlorid, 50 mM Rubidiumchlorid, 40 mM Mangan(II)chlorid) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (3500 upm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 mL eiskaltem TMFI-Puffer mit sterilem Glycerin (20% v/v) resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots von 200 µL aufgeteilt, für 20 h bei -20 °C eingefroren und dann bei -80 °C gelagert.

2.3.15 Transformation von *Escherichia coli* DH5α


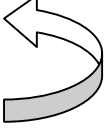
Es wurden ca 100 ng der zu transformierenden DNA zu 200 µL der transformationskompetenten Zellen *E. coli* DH5α gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzschock (90 s bei 42 °C) ausgesetzt, für 2 min auf Eis gekühlt, mit 800 µL SOC-Medium versetzt und zur phänischen Expression der Ampicillin-Resistenz 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden in geeigneter Verdünnung auf selektive Agarplatten ausgestrichen. Bei Verwendung von pUC18-Derivaten, pPCR Script Amp SK(+)

und pCR[®] 4Blunt-TOPO[®] wurden selektive Agarplatten mit X-Gal (40 µg/mL) und IpTG verwendet.



2.3.16 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Durchführung der PCR erfolgte in 25 µL, 50 µL oder 100 µL Reaktionsvolumen mit ca. 1 ng Template-DNA, 0,2-0,5 µM Primer, Advantage[®] DNA-Polymerase (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) sowie entsprechendem MgCl₂-Puffer und einer Nucleotidmischung aus je 200 µM dATP, dTTP, dGTP und dCTP. Durch eine dünne Schicht Mineralöl wurde der Ansatz vor Verdunstung geschützt. In einem automatischen Thermocycler (Personal Cycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) erfolgte die PCR.

Die 3-Schritt Programmierung für den Thermocycler war wie folgt:

94 °C			1 min	
94 °C		5	40 s	Denaturierung
X °C		Zyklen	40 s	Annealing
68 °C			60 s/1 kbp	Elongation
94 °C		30	40 s	Denaturierung
X °C		Zyklen	40 s	Annealing
68 °C			60 s/1 kbp	Elongation
68 °C			10 min	
10 °C			x min	

Die 2-Schritt-Programmierung für den Thermocycler war wie folgt:

94 °C		7	25 s
72 °C		Zyklen	3 min
94 °C		27-37	25 s
68 °C		Zyklen	3 min
68 °C			7-10 min
4 °C			x min

Wurden bei einer PCR ganze Zellen eingesetzt, erfolgte im ersten Schritt eine Erhitzung auf 94 °C für die Dauer von 5-10 min.

2.3.17 PCR gestützte DNA-Sequenzierung (Genom Walk)

Ausgehend von einer bekannten DNA-Sequenz ist es mittels Genom Walk (unter Verwendung des Universal Genom WalkerTM Kits von Clontech) möglich, unbekannte Nucleotidsequenzen stromab- und stromaufwärts einer bekannten Sequenz zu amplifizieren. Hierzu wurde die Gesamt-DNA der Pseudomonaden mit jeweils verschiedenen Restriktionsendonukleasen komplett hydrolysiert.

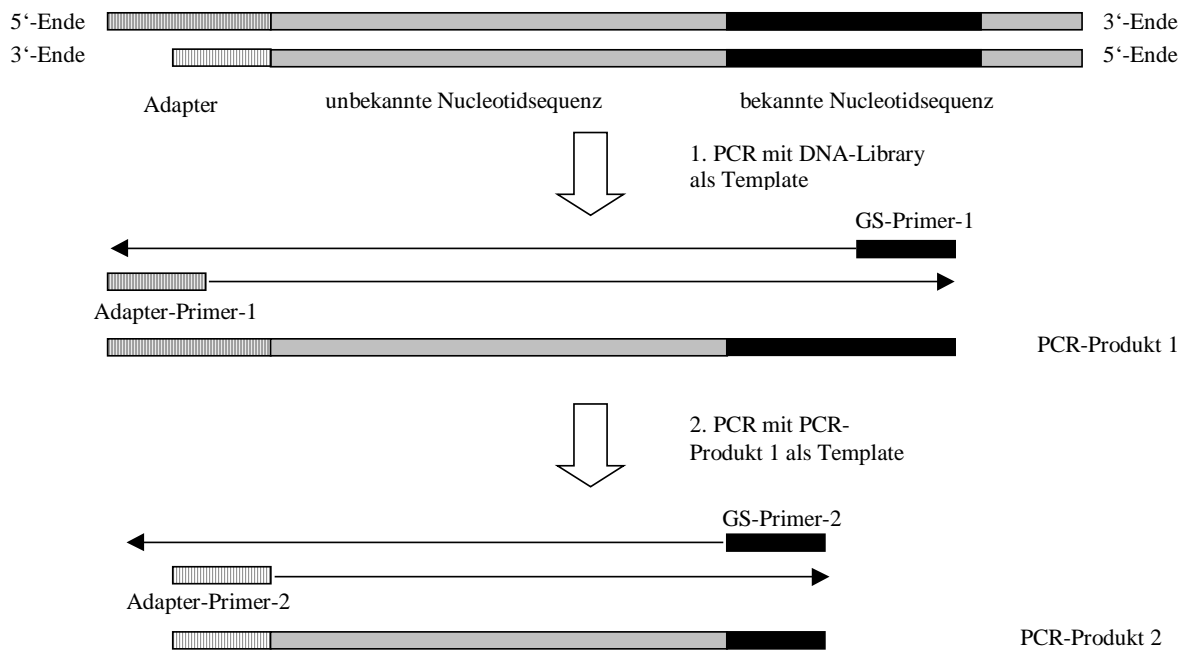


Abb. 2.3.17: Prinzip des Genom Walks, hier stromaufwärts.

Die Enden der DNA-Fragmente wurden mit einem Adaptor ligiert, dessen Sequenz bekannt war. Auf diese Weise wurden die DNA-Bibliotheken als Template für den ersten PCR-Schritt generiert. Durch 2-Schritt-PCR (Material und Methoden 2.3.16) konnte unter Verwendung von adaptorspezifischen und genspezifischen Primern die DNA-Sequenz stromaufwärts bzw. stromabwärts der Ausgangssequenz amplifiziert werden. Die Richtung des Genom Walks war dabei von der Orientierung der genspezifische Primer abhängig. Mit den Produkten aus dieser ersten PCR wurde eine zweite 2-Schritt-PCR durchgeführt. Das Prinzip des Genom Walks ist in Abbildung 2.3.17 dargestellt.

Die resultierenden PCR-Produkte wurden aus Agarosegelen isoliert (Material und Methoden 2.3.6), in einen Vektor ligiert und sequenziert (Material und Methoden 2.3.18).

2.3.18 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Ligation in die Plasmide pCR[®] 4blunt TOPO und pPCR script Amp SK(+) durch die MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) mit einer Genauigkeit von bis zu > 99.995 %.

2.3.19 DNA-Blotting nach Southern (1975)

Um die im Agarosegel enthaltene DNA, die zum Teil einer enzymatischen Hydrolyse unterworfen und durch Elektrophorese aufgetrennt wurde, auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland) zu transferieren, wurde das Gel auf ein mit 20x SSC getränktes 3MM Whatman Papier gelegt. Auf das Gel wurde die Nylonmembran in entsprechender Größe gelegt, mit Whatman Papier abgedeckt, Filterpapier darauf gestapelt und mit einem Gewicht beschwert. Die DNA wurde durch die 20x SSC-Lösung, die von Filterpapier aufgenommen wurde, denaturiert und an die Membran transferiert. Dieser Vorgang dauerte 14-18 h. Es folgte eine Hitzefixierung bei 80°C über 120 min. Alternativ erfolgte der DNA-Blot nach Southern mit Hybond N+ Nylonmembranen und mit 0,4 M NaOH-Lösung zum Denaturieren und Transferieren.

2.3.20 DNA-DNA Hybridisierung mittels Digoxigenin (DIG)

Markierung von DNA mittels Digoxigenin (DIG)

Die DNA-Fragmente aus der PCR wurden mit 4 µL DIG-High Prime Reagenz versetzt und 10 min bei 100 °C gekocht. Zur bestmöglichen Markierung der Sonde wurde die Reaktionslösung über 20 h bei 37°C inkubiert. Der Stop der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 2 µL 0,2 M EDTA, pH 8,0.

Hybridisierungsreaktion mittels DIG-Sonde

Bei einer Hybridisierungstemperatur von 37 - 42 °C wurde die Membran für 2 bis 3 h in DIG-Easy Hyb Lösung geschwenkt, um unspezifische Hybridisierungssignale zu vermeiden. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und mit der Hybridisierungslösung versetzt, der die DIG-markierte Sonde zugesetzt war. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei sondenspezifischer Temperatur (**Tab. 2.3.20**) unter Schwenken. Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran zweimal 5 min. bei Raumtemperatur mit 2 x SSC, 0,5% SDS gewaschen. Dann wurde je nach Bedarf unter stringenteren Bedingungen mit 05 x SSC, 0,1 % SDS für je 15 min unter Schwenken bei 68°C gewaschen.

Tab. 2.3.20: Hybridisierungstemperaturen bei der Reaktion mit DIG-Sonde

Sonde	Größe (bp)	G+C (%)	T _m (°C)	T _{opt} (°C)
DSpKF5	680	62,6	74,6	54,6
DSpKF43	1972	59,0	73,7	53,7
DSpKF32	787	58,1	73,0	53,0

Die Berechnung der Hybridisierungstemperatur erfolgte mit folgender Formel:

$$T_m = 49,82 + 0,41 (\%G+C) - (600/l) \quad [l = \text{Länge der Sonde}]$$

$$T_{opt} = T_m - 20 \text{ °C}$$

Fotografie

Um die Signale der DIG-markierten Hybridisierung zu detektieren, wurde die Membran bei Raumtemperatur unter Schütteln nach Herstellerangaben (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) gewaschen, mit Antikörperlösung und NBT/BCIP-Detektionslösung versetzt und bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Farbreaktion und Immunreaktion lieferten innerhalb von 16 Stunden deutliche Signale, die durch Fotografie dokumentiert wurden.

Waschen von DIG-markierten Membranen

Um eine mit einer DIG-Sonde markierte Membran von der Sonde zu befreien, wurde die Membran in 50-60°C heißem DMF gewaschen. DMF wurde dabei mehrfach gewechselt. Wenn die blaue Farbe komplett entfernt war, wurde die Membran kurz mit sterilem Bidest gewaschen und zweimal je 15 min bei 37 °C in 0,2 N NaOH mit 0,1 % SDS inkubiert. Die Membran wurde kurz in 2x SSC gewaschen und prähybridisiert oder in 2x SSC bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.21 DNA-DNA Hybridisierung mittels radioaktiver Markierung von DNA

Methode nach Feinberg und Vogelstein (1983)

Zur radioaktiven Markierung der Sonden (DNA-Fragmente aus der PCR, siehe **Tab. 2.3.21**) wurden jeweils 10 ng der DNA in OLX-Puffer (250 mM Tris HCL pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 1 mM DTT; je 250 μM dATP, dGTP, dTTP; 13,5 U pd(N)₆ Oligos von Pharmacia, Uppsala,

Schweden) mit 0,02 mg BSA, 50 μCi [α - ^{32}P]-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB) und 2-5 U Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde von nicht eingebauten radioaktiv markierten Nukleotiden befreit und in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt.

Radioaktive Markierung von DNA mittels Ready-To-Go DNA Labelling Beads

Die DNA-Fragmente aus der PCR wurden mit 5 μL Redivue™ stabilised [α - ^{32}P]-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB) mit der spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol nach Herstellerangaben mit dem Ready-To-Go DNA Labelling Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB) isotopenmarkiert.

Tab. 2.3.21: Verwendete Sonden für die Hybridisierung mit radioaktiv markieren Sonden.

Sonde	Größe (bp)	G+C (%)	T (°C)
RSpKF70	1480	67,0	60,0
RSpKF43	1972	53,9	
RSpKF1	892	63,2	
RSpKF71	1521	62,5	
RSpKF35	1962	59,2	

Hybridisierungsreaktion mit ^{32}P -markierter Sonde

Bei einer Hybridisierungstemperatur von 60°C wurde die Membran für 3 h in mehrmals erneuerter Prähybridisierungslösung (0,1 % Blocking reagent; 0,1 % *N*-Laurylsarcosinat; 0,02 % SDS; 10 mM Phosphatpuffer pH 6,8; 6 x SSC) geschwenkt, um unspezifische Hybridisierungssignale zu vermeiden. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung verworfen, durch frische Lösung ersetzt und das Bad mit dem isotopenmarkierten Fragment versetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C unter Schwenken. Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran, erst zweimal bei 60°C mit 6 x SSC mit 0,5% SDS gewaschen und die Membran mit einem Geigerzähler auf die Stärke der spezifischen Bindung überprüft. Dann wurde je nach Bedarf unter stringenteren Bedingungen mit 2 x SSC mit 0,1% SDS und 0,5 x SSC mit 0,1% SDS für je 30 min unter Schwenken bei 60°C gewaschen.

Radiographie

Um die Signale von der isotonenmarkierten Hybridisierung zu detektieren, wurde die Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm-MP, Amersham Buchler, Braunschweig, BRD) in eine Exponierbox gelegt und 8 bis 72 Stunden bei -78°C inkubiert.

Waschen von radioaktiv markierten Membranen

Um eine mit einer radioaktiven Sonde markierte Membran von der Sonde zu befreien, wurde die Membran bei 80°C mit 0,5%iger SDS-Lösung mehrfach gewaschen. Es schloss sich eine zweistündige Prähybridisierung an. Eine so behandelte Membran konnte für eine erneute Hybridisierung eingesetzt werden.

2.3.22 Computergestützte Analyse von Nukleotid- und Proteinsequenzen

Die Entwicklung der Oligo-Nukleotid-Primer erfolgte mit dem Programm Primer-Find v. 3.0 (Fröbel Labor-Geräte, Lindau, Deutschland). DNA- sowie Proteinsequenzanalysen wurden mit dem Programm Prophet 6.0 durchgeführt (AbTech Corporation, Charlottesville, USA, www.prophet.abtech.com). Multiple Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm ClustalX (1.81) nach Higgins *et al.* (1991) durchgeführt. Paarweise Sequenzvergleiche mit den Datenbanken EMBL, GENBANK und SWISSPORT wurden mit dem Programmpaket FASTA3 nach Pearson und Lipman (1988) (www.ebi.ac.uk/fasta3) und BLAST nach Altschul *et al.* (1990) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) erstellt. Inverted Repeats konnten mit dem Programm „Emboss einverted“ von Richard Durbin identifiziert werden (Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA, UK, www.bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/einverted.html).

Zur Ermittlung von putativen Promotorsequenzen wurde die Internetsuchmaschine von Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) genutzt.

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 *P. putida* GJ31 und seine Abkömmlinge: Generierung und Eigenschaften

P. putida GJ31 wächst mit Chlorbenzol, aber nicht mit 3-Chlorbenzoat als Kohlenstoff- und Energiequelle. Derivate wie zum Beispiel *P. putida* GJ31* (siehe Experimente und Ergebnisse 3.1.1), die dagegen mit 3-Chlorbenzoat wachsen, treten auf.

3.1.1 Generierung von *P. putida* GJ31* aus *P. putida* GJ31

P. putida GJ31* wurde durch 3-Chlorbenzoat-Selektion aus *P. putida* GJ31 erhalten (Reineke, pers. Mitteilung). Dieser Vorgang wurde in Flüssigkultur nachvollzogen und die Entwicklung der optischen Dichte OD_{546} über mehrere Tage beobachtet (Zerlin, 2002). Bei allen auf Acetat angezogenen Vergleichskulturen war nach Zugabe von 3-Chlorbenzoat eine Abnahme der optischen Dichte über ca. 7-9 Tage, gefolgt von einer starken Zunahme der Trübung bis zu einem Maximum zu beobachten. Es stellte sich die Frage, ob dafür eine langsame Induktion oder eine Mutation verantwortlich ist.

P. putida GJ31, angezogen auf LB-Medium, wurde auf Mineralmedium überstempelt, dem 3-Chlorbenzoat in einer Konzentration von 3 mM als Energie- und Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde. Über einen Zeitraum von fast zehn Wochen wurde die Zahl der entstehenden Kolonien beobachtet.

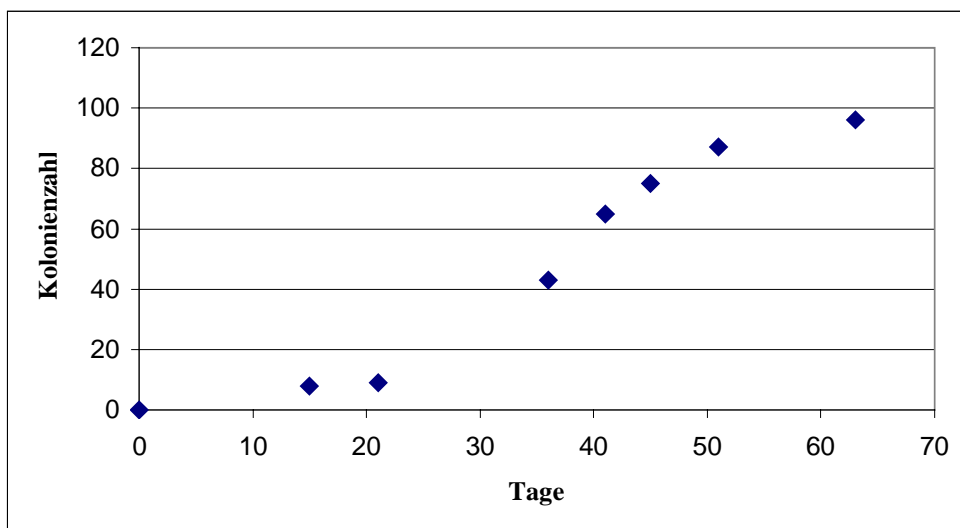


Abb. 3.1.1: Kolonienbildung bei der Generierung von *P. putida* GJ31* durch 3-Chlorbenzoat-Selektion aus *P. putida* GJ31. Eine Übernachtskultur von *P. putida* GJ31 wurde auf ein Mineralmedium mit 3 mM 3-Chlorbenzoat überstempelt und bei 30°C bebrütet.

Nach rund zwei Wochen wurden 8 Klonien beobachtet. Diese wurden durch Überimpfen und Verdünnungsausstriche auf Mineralmedium mit 3-Chlorbenzoat gereinigt, als Stämme *P. putida* GJ31*-1 bis *P. putida* GJ31*-8 bezeichnet und aufbewahrt. Im Verlauf der nächsten Wochen bildeten sich weitere neue Kolonien (siehe **Abb.** 3.1.1). Insgesamt waren es bei Beendigung des Versuches 96 Kolonien. Es wurde deshalb vermutet, dass es sich bei der Generierung von *P. putida* GJ31* um eine Mutation handelt.

3.1.2 Generierung von *P. putida* QM1 aus *P. putida* GJ31

P. putida QM1 wurde von Kunze (2002) nach längerer Anzucht auf Benzoat aus *P. putida* GJ31 erhalten. *P. putida* QM1 verlor die Fähigkeit zum Wachstum auf Chlorbenzol (Kunze, 2002). In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass Stamm QM1 nicht die Fähigkeit zum Wachstum auf Toluol verliert.

3.1.3 Wachstum von *P. putida* GJ31 und seinen Abkömmlingen auf Naphthalin und Biphenyl

P. putida GJ31 und seine Abkömmlinge *P. putida* GJ31* und *P. putida* QM1 wurden auf Mineralmedium angezogen. Naphthalin bzw. Biphenyl wurde als Kohlenstoff und Energiequelle über die Gasphase hinzu gegeben. Es wurde kein Wachstum der untersuchten Stämme beobachtet.

3.1.4 Isolierung der Plasmide pKW1, pKW2 und pZSG1

Die Isolierung des Plasmids pKW1 aus *P. putida* GJ31 gelang mittels Saccharose-Gradienten nach Wheatcroft und Williams (1981). Eine weitere Reinigung über einen Cäsiumchlorid-Gradienten wie von Kunze (2002) beschrieben, erfolgte hier nicht. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die nach dieser Methode (Material und Methoden 2.3.8) gewonnene DNA eine leichte Verunreinigung durch chromosomale DNA aufwies. Es war zudem schwierig, auf Grund der fraktionierten Sammlung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA eine ausreichende Trennung zu erzielen. Einfacher und schneller wurde Plasmid-DNA aus *P. putida* GJ31 unter Verwendung des Macherey-Nagel Nucleobond AX100 Kits erhalten. Es gelang, die Plasmid-DNA ungeschädigt zu erhalten, indem zur Trennung der DNA von ausgefälltem Protein ein Filtrations- statt eines Zentrifugationsschritts verwendet wurde. Nach dieser Methode war keine weitere Reinigung der gewonnen Plasmid-DNA nötig. Die mit dem Macherey-Nagel Nucleobond AX100 Kit gewonnene Plasmid-DNA konnte somit direkt für weitere Experimente und Untersuchungen eingesetzt werden. Außerdem war

die Konzentration an Plasmid-DNA bei dieser Methode höher, die absolute gewonnene Menge dagegen im Vergleich zu der Methode nach Wheatcroft und Williams (1981) geringer. Hier gelang auch die Isolierung der Plasmide pKW2 aus *P. putida* GJ31* und pZSG1 aus *P. putida* QM1 mittels Macherey-Nagel Kit, die Kunze (2002) für die Mutante QM1 nicht gelang.

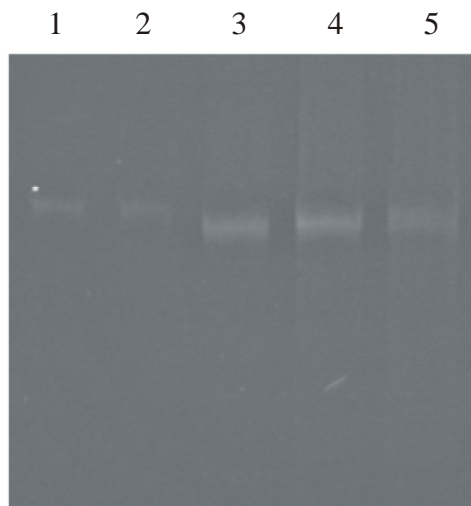


Abb. 3.1.4.1: Bild der Agarosegelelektrophorese der gewonnenen Plasmid-DNA aus *P. putida* GJ31 (pKW1), *P. putida* GJ31* (pKW2) und *P. putida* QM1 (pZSG1) nach der Methode nach Wheatcroft und Williams (1981) und mittels Macherey-Nagel Kit. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über ein 0,7%iges Agarosegel (Material und Methoden 2.3.5).

Die Spurenbelegung war wie folgt:

Es wurden jeweils 10 μ L DNA-Probe pipettiert:

1. pKW1 gewonnen nach Wheatcroft und Williams (1981)
2. pKW1 gewonnen nach Wheatcroft und Williams (1981)

Es wurden jeweils 4 μ L DNA-Probe pipettiert:

3. pKW1 gewonnen mittels Macherey-Nagel Kit
4. pKW2 gewonnen mittels Macherey-Nagel Kit
5. pZSG1 gewonnen mittels Macherey-Nagel Kit

Die Größe der isolierten Plasmide wurde durch Restriktionsverdau im Einzel- und Doppelverdau mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen bestimmt. Für alle drei Plasmide konnte eine Größe um 180 kbp ermittelt werden (siehe Tab. 3.1.4.1).

Die Plasmide pKW2 und pZSG1 sind möglicherweise etwas kleiner als das Plasmid pKW1 aus *P. putida* GJ31.

Tab. 3.1.4.1: Größe der isolierten Plasmide aus *P. putida* GJ31 und seinen Abkömmlingen

Stamm	Plasmid	Größe [kbp]
<i>P. putida</i> GJ31	pKW1	189
<i>P. putida</i> GJ31*	pKW2	180
<i>P. putida</i> QM1	pZSG1	181

Erläuterungen: Für die Größenangabe der Plasmide muss eine Ungenauigkeit von ca. ± 10 kbp angenommen werden. Größenbestimmung der Plasmid erfolgte aus der Hydrolyse der Plasmid-DNA mit folgenden Restriktionsendonukleasen (Anzahl der Schnitte): pKW1: Hydrolyse der DNA mit *DraI* (8), *SspI* (10), *XhoI* (12) und *SspI/XhoI* (13); pKW2: Hydrolyse der DNA mit *DraI* (9), *SspI* (8), *XhoI* (12) und *DraI/SspI* (17); pZSG1: Hydrolyse der DNA mit *DraI* (8), *AseI* (8), *HindIII* (12), *XhoI* (11), und *DraI/AseI* (11), *AseI/SspI* (10).

Die Größenunterschiede liegen im Bereich der Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Plasmidgrößen. Durch die Restriktionsexperimente konnten mehrere Restriktions-

endonukleasen gefunden werden, die in den untersuchten Plasmiden keine Schnittstellen haben (u.a. *SpeI*, *ApoI*, *SapI*; Übersicht siehe Tab. 3.1.4.2).

Tab. 3.1.4.2: Übersicht der Anzahl der Schnitte von einigen Restriktionsendonukleasen in den Plasmiden aus *P. putida* GJ31 und seinen Abkömmlingen.

Restriktions- endonuklease	Anzahl der Schnitte in		
	pKW1	pKW2	pZSG1
<i>DraI</i>	8	9	8
<i>AseI</i>	9	9	8
<i>SspI</i>	10	8	(4)
<i>PstI</i>	16	11	9
<i>EcoRI</i>	11	16	12
<i>HindIII</i>	8	11	12
<i>XhoI</i>	12	12	11
<i>MluI</i>	8	10	9

Erläuterungen: Berücksichtigt sind nur die auf den Agarosegelen sichtbaren Fragmente. Dadurch werden natürlich kleine Fragmente (> 3-4 kbp) nur unzureichend berücksichtigt. Folgende Restriktionsendonukleasen schneiden pKW1 nicht und wurden deshalb auch nicht mit Plasmid-DNA von pKW2 und pZSG1 getestet: *KpnI*, *NaeI*, *NheI*, *SapI*, *ApoI*, *PmeI*, *SpeI*, *NotI*, *PacI*. Eine Zahl in Klammern bedeutet, dass die Restriktionsanalyse auf Grund von Schwierigkeiten bei der Auswertung unvollständig war.

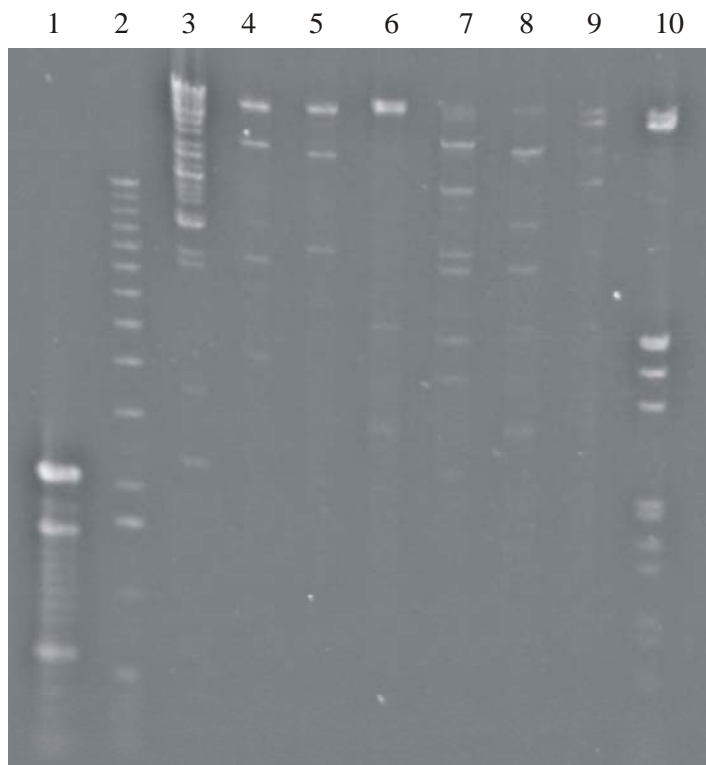


Abb. 3.1.4.2: Restriktionsanalyse von pKW1. Die Hydrolyse erfolgte jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *DraI*, *AseI*, *SspI* und *PstI* in Kombination miteinander. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über ein 0,7%iges Agarosegel (Material und Methoden 2.3.5).

Die Spurenbelegung war wie folgt:

1. 100 bp Größenmarker (Invitrogen)
2. 1 kbp Größenmarker (Invitrogen)
3. 48 kbp Größenmarker (Invitrogen)
4. pKW1 hydrolysiert mit *DraI* und *AseI*
5. pKW1 hydrolysiert mit *DraI* und *SspI*
6. pKW1 hydrolysiert mit *DraI* und *PstI*
7. pKW1 hydrolysiert mit *AseI* und *SspI*
8. pKW1 hydrolysiert mit *AseI* und *PstI*
9. pKW1 hydrolysiert mit *SspI* und *PstI*
10. λ -DNA hydrolysiert mit *HindIII* und *EcoRV*

3.1.5 Prüfung der Inkompatibilitätsgruppe von pKW1 nach Götz *et al.* (1996)

Unterschiedliche Inkompatibilitätsgruppen bedeuten verschiedene genetisch kodierte Plasmid-Replikationsmechanismen. Zwei Plasmide mit gleicher Inkompatibilitätsgruppe können nicht in einem Bakterium nebeneinander existieren, weil der Replikationsorigin gleich ist (Austin und Nordström, 1990; Gordon und Wright, 2000; Draper und Dröger, 2002). Kreuzungen von *P. putida* GJ31 mit *P. putida* PaW1 oder Derivaten wie Stamm PaW258 (XO-, C230-) und Selektion auf neuen Substraten wie 3-Chlor- und 4-Chlorbenzoat sowie 3-Chlor- und 4-Chlortoluol gelangen. Auf diese Weise neu generierte Stämmen, wie zum Beispiel *P. putida* WR301, verfügen möglicherweise über beide Plasmide nebeneinander (Reineke, pers. Mitteilung; Kunze, 2002; Zerlin, 2002) oder sind Cointegrate.

Nach der Methode von Götz *et al.* 1996 wurde mittels PCR das Plasmid pKW1 auf Zugehörigkeit zu Inkompatibilitätsgruppen getestet. Es konnte keine der Gruppen IncN/P/Q/W positiv nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde das TOL-Plasmid pWW0 auf seine bekannte Inkompatibilitätsgruppe IncP hin getestet. Der Nachweis war erfolgreich. Daraus läßt sich unter der oben genannten Voraussetzung folgern, dass pKW1 nicht die selbe Inkompatibilitätsgruppe wie pWW0, also IncP, haben kann.

Tab. 3.1.5: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse zur Feststellung der Inkompatibilitätsgruppe von pKW1 nach Götz *et al.* (1996).

Inc-Gruppe	Primer	Annealing °C	Größe bp	pKW1	pWW0
IncN	IncN rep1/2	55	164	-	nb
	IncN kikA1/2	55	329	-	nb
	IncN oriT1/2	49	349	-	nb
IncP	IncP oriT1/2	57	110	-	+
	IncP trfA11/2	57	889	-	-
	IncP trfA21/2	57	241	-	+
	IncP korA1/2	52	294	-	+
	IncP traG1/2	63	762	-	-
IncQ	IncQ repB1/2	62	1160	-	-
	IncQ oriV 1/2	57	436	-	nb
	IncQ oriT 1/2	57	191	-	nb
IncW	IncW oriV1/2	58	1140	-	nb
	IncW oriT1/2	51	317	-	nb
	IncW trwAB1/2	57	141	-	nb

Erläuterungen: Inc-Gruppe: Inkompatibilitätsgruppe, nb: nicht bestimmt, +: erwartetes PCR-Produkt, -: Produkt hatte die falsche Größe bzw. kein PCR-Produkt erkennbar. Die PCRs erfolgten unter Standardbedingungen wie unter Material und Methoden 2.3.16 beschrieben.

3.2 Der *nahINLOMKJX*-Cluster aus *P. putida* GJ31

3.2.1 Klonierungsstrategie zur vollständigen Sequenzierung

Ziel der Untersuchungen war, die Gene zu finden, die für Enzyme mit 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und -Tautomerase Aktivität kodieren. Diese Enzymaktivitäten waren vorher in *P. putida* GJ31 festgestellt worden (Mars *et al.*, 1997; Kranz, 2001).

Nach Sequenzvergleichen von 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen, die aus Datenbanken hinzugezogen wurden, konnten zwei Primerpaare (Kay1, Kay3 mit Kay2) auf Grundlage der Nukleotidsequenz von *P. putida* UCC22 (NCBI Acc. No. D85415) und ein Primerpaar (Kay4 und Kay5) auf Grundlage der Nukleotidsequenz aus *P. putida* PaW1 (NCBI Acc. No. NC_003350) generiert werden. In einer PCR wurden diese mit Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31 eingesetzt (Material und Methoden 2.3.16). So wurde mit den Primer Kay1, Kay2 und Kay3 keine Produkte mit den errechneten Größen (610 bp bzw 418 bp) erhalten. Die PCR mit den Primern Kay4 und Kay5 lieferte dagegen das gewünschte PCR-Produkt in einer Größe von 684 bp. Dieses PCR-Produkt wurde blunt-end in den Vektor pPCR script Amp SK(+) ligiert (pKF5) und sequenziert. Von der 684 bp großen Sequenz ausgehend, wurden Genom Walk Schritte stromabwärts und stromaufwärts mit genspezifischen Primern und DNA-Bibliotheken von *P. putida* GJ31 begonnen (siehe **Tab.** 3.2.1).

Tab. 3.2.1: Übersicht der Vektoren zur vollständigen Sequenzierung der mittels Genom Walk erhaltenen PCR-Produkte.

Vektor		Primer 1. PCR	Primer 2. PCR	Gen-Bibliothek aus Gesamt DNA von <i>P. putida</i> GJ31
Bezeichnung	Insert [bp]	mit AP1	mit AP2	hydrolysiert mit
pKF18	314	GSP1D	GSP2D	<i>PvuII</i>
pKF50	967	GSP4ODup-1	GSP4ODup-2	<i>PvuII</i>
pKF55	1072	GSPnahMupI-1	GSPnahMupI-2	<i>EcoRV</i>
pKF69	491	GSPnahOup-1	GSPnahOup-2	<i>PvuII</i>
pKF78	300	GSPnahNup2-1	GSPnahNup2-2	<i>PvuII</i>

Vektoren: pPCR script Amp SK(+), *SrfI* geschnitten, mit dem jeweiligen Insert ligiert.

Die größte Übereinstimmung der sequenzierten Teilstücke des Genclusters aus *P. putida* GJ31 um *nahK* herum war mit der Nukleotidsequenz eines rund 15 kbp großen Genclusters aus *P. stutzeri* AN10 festzustellen. Auf Grundlage dieser Sequenz wurden mehrere Primer generiert, um einen weiteren Bereich stromaufwärts von *nahM* zu amplifizieren und zu

sequenzieren. Die PCR mit den Primern nah2.1 und nah2.2 erbrachte mit Gesamt DNA aus *P. putida* GJ31 ein 1400 bp großes Produkt, das die Nukleotidsequenz der Gene *nahN* komplett und von *nahI* und *nahL* in Teilen enthielt. Weitere Bereiche des *nah*-Clusters sollten zusätzlich mittels PCR und den Primerpaaren nah3.1 und nah3.2 (*nahHIN*) bzw. nah4.1 und nah4.2 (*nahTH*) amplifiziert werden. Für *P. putida* GJ31 konnte allerdings keine Produkt erhalten werden. Die Primerpaare lieferten dagegen mit Gesamt-DNA aus *P. stutzeri* AN10 die gewünschten PCR-Produkte der errechneten Größe (jeweils 1400 bp).

Um den Lückenschluss zwischen den Bereichen um *nahN* und *nahOMK* zu vollziehen, wurden die Primer Kay39 und Kay40 auf Grundlage der Nukleotidsequenz aus *P. putida* GJ31 generiert und in eine PCR mit Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31 eingesetzt. Es wurde ein 550 bp großes Produkt erhalten, dessen Sequenz die fehlenden Sequenzbereiche von *nahL* enthielt.

Die Sequenz stromabwärts von *nahK* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer GSP2D und GSP4OTdo-1 erhalten. So konnte die Lücke in der Nukleotidsequenz zwischen *nahK* und *nahX* geschlossen und das Gen *nahJ* amplifiziert und sequenziert werden.

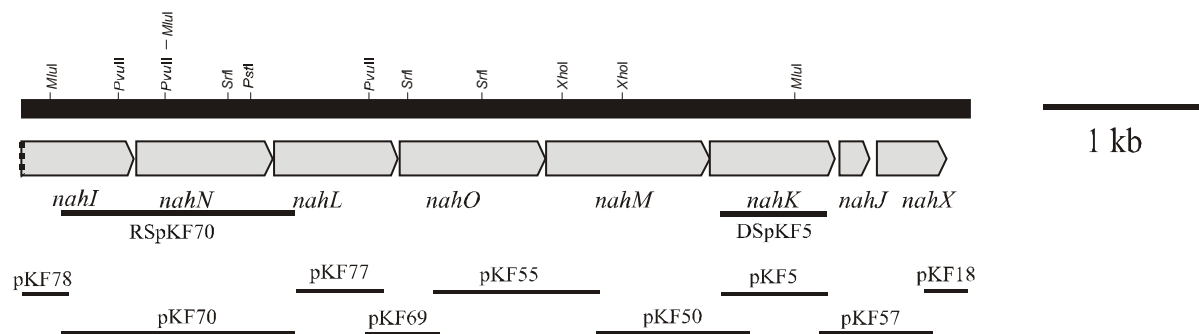


Abb. 3.2.1.1: Organisation des *nahINLOMKJX*-Cluster aus *P. putida* GJ31. Gezeigt ist die zur Sequenzierung verwendete Klonierungsstrategie, sowie wichtige Restriktionsschnittstellen. Die dicken schwarzen Balken kennzeichnen die zur Lagefestellung verwendeten radioaktiv- (RSpKF70) bzw. DIG-markierten Sonden (DSpKF5). Die gesamte Darstellung ist maßstabsgetreu. Genbezeichnungen und die zugehörigen Enzymbezeichnungen: *nahI*: 2-Hydroxy-muconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, *nahN*: 2-Hydroxy-muconsäuresemialdehyd-Hydrolase, *nahL*: 2-Oxopent-4-enoat-Hydratase, *nahO*: Acetaldehyd-Dehydrogenase, *nahM*: 2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase, *nahK*: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, *nahJ*: 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, *nahX*: unbekanntes Gen.

Weiterhin wurde versucht, die Sequenzierung des Genclusters stromaufwärts von *nahI* fortzusetzen. Dies gelang trotz PCR-Versuchen mittels Genom Walk (genspezifischer Primer GSPnahIup-1/2 sowie GSPnahIup2-1/2) nicht. Auch die PCRs mit den Primerpaaren Kay43/Kay44 (*nahHN*) sowie Kay47/Kay48 (*nahI*) brachten keine Produkte. Die PCRs mit der Kombination der Primer Kay49, Kay50.1, Kay50.2 mit GSPnahMup-2 (*nahI*), generiert auf Grundlage der Nukleotidsequenzen aus *P. stutzeri* AN10, gelang nicht. Das Primerpaar

Kay43/Kay44 erbrachte, eingesetzt in eine PCR zur Positivkontrolle mit Gesamt-DNA aus *P. stutzeri* AN10, das gewünschte Ergebnis. Alle anderen Primerkombinationen lieferten auch in der Positivkontrolle mit DNA aus *P. stutzeri* AN10 nicht das gewünschte Produkt. Es ist anzunehmen, dass der hohe GC-Gehalt in diesem Sequenzbereich (rund 67% GC-Anteil) die Generierung der Primer und die Amplifikation der PCR-Produkte erschwerte.

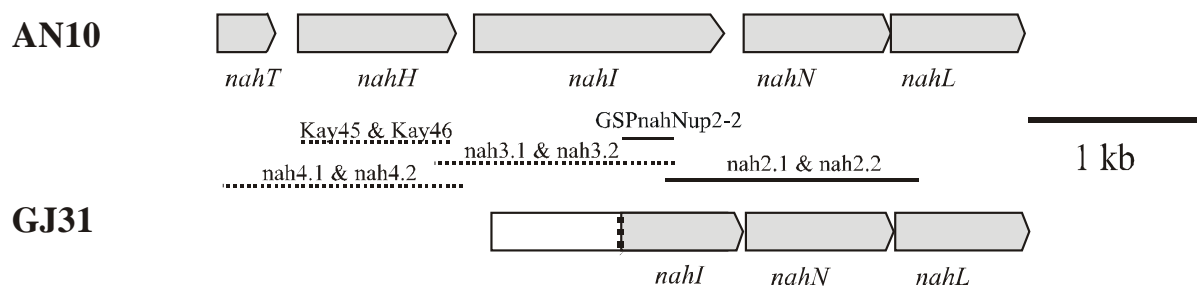


Abb. 3.2.1.2: PCR-Experimente zur Feststellung der Vollständigkeit des *nah*-Clusters in *P. putida* GJ31 im Vergleich zu *P. stutzeri* AN10. Gezeigt ist ein Ausschnitt der jeweiligen Cluster im untersuchten Bereich. PCR-Produkte, die mit Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31 und *P. stutzeri* AN10 zu finden waren, sind als schwarze Balken gezeichnet. PCR-Produkte, die mit Gesamt-DNA aus *P. stutzeri* AN10, aber nicht mit Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31 erhalten wurden, sind als gepunktete Linien dargestellt. Die in den PCRs verwendeten Primer sind angegeben. Im Fall von GSPnahNup2-2 handelt es sich um einen Genom Walk Schritt (siehe Material und Methoden 2.3.17, sowie **Tab.** 3.2.1). Die Genbezeichnungen und die zugehörigen Enzymbezeichnungen sind analog zu **Abb.** 3.2.1.1.

Außerdem wurde mit den Primern Kay45 und Kay46 gezielt nach dem Gen *nahH* gesucht, das für eine Catechol-2,3-Dioxygenase kodiert. Die Primer wurden auf Grundlage der Nukleotidsequenz von *nahH* aus *P. stutzeri* AN10 generiert. Mittels PCR konnte das gewünschte Produkt mit der Größe von 868 bp in *P. putida* GJ31 nicht nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle mit Gesamt-DNA aus *P. stutzeri* AN10 erbrachte dagegen das Produkt mit der errechneten Größe. Das Gen *nahH* ist somit in *P. putida* GJ31 nicht nachweisbar gewesen (siehe **Abb.** 3.2.1.3).

Insgesamt konnte mit dem *nahINLOMKJX*-Cluster in *P. putida* GJ31 ein Sequenzbereich von 5,9 kbp erhalten werden.

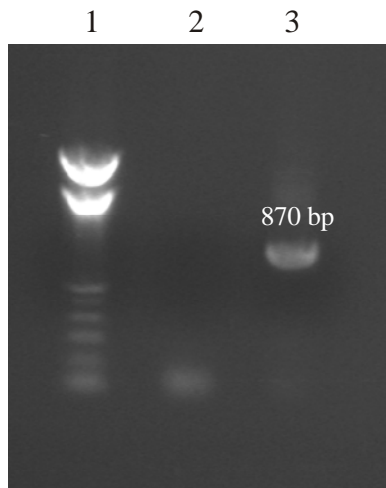


Abb. 3.2.1.3: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von *nahH*, als PCR-Produkt der Amplifikation von DNA aus *P. putida* GJ31 und *P. stutzeri* AN10 mit den Primern Kay45 und Kay46. *nahH* ist das Gen der Catechol-2,3-Dioxygenase aus *P. stutzeri* AN10.

Die Spurenbelegung war wie folgt:

1. 100 bp Größenmarker (Invitrogen)
2. PCR-Ergebnis mit Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31
3. PCR-Produkt (870 bp) mit Gesamt-DNA aus *P. stutzeri* AN10

Agarosegelelektrophorese und PCR erfolgten unter Standard-Bedingungen (siehe Material und Methoden 2.3.5 und 2.3.16).

Die Ergebnisse der PCR-Experimente legen nahe, dass der *nah*-Gencluster in *P. putida* GJ31 im Vergleich zu dem Cluster aus *P. stutzeri* AN10 nicht vollständig ist und stromaufwärts von *nahI* endet.

3.2.2 Lage auf pKW1

Um die Lage des *nahINLOMKJX*-Cluster zu klären, insbesondere, ob der Cluster auf dem Plasmid pKW1 liegt, wurden Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Die Restriktionsschnittstellen, die aus der computergestützten Restriktionsanalyse der Sequenzierungen erhalten wurden, lassen bei Hybridisierungsexperimenten mit der radioaktiv markierten Sonde RSpKF70 ein 4 kbp großes *MluI*-Fragment erwarten. Dieses konnte im Autoradiogramm der Hybridisierung von Plasmid-DNA (siehe **Abb. 3.2.2**) nachgewiesen werden und wurde bei der Hybridisierung mit der DIG-markierten Sonde DSpKF5 bestätigt.

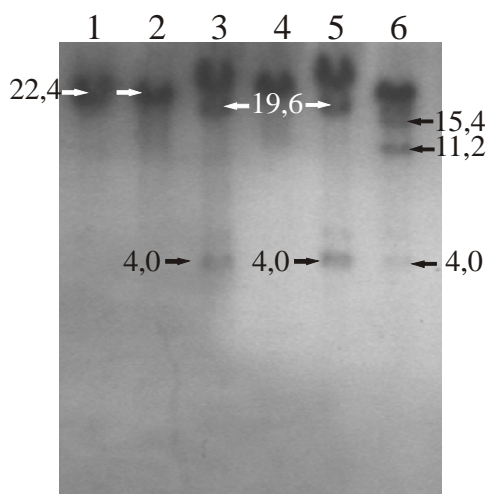


Abb. 3.2.2: Autoradiogramm der Hybridisierung hydrolysiertes Plasmid-DNA von pKW1 aus *P. putida* GJ31. Die Hydrolyse erfolgte jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *DraI*, *AseI* und *MluI* sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander. Als homologe radioaktiv markierte Sonde RSpKF70 diente das PCR-Fragment (Primer nah2.1 und nah2.2), welches für einen Teil des *nah*-Clusters kodiert (*nahINL*). Die ungefähre Größe der hybridisierten Fragmente ist jeweils auf gleicher Höhe in [kbp] angegeben. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über ein 0,7%iges Agarosegel.

Die Spurenbelegung war wie folgt:

1. pKW1, hydrolysiert mit *DraI*
2. pKW1, hydrolysiert mit *AseI*
3. pKW1, hydrolysiert mit *MluI*
4. pKW1, hydrolysiert mit *DraI* und *AseI*
5. pKW1, hydrolysiert mit *DraI* und *MluI*
6. pKW1, hydrolysiert mit *AseI* und *MluI*

Der *nah*-Cluster liegt also in *P. putida* GJ31 auf einem 22,4 kbp großen *Dra*I bzw. *Ase*I Fragment von pKW1. Es ist davon auszugehen, dass der Cluster somit außerhalb des bisher zugeordneten 100 kbp (Kunze, 2002) des Plasmids pKW1 liegt.

3.2.3 Analyse nichtkodierender Bereiche

Es konnte mit Hilfe des Programms Neural Network Promotor Prediction (Ohler, 1999) kein *E. coli*-ähnlicher σ^{70} -Faktor abhängiger Promotor im bisher sequenzierten *nah*-Cluster von *P. putida* GJ31 ermittelt werden. Die Promotorregion liegt vermutlich stromaufwärts von *nahI*.

Ribosomenbindestellen

Die potentiellen Ribosomenbindestellen konnten in dem für *Pseudomonas putida* typischen Abstand zum Startcodon der jeweiligen offenen Leserahmen ermittelt werden (**Tab. 3.2.4**)

Tab. 3.2.3: Die postulierten Ribosomenbindestellen stromaufwärts der offenen Leserahmen im *nah*-Cluster bei *P. putida* GJ31.

Leserahmen	Sequenz der Ribosomenbindestelle
<i>nahN</i>	AACATCTGCGTGAAGCTCTG AGGA CCAGACCATG
<i>nahL</i>	GGCGGACCGTGCGGCTCA AGAGGA AACACAGCCATG
<i>nahO</i>	GCGTGCGCTTCATCTG ATCGAGGA CAGCCTGATG
<i>nahM</i>	GTGAAGCGGCACTGACCTG AGGAG TAGCACCATG
<i>nahK</i>	CGGGCCCGCCAGAACCAG AGGTC AGCGCATG
<i>nahJ</i>	CACGGGCGGCCTCTTCTTC AGGAG ACACACCATG
<i>nahX</i>	GAGCTGCCTCCTCCTGC ACAG AGTCCGGCACATG
16S-rRNA	3´-UCUU UCCUCC 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

3.2.4 Analyse kodierender Bereiche

3.2.4.1 Das Genprodukt NahI

Der unvollständige offene Leserahmen *nahI* (GC-Gehalt 66,9%) kodiert für insgesamt 236 Aminosäuren. Nach Sequenzvergleichen konnte eine Identität von 93% mit der Aminosäuresequenz von NahI, der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase aus *P. stutzeri* OM1, festgestellt werden. NahI aus *P. stutzeri* OM1 (NCBI Acc.No. BAA31265.1) ist ein 486 Aminosäuren großes Protein.

NahI aus *P. putida* GJ31 weist eine große Identität von über 90% mit anderen 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenasen (E.C.-Nummer 1.2.1.32) auf. Außerdem sind zusätzlich geringere Identitäten von rund 70% zu Aldehyd-Dehydrogenasen zu beobachten (nicht in **Tab. 3.2.4.1** gezeigt). So weist dieser Teil der Aminosäuresequenz von NahI aus *P. putida* GJ31 eine Ähnlichkeit von 71% zu der NAD-abhängigen Aldehyd-Dehydrogenase aus *Ralstonia metallidurans* CH34 auf.

Um die Funktion und Aktivität von NahI aus *P. putida* GJ31 als 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenasen zu testen, müsste das gesamte Gen *nahI* sequenziert, amplifiziert, exprimiert und in Enzymtests untersucht werden.

Tab. 3.2.4.1: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit der bekannten Teilsequenz von NahI aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit NahI in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. stutzeri</i> OM1	BAA31265.1	93	94
<i>P. stutzeri</i> AN10	AAD02149.1	92	93
<i>P. putida</i>	AAQ89676.1	92	93
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AAO19116.1	91	92
<i>Pseudomonas</i> sp. ST41	AAT09777.1	90	92
<i>P. putida</i> PaW1	CAC86805.1	90	91
<i>Azotobacter vinelandii</i>	ZP_00092917.1	88	91
<i>Pseudomonas</i> sp. ND6	NP_943119.1	86	91
<i>P. putida</i> PaW630	AAL83661.1	87	89
<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	CAA36992.1	82	88
<i>Acinetobacter</i> sp. YAA	BAA23556.1	79	85

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren an. Das Ergebnis zeigt den Vergleich der bekannten 236 Aminosäuren von NahI aus *P. putida* GJ31 zu den bekannten Proteinen aus Datenbanken.

3.2.4.2 Das Genprodukt NahN

Der offene Leserahmen *nahN* (GC-Gehalt 67,4%) kodiert für 288 Aminosäuren. Nach Sequenzvergleichen konnte eine Ähnlichkeit von 96% mit NahN, der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase aus *P. stutzeri* AN10, festgestellt werden. Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz hat NahN aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 31,9 kDa.

Das Enzym NahN, eine 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase (E.C.-Nummer 3.7.1.9), gehört zu der Familie von Proteinen, der auch Thioesterasen (pfam00975) angehören

und besitzt eine enzymspezifische Domäne. Thioesterasen haben molekulare Massen um 25-29 kDa (Schneider und Marahiel, 1998). Dies ist vergleichbar mit der Größe von NahN aus *P. putida* GJ31.

Um die Funktion und Aktivität von NahN aus *P. putida* GJ31 genau zu bestimmen, müsste *nahN* amplifiziert, exprimiert und in Enzymtests eingesetzt werden.

Tab. 3.2.4.2: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit NahN aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit NahN in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. stutzeri</i> AN10	AAD02150.1	96	98
<i>Pseudomonas</i> sp. ST41	AAT09778.1	87	92
<i>P. putida</i>	NP_542864.1	88	91
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AAO19117.1	87	90
<i>P. putida</i> PaW630	AAL83662.1	83	90
<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	CAA36993.1	80	88
<i>Pseudomonas</i> sp. ND6	NP_943118.1	79	87
<i>P. putida</i> UCC22	BAB62053.1	69	82
<i>Acinetobacter</i> sp. YAA	BAA23557.1	67	81

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

3.2.4.3 Das Genprodukt NahL

Der offene Leserahmen *nahL* (GC-Gehalt 65,4%) kodiert für 261 Aminosäuren und besitzt über die ganze Aminosäuresequenz eine Ähnlichkeit von jeweils 91% zur 2-Oxopent-4-enoat-Hydratase NahL aus *Pseudomonas* sp. S-47 und NahL aus *P. stutzeri* AN10. Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz hat NahL aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 27,90 kDa.

Die Familie der Hydratasen/Decarboxylasen beinhaltet verschiedene Hydratasen, darunter auch die 2-Oxopent-4-enoat-Hydratasen (E.C.-Nummer 4.2.1.80) und 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen, die in den bakteriellen *meta*-Wegen zum Abbau von aromatischen Verbindungen involviert sind. Die 2-Hydroxypentadiensäure-Hydratase MhpD aus *E. coli* ist am Phenylpropansäure-Abbauweg beteiligt und katalysiert die Umwandlung von 2-Hydroxypentadienoat zu 4-Hydroxy-2-ketopentanoat und benutzt einen Mn^{2+} -Cofaktor. Die Hydratase HpcG aus *E. coli* ist Bestandteil des Homoprotocatechuat Katabolismus. XylII aus *P. putida* ist eine 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase.

Um die Funktion und Aktivität von NahL aus *P. putida* GJ31 genau zu bestimmen, müsste *nahL* amplifiziert, exprimiert und in Enzymtests eingesetzt werden.

Tab. 3.2.4.3: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit NahL aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit NahL in [%]	
		Identische	Homologe
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AAO19118.1	91	93
<i>P. stutzeri</i> AN10	AAD002151.1	91	93
<i>P. putida</i>	AAQ89677.1	90	92
<i>P. putida</i> PaW630	AAL83683.1	90	92
<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	CAA43225.1	83	89
<i>Pseudomonas</i> sp. ND6	NP_943117.1	82	90
<i>Pseudomonas</i> sp. ST41	AAT09779.1	81	89

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

3.2.4.4 Das Genprodukt NahO

Der offene Leserahmen *nahO* (GC-Gehalt 65,4%) kodiert für 308 Aminosäuren und besitzt über die ganze Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung von jeweils 98% zur Acetaldehyd-Dehydrogenase NahO aus *Pseudomonas* sp. S-47 und NahO aus *P. stutzeri* AN10. Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz hat NahO aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 33,02 kDa.

Tab. 3.2.4.4.1: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit NahO aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit NahO in [%]	
		Identische	Homologe
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AF320981	98	99
<i>P. stutzeri</i> AN10	AF039534	98	99
<i>P. putida</i>	AY294313	98	99
<i>P. putida</i> NCIB9816-4	AF491307	94	97
<i>P. fluorescens</i> LP6a	AF525494	94	97
<i>P. putida</i> NCIB9816	PPU13232	94	97
<i>Pseudomonas</i> sp. ND6	AY208917	94	97
<i>P. putida</i> O2C2	AAC3858.1	93	96
<i>Comamonas</i> sp. JS765	AF1901463	78	88

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

Acetaldehyd-Dehydrogenasen (E.C.-Nummer 1.2.1.3) katalysieren die Bildung von Acetyl-CoA aus Acetaldehyd. Sie wurden in vielen Abbauwegen gefunden, unter anderem auch im 3-Hydroxyphenylpropionat-Abbauweg.

Welches Substratspektrum NahO aus *P. putida* GJ31 aufweist, sollte an Hand von Enzymtests ermittelt werden. Zur Überprüfung der Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase wurde *nahO* mittels PCR (Material und Methoden 2.3.16) unter Verwendung der Primer nahOMod-1 und nahOMod-2 mit modifizierten NdeI und BamHI-Schnittstellen amplifiziert. Das Produkt wurde zur Expression in pJOE2702 ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Es wurden Enzymtests nach Shingler *et al.* (1992) mit dem Rohextrakt des so erhaltenen Expressionsstammes *E. coli* DH5 α KF74 und den Substraten Acetaldehyd und Chloracetaldehyd durchgeführt (Material und Methoden 2.2.13). Außerdem wurde die CoA-Abhängigkeit der Reaktion im Enzymtest untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2.4.4.2 zusammengefasst. Als Negativkontrolle diente *E. coli* DH5 α .

Tab. 3.2.4.4.2: Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase im Rohextrakt von *E. coli* DH5 α KF74.

Substrat	Aktivität in U/g Protein	
	Test mit CoA	Test ohne CoA
Acetaldehyd	6-11	< 1
Chloracetaldehyd	< 1	< 1

Erläuterungen: Der Enzymtest erfolgte wie unter Material und Methoden 2.2.13 beschrieben. *E. coli* DH5 α KF74 ist der Expressionsstamm für NahO aus *P. putida* GJ31.

Mit dem Rohextrakt aus der Negativkontrolle *E. coli* DH5 α konnte unter keiner der getesteten Bedingungen (CoA-Zugabe bzw. ohne CoA-Zugabe) Aktivität für eine (Chlor)-Acetaldehyd-Dehydrogenase festgestellt werden.

Somit bestätigen die Enzymtests die Einordnung von NahO aus *P. putida* GJ31 als eine CoA- und NADH-abhängige Acetaldehyd-Dehydrogenase.

3.2.4.5 Das Genprodukt NahM

Der offene Leserahmen *nahM* (GC-Gehalt 65,3%) kodiert für 347 Aminosäuren. Nach Sequenzvergleichen konnte eine vollständige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von NahM aus *P. putida* GJ31 mit NahM, der 2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase aus *P. stutzeri* AN10, festgestellt werden. Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten

Aminosäuresequenz hat NahM aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 37,27 kDa.

Die 2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase NahM aus *P. putida* GJ31 gehört zu einer Proteinfamilie, die verschiedene Gruppen von Enzymen beinhaltet. NahM hat Aminosäuresequenzmotive (pfam00682), die in Aldolasen und Pyruvat-Carboxylasen ebenfalls enthalten sind. 2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolasen werden auch als 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolasen (E.C.-Nummer 4.1.3) bezeichnet.

Um die Funktion und Aktivität von NahM aus *P. putida* GJ31 genau zu bestimmen, müsste *nahM* amplifiziert, exprimiert und in Enzymtests eingesetzt werden.

Tab. 3.2.4.5: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit NahM aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit NahM in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. stutzeri</i> AN10	AAD02153	100	100
<i>P. putida</i>	AAQ89680.1	99	100
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AAD19120.1	99	100
<i>P. putida</i> NCBI 9816-4	NP_863098.1	95	98
<i>Pseudomonas</i> sp. ST41	AAT09781.1	94	97
<i>Acinetobacter</i> sp. YAA	BAA23560.1	82	91
<i>P. putida</i> RE204	AAC03444.1	76	89
<i>P. fluorescens</i> IP01	BAA09694.1	75	89
<i>Comamonas testosteroni</i> TA441	BAC67696.1	76	88

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

3.2.4.6 Das Genprodukt NahK

Der offene Leserahmen *nahK* (GC-Gehalt 62,5%) kodiert für 264 Aminosäuren und besitzt eine Ähnlichkeit von 97% zur 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase NahK aus *P. stutzeri* AN10. Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz, hat NahK aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 28,56 kDa.

Ebenso wie NahL aus *P. putida* GJ31 gehört NahK ebenfalls zur Familie der Hydratasen und Decarboxylasen (NahK: E.C.-Nummer 4.1.1.77), die im bakteriellen *meta*-Weg zum Abbau von aromatischen Verbindungen involviert sind.

Zur Überprüfung der Aktivität der putativen 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase wurde *nahK* mittels PCR (Material und Methoden 2.3.16) unter Verwendung der Primer KayMod1 und KayMod2 mit modifizierten *Nde*I und *Bam*HI-Schnittstellen amplifiziert. Das Produkt wurde

zur Expression in pJOE2702 ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Es wurden Enzymtests mit dem Rohextrakt des so erhaltenen Expressionsstammes *E. coli* DH5 α KF60 durchgeführt und eine schwache Aktivität für die Decarboxylase von 11,4 U/g Protein nach Sala-Trepat und Evans (1971) festgestellt (Material und Methoden 2.2.9). Dagegen konnte mit der Negativkontrolle (*E. coli* DH5 α^-) keine Aktivität nachgewiesen werden.

Tab. 3.2.4.6: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit NahK aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit NahK in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. stutzeri</i> AN10	AAD02154.1	97	99
<i>P. putida</i> PaW630	AAL83666.1	96	98
<i>P. putida</i>	NP_542860.1	96	98
<i>P. putida</i>	AAQ89681.1	95	98
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AAO19121.1	95	98
<i>P. putida</i> NCBI 9816-4	NP_863097.1	93	97
<i>Pseudomonas</i> sp. ST41	AAT09782.1	92	97
<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	CAA43228.1	90	94
<i>Acinetobacter</i> sp. YAA	BAA23561.1	68	85

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

Auf Grund der geringen Enzymaktivität für NahK nach Sala-Trepat und Evans (1971) wurden zusätzlich Enzymtests nach Harayama *et al.* (1989) durchgeführt (Material und Methoden 2.2.8). Diese lieferten bei 265 nm eine 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase-Aktivität von 1270 U/g Protein. Dagegen konnte mit der Negativkontrolle, dem Rohextrakt aus *E. coli* DH5 α^- , eine deutlich schwächere Grundaktivität von 290 U/g Protein gemessen werden.

Somit bestätigen die Enzymtests die Einordnung von NahK als eine 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, die gleichfalls aus den Sequenzvergleichen erfolgte.

3.2.4.7 Das Genprodukt NahJ

Der offene Leserahmen *nahJ* (GC-Gehalt 65,1%) kodiert für 63 Aminosäuren und besitzt eine Ähnlichkeit von 95% zur 4-Oxalocrotonat-Isomerase NahJ aus *P. stutzeri* AN10. Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz, hat NahJ aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 6,84 kDa.

Die Oxalocrotonat-Tautomerase NahJ aus *P. putida* GJ31 gehört zur Proteinfamilie der Tautomerasen (E.C.-Nummer 5.3.2.) und katalysiert die Ketonisierung von 2-Hydroxymuconsäure zu 2-Oxo-3-Hexendiensäure.

Tab. 3.2.4.7: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit NahJ aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit NahJ in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. stutzeri</i> AN10	AAD02155.1	95	98
<i>P. putida</i>	AAQ89682.1	92	95
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AAO19122.1	85	90
<i>P. putida</i>	NP_542859.1	84	88
<i>P. putida</i> G7	AAD13221.1	77	88
<i>Pseudomonas</i> sp. ST41	AAT09783.1	76	87
<i>P. putida</i> NCBI 9816-4	NP_863096.1	74	88
<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	CAA43229.1	69	87
<i>Azotobacter vinelandii</i>	ZP_00092920.1	53	77

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

Die Struktur der 4-Oxalocrotonat-Tautomerasen ist gut untersucht (u.a. Whitman, 1992; Taylor *et al.*, 1998). Die Aminosäuresequenz der 4-Oxalocrotonat-Tautomerasen bildet ein Homohexamer, das als Trimer von Dimeren angeordnet ist. Jedes Monomer ist beta-alpha-beta gefaltet und mit zwei kleinen beta-Strängen am C-terminalen Ende versehen, die mit sich selbst zurück gefaltet sind. Die Dimere sind um eine dreifache Rotationsachse angeordnet, die ein Hexamer bilden.

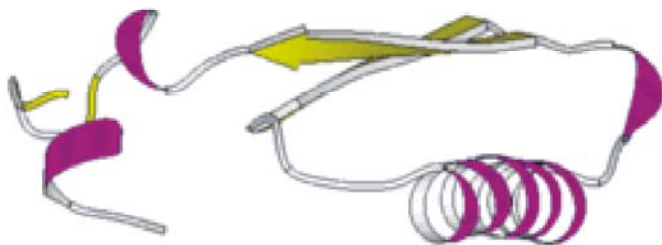


Abb. 3.2.4.7: 3-Dimensionale Kristallstruktur der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase XylH aus *P. putida* PaW1 (exprimiert in *E. coli*), die eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von 92% mit NahJ aus *P. putida* GJ31 aufweist. Erläuterungen: Dargestellt ist ein Monomer von XylH. Normalerweise bildet das aktive XylH ein Trimer von Dimeren. Abbildung nach: Crystal structure of 4-oxalocrotonate tautomerase inactivated by 2-oxo-3-pentynoate at 2.4 angstroms resolution (Taylor *et al.*, 1998). Auflösung: 2,40 Å. R-Faktor: 0,206.

Auf Grund der hohen Ähnlichkeit von NahJ aus *P. putida* GJ31 ist mit einer sehr hohen Übereinstimmung der Struktur dieses Proteins mit bekannten Proteinen der Enzymfamilie der 4-Oxalocrotonat-Tautomerasen zu rechnen (**Abb. 3.2.4.7**).

3.2.4.8 Das Genprodukt NahX

Der offene Leserahmen *nahX* (GC-Gehalt 64,7%) kodiert für 147 Aminosäuren und besitzt eine Identität von 61% zu dem Protein NahX aus *P. putida* G7 mit unbekannter Funktion. Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz, hat NahX aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 15,6 kDa.

Tab. 3.2.4.8: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit NahX aus *P. putida* GJ31.

Spezies	Funktion	Größe (AS)	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit NahX in [%]	
				Identische	Homologe
<i>P. putida</i> G7	U	124	AAD13222.1	61	70
<i>Sufolobus solfatarius</i> P2	G-DHt	101	NP_342681.1	49	71
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	GP-Abb	127	ZP_00272433.1	46	59
<i>Burkholderia</i> sp. RP007	U	126	AAF02431.1	47	58
<i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1	GP-Abb	99	ZP_00242164.1	56	67
<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	GP-Abb	99	ZP_00152025.1	55	61
<i>Azotobacter vinelandii</i>	GP-Abb	100	ZP_00092915.1	50	67
<i>Burkholderia cepacia</i> R18194	GP-Abb	126	ZP_00218045.1	50	61

Erläuterungen: In der Spalte Funktion sind die vermuteten Enzymfunktionen der mit NahX aus *P. putida* GJ31 verglichenen Proteine aufgelistet (U: unbekannte Funktion, G-DHt: putative Glycerol-Dehydratase, GP-Abb: Enzym aus dem Abbauweg von Glycerat und Propandiol). Die Spalte Größe gibt die Anzahl der Aminosäuren der Proteine wieder, die mit NahX verglichen wurden. Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren an.

NahX aus *P. putida* GJ31 weist eine Ähnlichkeit von 47 bis 56% mit Proteinen auf, die mit Enzymen aus den Abbauwegen von Glycerat und Propandiol in Verbindung gebracht werden. Zum Beispiel besitzt NahX aus *P. putida* GJ31 eine 49%ige Ähnlichkeit und 71%ige Homologie mit einem putativen extrazellulären Protein, einer möglichen Glycerol Dehydratase (NCBI Acc. No. NP_342681.1; She *et al.*, 2001).

NahX enthält eine Domäne unbekannter Funktion (pfam03928, DUF336), die in vielen uncharakterisierten Sequenzen inklusive einiger GlcG-Proteine vorkommt. Es könnte sich dabei um Cofaktor-Bindestellen oder Motive für die enzymatische Aktivität handeln.

```

NahX_GJ31      -----MRTTNQRSLHWEAAAYAA TRAAVAHA EKLGV RINVCVVDH SGLPLAYLRMNGAFL
NahX_G7       -----MIISTLETNLIWQAALRAVQAASDHASALGIRIHVAVVDRAGLNLVFLSMNGAFL
ORF_P2        -----MNILNKLGISDELADMLINEAVRKAKELGVNVSIAIVDEGGELKAFKRM DGAPI
ORF_CH34      MTQADSLHSVEARLINWPAANRVVEAAALHAQRLGVCVNI AVVDVAGNLA AF LRMPGAPL
PhnX_RP007    MTQADSRRSVEARLINWPAANRVVEAAAMHHR LGVCVNI AVVDVGGNLA AF LRMPGAPL
ORF_PM1      -----MRNLSSEAAHAAVAAVAHARGLGIRVNAAAVD VSGVLLAF LRMDGAF L
ORF_RCB       -----MAIEMIASLDLAAASEIAELALAEALAGVNICVAVVDRAGYPLVFKRQTGAPY
Avin4660      ----MKPSLRRADSINLALAMHALRAALDRAMALSVRVSIVV VDAAGLPIHTAHMDGAPL
ORF_R18194    MACNDSTRSVVTRTIDWPAAARAAQAAAAAERLGV RVNVAVVDAAGL LAA FVRMPGAPL
              :      *      *      *      . : :      **      . *      **

NahX_GJ31      HSREIAEDKAYTAVSFGFPTRDWDVLGDN-PRLRIGLPRRERLVVFGGGLPILLDGECI
NahX_G7       HSADIARDKAYTAAGFGFPTGQWLQVLGDN-ERLRIGIPARERLVVFGGGLPVLDRQCI
ORF_P2        LTIQIAIDKSWTAVSFGIPTHEWYNILKDN-PSLAMGFPKIPRLIIFGGGFPIIYKEQVI
ORF_CH34      HSIEIAIDKAYTAASFGLPTSRWSEALLSHSEAVRQGI VRRPRFIAFGGGLPIVESGHRI
PhnX_RP007    HSIEIAIDKAYTAASFGLPTSRWSEALLSHSEAVRQGI VRRPRFIAFGGGLPIVESGHRI
ORF_PM1      HSGGIAIDKAYTAASFGLPTEGWGPVLEGD-ASLKAGLPAPVRLVVFGGVP AFEGAQRV
ORF_RCB       HSIDIALDKAYTAVSFGLATGKWDRRLAEGGEMLRHGLMHRERFV SFGGGLPIKYDGARV
Avin4660      QCRDIALNKALTAVGFGMPTRVWEERLAGMSDAVRQGLPLQPRMALF GGGEPFLFEGRPV
ORF_R18194    HSIDIAIDKAYTAASFGLPTGAWHDALAAHSAAVQQGLVLRPRFVAFGGGLPIVDDGALI
              ** :*: ** .***: * * * : *: * : **** * :

NahX_GJ31      GGIGVSGADEGQDEACAAAGLAAIGHHEASSLG
NahX_G7       GGIGVSGGSEEQDEACAEAGLRAM-----LG
ORF_P2        GGIGVSGASAEQDMEIAKSALKRLES-----
ORF_CH34      GGIGVSGGTTEEQDEHCAQAGLSLLGLTQT----
PhnX_RP007    GGIGVSGGTTEEQDEHCAQAGLSLLGLTQT----
ORF_PM1      GALGVSGGTAEQDAACARAGLAAIGLVAQAS--
ORF_RCB       GAIGISGGSEAQDVAFGEAALAAWLQNTAAK--
Avin4660      GAIGISGASEQQDEE.E.C.AQAAVRTVQALLESASA
ORF_R18194    GGIGVSGGSEAQDESCARAGLDAAGFGGG----
              *.:***. ** . :.:

```

Abb. 3.2.4.8: Domäne unbekannter Funktion in NahX aus *P. putida* GJ31 und verwandten Proteinen. Das Motiv mit ungeklärter Funktion (pfam03928, DUF336) ist dunkelgrau eingefärbt und in weißer Schrift dargestellt. Erläuterungen: *: Übereinstimmung der Aminosäuren, :: strukturell sehr ähnliche Aminosäuren, .: strukturell ähnliche Aminosäuren. Aminosäuresequenzen: NahX_GJ31 (*P. putida* GJ31, diese Arbeit) NahX_G7 (*P. putida* G7, NCBI Acc. No. AAD13222.1, Grimm *et al.*, 1999), ORF_P2 (*Sulfolobus solfataricus* P2, NCBI Acc. No. NP_342681.1, She *et al.*, 2001), ORF_CH34 (*Ralstonia metallidurans* CH34, NCBI Acc. No. ZP_00272433.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), PhnX_RP007 (*Burkholderia* sp. RP007, NCBI Acc. No. AAF02431.1, Laurie und Lloyd-Jones, 1999), ORF_PM1 (*Rubrivivax gelatinosus* PM1, NCBI Acc. No. ZP_00242164.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), ORF_RCB (*Dechloromonas aromatica* RCB, NCBI Acc. No. ZP_00152025.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), Avin 4660 (*Azotobacter vinelandii*, NCBI Acc. No. ZP_00092915.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), ORF_R18194 (*Burkholderia cepacia* R18194, NCBI Acc. No. ZP_00218045.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation).

3.2.5 Der nahINLOMKJX-Cluster in den Abkömmlingen von *P. putida* GJ31

Durch PCR-Experimente wurde mit Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31* und *P. putida* QM1 unter Verwendung der generierten und getesteten Primer untersucht, welche Bereiche der Nukleotidsequenz aus *P. putida* GJ31 in den jeweiligen Abkömmlingen vorhanden sind oder welche Bereiche fehlen. Auf Grundlage der Nukleotidsequenz des nahINLOMKJX-Clusters (rund 5,9 kbp) von pKW1 aus *P. putida* GJ31 konnten gezielt Primer zur Untersuchung dieser Sequenzbereiche an anderen Stämmen eingesetzt werden. Die Primer konnten auf ihre Funktionalität mit DNA aus *P. putida* GJ31 getestet werden.

Hybridisierungsexperimente mit einer radioaktiv ^{32}P -markierten Sonde auf Grundlage des PCR-Produkts pKF70 (Sonde RSpKF70), die Sequenzbereiche von *nahINL* enthält, wurden für hydrolysierte Plasmid-DNA aus *P. putida* GJ31* durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass auch der Stamm *P. putida* GJ31* über die Sequenzbereiche des *nahINLOMKJX*-Clusters vergleichbar zu *P. putida* GJ31 verfügt. Plasmid-DNA aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* zeigte bei den Hybridisierungsexperimenten mit der Sonde RSpKF70 gleiche Restriktionsfragmentmuster.

Abbildung 3.2.5 gibt eine Übersicht der PCR-Untersuchungen für den *nahINLOMKJX*-Cluster mit Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31* und *P. putida* QM1.

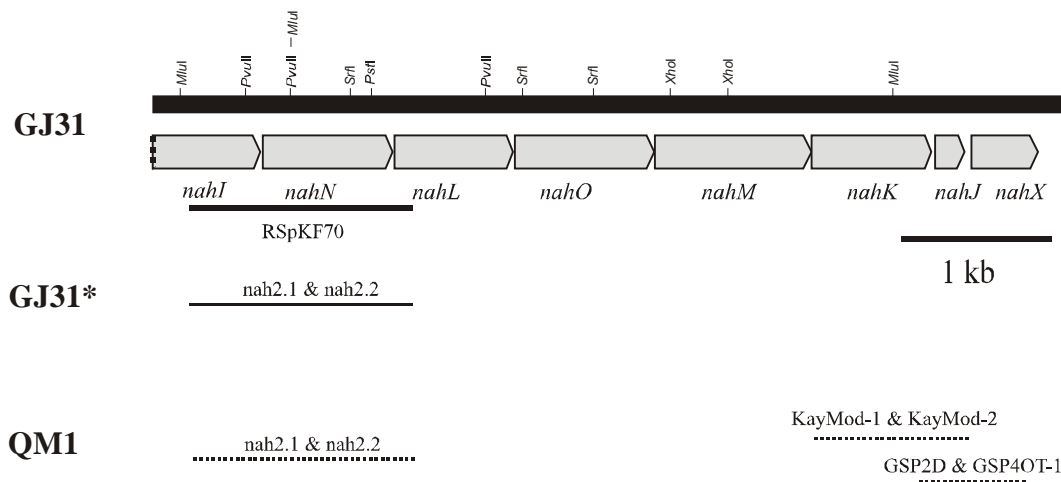


Abb. 3.2.5: Übersicht der PCR-Experimente zur Untersuchung der *nahINLOMKJX*-Cluster in den Abkömmlingen von *P. putida* GJ31, *P. putida* GJ31* und *P. putida* QM1. Erläuterungen: Durchgezogene Balken: Produkte der PCR-Experimente. Gepunktete Balken: potentielle Produkte der PCR-Experimente, die nicht erhalten wurden. Über den einzelnen Balken sind die verwendeten Primer angegeben. Dicker Balken: radioaktiv markierte Sonde RSpKF70. Die gesamte Abbildung ist maßstabsgetreu. Genbezeichnungen und die zugehörigen Enzymbezeichnungen: siehe **Abb.** 3.2.1.1.

Die Ergebnisse der Hybridisierungs- und der PCR-Experimente lassen vermuten, dass der *nahINLOMKJX*-Cluster in *P. putida* GJ31* analog zu *P. putida* GJ31 vorliegt und in *P. putida* QM1 komplett fehlt.

3.3 Der *cbzTEXG*-Cluster aus *P. putida* GJ31: Der Transposonbereich Tn5501

3.3.1 Klonierungsstrategie zur vollständigen Sequenzierung

Mars *et al.* (1999) und Kunze (2002) gelang die Sequenzierung des *cbzTEXG*-Clusters bis zu einem Bereich stromabwärts der bruchstückhaften Transposase *tnpA3* (siehe **Abb. 3.3.1**)

Kunze (2002) vermutete auf Grund von Sequenzierungs- und PCR-Experimenten einen Transposonbereich stromabwärts im Anschluss an die Transposase *tnpA3*, der dem Transposonbereich Tn5501 aus *Pseudomonas putida* Stamm H (Lauf *et al.*, 1998) sehr ähnlich ist.

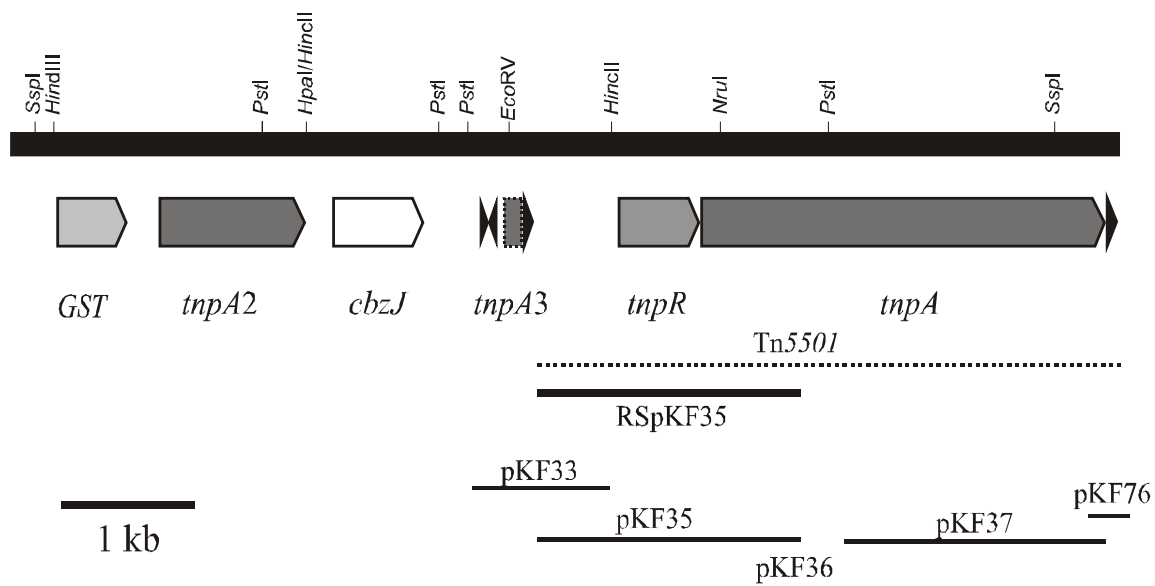


Abb. 3.3.1: Organisation des Transposonbereiches Tn5501 des *cbzTEXG*-Clusters aus *P. putida* GJ31. Gezeigt ist die zur Sequenzierung verwendete Klonierungsstrategie, sowie wichtige Restriktionsschnittstellen. Inverted Repeats (IR) sind als entsprechend ihrer Orientierung ausgerichtete Dreiecke dargestellt. Der schwarze Balken kennzeichnet die zur Lagefestellung verwendete radioaktive Sonde RSpKF35. Der mit Tn5501 aus *P. putida* H ähnliche Bereich (Lauf *et al.*, 1998) ist mit einer gepunkteten Linie markiert. Die gesamte Darstellung ist maßstabsgetreu. Genbezeichnungen und die zugehörigen Enzymbezeichnungen: GST: Glutathion S-Transferase, *tnpA2*: Transposase, *cbzJ*: 2-Oxopent-4-enoat-Hydratase, *tnpA3*: Transposase, *tnpR*: Resolvase, *tnpA4*: Transposase.

Tn5501 ist ein mobiles genetisches Element der Tn3-Familie (u.a. Ischikawa und Ohtsubo, 1990) der kryptischen Transposons bzw. ist ein Mitglied der Tn501 Unterfamilie. Es enthält zwei offene Leserahmen der selben Orientierung. Dies ist zum einen eine Resolvase und zum anderen eine Transposase. Das Transposon Tn5501 aus *P. putida* H ist an seinen Enden von einem Inverted Repeat eingerahmt. Deshalb wurden auf Grundlage der Nukleotidsequenz von Tn5501 aus *P. putida* H (NCBI Acc. No. Y09450) Primer generiert, die eine Amplifikation

und Sequenzierung von rund 5,5 kbp des Transposonbereiches Tn5501 in *P. putida* GJ31 ermöglichten (Tab. 3.3.1).

Tab. 3.3.1: Übersicht der Vektoren zur vollständigen Sequenzierung von Tn5501 aus *P. putida* GJ31.

Vektor	Bezeichnung	Insert [bp]	PCR-Produkt erhalten mit:	
			Primer 1	Primer 2
pKF33 ^a		1250	Qno36	Qno37
pKF35 ^b		2000	Tn5501A-1	Tn5501A-2
pKF36 ^a		2000	Tn5501M-1	Tn5501M-2
pKF37 ^a		2000	Tn5501E-1	Tn5501E-2
pKF76 ^b		307	Kay41	Kay42a

Erläuterungen: Vektoren: a: pPCR script Amp SK(+) (*SrfI* geschnitten) b: pCR[®] 4Blunt-TOPO[®], mit dem jeweiligen PCR-Produkt als Insert ligiert.

3.3.2 Lage auf pKW1

Die von Kunze (2002) erarbeitete Sequenz zeigt für den *cbzTEXG*-Cluster auf pKW1 Restriktionsschnittstellen, so dass ein ca. 16 kbp großes *MluI*-Fragment bei einem Hybridisierungsexperiment mit der Sonde RSpKF35 zu erwarten ist. Dieses konnte im Autoradiogramm der Hybridisierung (siehe Abb. 3.3.2) nachgewiesen werden. Der Transposonbereich Tn5501 liegt in *P. putida* GJ31 auf einem rund 50 kbp großen *DraI* Fragment. Es ist außerdem davon auszugehen, dass es keinen weiteren Transposonbereich Tn5501 auf pKW1 gibt, da keine weiteren Fragmente Hybridisierungen zeigten.

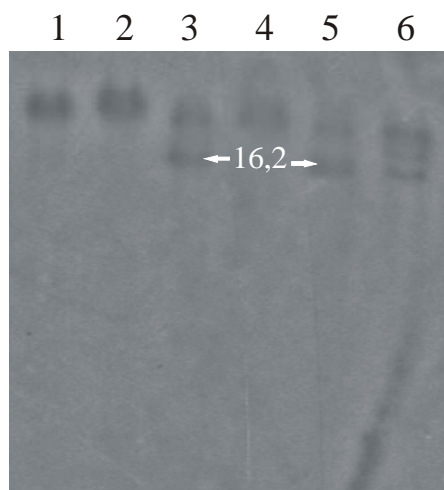


Abb. 3.3.2: Autoradiogramm der Hybridisierung hydrolysierter Plasmid-DNA von pKW1 aus *P. putida* GJ31. Die Hydrolyse erfolgte jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *DraI*, *AseI* und *MluI* sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander. Als homologe radioaktiv markierte Sonde RSpKF35 diente das PCR-Fragment (Primer Tn5501A-1 und Tn5501A-2), welches für einen Teil des Transposonbereiches stromaufwärts von *tnpR* sowie *tnpR* kodiert. Die ungefähre Größe der hybridisierten Fragmente ist jeweils auf gleicher Höhe in [kbp] angegeben (weiße Schrift). Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über ein 0,7%iges Agarosegel.

Die Spurenbelegung war wie folgt:

1. pKW1, hydrolysiert mit *DraI*
2. pKW1, hydrolysiert mit *AseI*
3. pKW1, hydrolysiert mit *MluI*
4. pKW1, hydrolysiert mit *DraI* und *AseI*
5. pKW1, hydrolysiert mit *DraI* und *MluI*
6. pKW1, hydrolysiert mit *AseI* und *MluI*

3.3.3 Analyse nichtkodierender Bereiche

Die postulierte Ribosomenbindestelle von *tnpR* und *tnpA4*

Eine potentielle Ribosomenbindestelle konnte in dem für *Pseudomonas putida* typischen Abstand zum Startcodon von *tnpR* und *tnpA4* ermittelt werden (Tab. 3.3.3.1).

Tab. 3.3.3.1: Die postulierte Ribosomenbindestellen upstream von *tnpR* und *tnpA4* aus *P. putida* GJ31.

Leserahmen	Sequenz der Ribosomenbindestelle
<i>tnpR</i>	CAACACCCCTCAAAAATGTACGGAAACTCTATCGCTATTCACTATTATG
<i>tnpA4</i>	TTGGCGTGGTGCGGAGGACGGTTCGATG
16S-rRNA	3'-UCUUUCCUCCACUA-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

Die potentielle Promotorregion vor *tnpR*

Mit Hilfe des Programms Neural Network Promotor Prediction (Ohler, 1999) wurde ein σ^{70} -Faktor abhängiger Promotor P_{TR} ermittelt, der eine Ähnlichkeit von nur rund 60 % mit typischen Promotoren von *E. coli* hat. Die potentielle Promotorregion lag in *P. putida* GJ31 aber 757 bp stromaufwärts von dem Startcodon von *tnpR*. Dieser Bereich bis *tnpR* zeigt keinen offenen Leserahmen.

-35
-10
↗
 GATTTTCGATGTCGTAGCCGAGGCGATTCAGACAAATCCATCAGCTTGCCTT

Abb. 3.3.3.1: Potentielle Promotorregion upstream von *tnpR* in *P. putida* GJ31. Die -35-Region und die -10-Region sind hier grau hinterlegt. Der durch Neural Network Promotor Prediction (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) errechnete Startpunkt der Translation liegt 757 Nukleotide vor dem Beginn des Startcodons von *tnpR* und ist fett gedruckt und durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Inverted Repeats

Inverted Repeats konnten mit dem Programm „Emboss inverted“ im Transposonbereich *Tn5501* gefunden werden. Es handelt sich dabei um ein unvollständiges 38/18 Δ -x-IS Element, das im sequenzierten Bereich 94% kompatible Übereinstimmungen der Nukleotide des Δ -x-ISR- und Δ -x-ISL-Bereichs des IR aufweist. Eine weitergehende Sequenzierung stromabwärts des Δ -x-ISR in *Tn5501* aus *P. putida* GJ31 scheiterte, da die PCR mit den Primern Kay41 und Kay42b und Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31 als Template kein Produkt

ergab. Entweder war die PCR fehlerhaft oder die Sequenz des Δ -x-ISR-Elements ist in *P. putida* GJ31 analog zu *P. putida* H unvollständig.

Δ -x-ISR	14753	GGGGTTGTAAGCCGGAAACCCAGAAATTTCCGTCAGCC	14790
Δ -x-ISL	20356	CCCCAACATGCGGCCTTA	20339

Abb. 3.3.3.2: IR in Tn5501 aus *P. putida* GJ31 (Δ -x-ISL: 14754 bis 14790 bp, Δ -x-ISR: 20339 bis 20356 bp). Erläuterungen: Die Positionsangaben beziehen sich auf das 5'-Ende des *cbzTEXG*-Clusters aus *P. putida* GJ31 als Startpunkt.

Tab. 3.3.3.2: Terminale inverted repeats (IR) von Vertretern der Tn3-Familie.

Bezeichnung		Identische [%]
Tn3	GGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAG	36
Tn1000L Tn1000R	GGGGTTTGAGGGCCAAATGGAAACGAAAACGTACGTTAAG T T	36
Tn501	GGGGGAACCGCAGAATTGGAAATAAATCGTACGCTAAG	26
Tn4430	GGGGTACCGCCAGCATTTCGGAAATAAACCACGCTAAG	31
Tn1721L Tn1721R	GGGGGAACCGCAGAATTGGAAATAAATCGTACGCTAAG AGC	26
Tn21R Tn21L	GGGGTCGTCTCAGAAAAATGGAAATAAAGCACGCTAAG G AC	36
Δ -x-ISR-1 Δ -x-ISL-1	GGGGTTTGAGGGAGCAAATGGAAACCGAAAACCAACGTAAG C A T GC T	28
Tn5501L Tn5501R	GGGGTTGTAAGCCGGAAACCCAGAAATTTCCGTCAGCC C T-----	100
Δ -x-ISR-2 Δ -x-ISL-2	GGGGTTGTAAGCCGGAAACCCAGAAATTTCCGTCAGCC A-----	

Die konservierten Motive sind grau hinterlegt. L steht für linkes IR, R für rechtes IR. Bei dem mittleren Motiv handelt es sich um PyGGAA. Erläuterungen: Δ -x-ISR-1 bezeichnet ein weiteres IR aus *P. putida* GJ31 (Kunze, 2002), das ebenfalls im *cbzTEXG*-Cluster gefunden wurde (Positionsangaben bezogen auf das 5'-Ende des *cbzTEXG*-Clusters aus *P. putida* GJ31 als Startpunkt: Δ -x-ISR-1: 4814 bis 4852, Δ -x-ISL-1: 5037 bis 5075). Die Prozentangabe in der Spalte Identische gibt den Prozentsatz der identischen Nukleotide der Sequenzen im Vergleich zu Δ -x-IS-2 aus *P. putida* GJ31 an. (-) deutet an, dass ein jeweiliges komplementäres Nukleotid im linken Teil des IR nicht vorhanden oder sequenziert ist.

Das Δ -x-IS-Element aus Tn5501 in *P. putida* GJ31 ist vollständig und identisch zu dem IR aus Tn5501 in *P. putida* H (Lauf *et al.*, 1998; NCBI Acc. No. Y09450).

Mit weiteren Vertretern von terminalen IRs der Tn3-Familie weist es jedoch nur geringe Ähnlichkeiten auf (siehe **Tab. 3.3.3.2**). Dies wurde auch von Lauf *et al.* (1997) für *P. putida*

H beschrieben. Lauf *et al.* (1998) stellten zudem fest, dass das konservierte TAAG Motiv am inneren Ende des IR in Tn5501 fehlt. Gleiches gilt für das hier beschriebene IR (siehe **Tab. 3.3.3.2**).

3.3.4 Analyse kodierender Bereiche

3.3.4.1 Das Genprodukt TnpR

Der offene Leserahmen *tnpR* (GC-Gehalt 65,4%) kodiert für 200 Aminosäuren und besitzt eine Ähnlichkeit von 87% zur Resolvase TnpR aus *P. pseudoalcaligenes* ND6. Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz hat TnpR aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 21,9 kDa.

Tab. 3.3.4.1: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit TnpR aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit TnpR in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. pseudoalcaligenes</i> ND6	NP_946127.1	87	87
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	XAC00029	82	87
<i>P. putida</i> H (Plasmid pPGH1)	T28653	81	83
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	NP_644715.1	78	83
<i>Pseudomonas</i> sp. ED23-33	CAC14708.1	43	60
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	NP_862487.1	43	59

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

TnpR aus *P. putida* GJ31 weist große Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz mit einer charakteristischen Domäne (pfam00239) von vielen Resolvasen auf.

Diese N-terminale Domäne beinhaltet ein putatives aktives Zentrum und eine Dimer-Kopplungsstelle. Hier verknüpft sich der C-Terminus dieser Domäne mit dem C-Terminus der Helix-Turn-Helix-Domäne der Resolvase (pfam02796). Somit bildet die Resolvase ein unsymmetrisches Dimer aus (Yang und Steitz, 1995).

```

TnpR_GJ31      MRKPV-----RVSSSDSRQSTDLQRDALLAAGVDPRHLEFEDRASGAKDDRAGL
TnpR_ND6      MRKPVFDGYPPMLVGYMRVSSSDSRQSTDLQRDALLAAGVDPRHLEFEDRASGAKDDRAGL
TnpR_H        MLVGY-----MRVSADSRQSTDLPRRAA-AAGVDPRHLEFEDRPSGAKDDRAGL
XACaa09_306   MLVGY-----MRVSSSDSRQSTNLQRDALLAAGVDARHLEFEDRISGAKDDRAGL
TniR_ED23-33  MLIGY-----MRVSKADGSQATDLQRDALVAAGVDPAAHLYEDQASGKREDRPGGL
TnpR_ADP      MLIGY-----MRVSKADGSQATDLQRDALIAAGVDPVHLYEDQASGMREDRPGGL
*              ***  ..  *:* * * *  *****  **::**  * * :***. **

TnpR_GJ31      ARALEFVRAGDVLVVWKLDRLEGRSLSHLLAIVTSLKDKRVAFRSLT---ENLDTTTPSGE
TnpR_ND6      ARALEFVRAGDVLVVWKLDRLEGRSLSHLLAIVTSLKDKRVAFRSLT---ENLDTTTPSGE
TnpR_H        AGRLSFVRAGDVLVVWKLDRLEGRSLSHLLAIVTSLKDKRVAFRSLT---ENLDTTTPSGE
XACaa09_306   TKALEFVRPGDVLVVWKLDRLEGRSLSHLLAIVTSLKDKQVAFRSLT---EGMDTSTASGE
TniR_ED23-33  ASCLKALRPGDTLVVWKLDRLEGRDLRNLINTVHDLTERGIGLKVLTGHGAAIDTTAAGK
TnpR_ADP      TSCLKALRTGDTLVVWKLDRLEGRDLRHLINTVHDLTGRGIGLKVLTGHGAAIDTTAAGK
:  * . : * . ** . ***** . * : : * * . : : : : **      : ** : * . : *

TnpR_GJ31      FLFQVFGALAQYERALIQERVVAGLAAARKRGRIGGRPQAITGEKLDIVAALDGGMSKA
TnpR_ND6      FLFQVFGALAQYERALIQERVVAGLAAARKRGRIGGRPQAITGEKLDIVAALDGGMSKA
TnpR_H        FLFQVFGALAQYERALIQERVVAGLAAARKRGRIGGRRRAITGEKLDIVAALDGGMSKA
XACaa09_306   LLFHVFGALAQYERALIQERVVAGLAAAARRRGRIGGRPLAIVGEKLEAIIAALNGGMSKA
TniR_ED23-33  LVFGIFAALAEFERELIAERTVAGLASAQTRGRKGRPFKMTAAKLRLAMAAMGQSQTQV
TnpR_ADP      LVFGIFAALAEFERELIAERTIAGLASARARGRKGGRPFKMTAAKLRLAMAAMGQPETKV
: : * : * . * : : * : * * * * * . : * : * : * : * * * * * : . . * * : * : . : *

TnpR_GJ31      -AVCRNFNVKRTTTLIETLTRAG-WRGAGRTVDEQQE
TnpR_ND6      -AVCRNFNVKRTTTLIETLTRAG-WRGAGRTVDEQQE
TnpR_H        -AVCRNLIVKRTTTLIETLTPSR-LAWCGK--DGR--
XACaa09_306   -AVCRNFGVKRTTTLIETLERVG-WRGTGSTADGQQE
TniR_ED23-33  GDLCQELGITRQTLYRHISPKGELRPDGEKLLSRI-
TnpR_ADP      GDLCQELGVTRQTLYRHVSPKGELRPDGEKLLSRI-
: * : : : : : . * * * . : * * * * * :

```

Abb. 3.3.4.1: Aminosäuresequenzvergleich von TnpR aus *P. putida* GJ31 mit verwandten Resolvasen. Erläuterungen: Dunkelgrau hinterlegt mit weißer Schrift: N-terminale Domäne mit einem aktiven Zentrum und einer Dimer-Kopplungsstelle. Hellgrau hinterlegt mit schwarzer Schrift: Helix-Turn-Helix-Domäne. Erläuterungen: *: Übereinstimmung der Aminosäuren, :: strukturell sehr ähnliche Aminosäuren, .: strukturell ähnliche Aminosäuren. Aminosäuresequenzen: TnpR_GJ31 (*P. putida* GJ31, diese Arbeit), TnpR_ND6 (*P. pseudoalcaligenes* ND6, NCBI Acc. No. NP_946127.1, Li *et al.*, 2004), TnpR_H (*P. putida* H, NCBI Acc. No. T28653, Lauf *et al.*, 1998), XACaa09_306 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306, NCBI Acc. No. NP_644715.1, daSilva *et al.*, 2002), TniR_ED23-33 (*Pseudomonas* sp. ED23-33, NCBI Acc. No. CAC14708.1, Mindlin *et al.*, 1998, unveröffentlicht),

3.3.4.2 Das Genprodukt TnpA

Der offene Leserahmen *tnpA* (GC-Gehalt 60,7%) kodiert für 1008 Aminosäuren. Nach Sequenzvergleichen konnte eine Ähnlichkeit von 98% der mit TnpA, der Transposase aus *Pseudomonas* sp. ND6, festgestellt werden. Die Ähnlichkeit im Vergleich zu Tn5501 aus *P. putida* H liegt nur bei 90%. Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz hat TnpA aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 115,2 kDa.

TnpA4 gehört zur Familie der Transposasen (pfam01526, Transposasen 7). Diese Familie beinhaltet Transposasen wie Tn3, Tn21, Tn1721, Tn2501, Tn3926 aus *E. coli*. Die spezifische Bindestelle der Tn3 Transposase an DNA wurde von Fennewald *et al.* (1981) gezeigt.

Tab. 3.3.4.2: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit TnpA aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit TnpA in [%]	
		Identische	Homologe
<i>Pseudomonas</i> sp. ND6	NP_943128.1	98	98
<i>P. putida</i> H (Plasmid pPGH1)	T28654	90	91
<i>Ralstonia eutropha</i> JM134	ZP_00165705.1	84	91
<i>Proteus vulgaris</i> UR-57	NP_640046.1	30	51

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

Sequenzanalysen lassen vermuten, dass die invariante Triade von D689, D765, E895 (Bezeichnung nach Tn3) mit dem D-D-35-E Motiv korrespondiert, das schon früher in die Katalyse durch verschiedene Transposasen einbezogen wurde (u.a. LaFemina *et al.*, 1992; Rådström *et al.*, 1994; Baker und Luo, 1994; Kahn und Schaefer, 1995, Yurieva und Nikiforov, 1996). In TnpA4 findet sich gleichfalls ein D-D-35-E Motiv in leichter Variation (siehe **Abb.** 3.3.4.2). Es handelt sich um ein D-D-31-E Motiv, wobei folgende Aminosäuren involviert sind: D673, D772, E804.

tnpA_GJ31	654	VLESTYQQYLRQATLHVANDCISNAIAALPIFPHYSDLLSDLYGAVDGQKFGVERPTVKA	
TnpA_ND6		VLESTYQQYLRQATLHVANDCISNAIAALPIFPHYSDLLSDLYGAVDGQKFGVERPTVKA	
TnpA_H		VLESTYQQYLRQATLHVANDCISNAIAALPIFPHYSDLLSDLYGAVDGQKFGVERPTVKA	
TnpA_JMP134		VLDSYQQYLRQATLHAANDCISNAIAALPIFPHYSDLLDALYSVAVDGQKFGVERPTVKA	
TnpA_UR-57		VLRAVNDGRIIPETTSEANDMIADALAKLPIFKYTTINESAPFGSIDGQKHGCRINTFKA	
		** :. : * : * *** *::** :*** :***: :. : *	
tnpA_GJ31		RYSRKYFGRGKGVVAYTLLCNHVPLNGYLIGAHEYEAAHVFDIWRNTSDIIVPSAITGDM	
TnpA_ND6		RYSRKYFGRGKGVVAYTLLCNHVPLNGYLIGAHEYEAAHVFDIWRNTSDIIVPSAITGDM	
TnpA_H		RYSRKYFGRGKGVVAYTLLCNHVPLNGYLIGAHEYEAAHVFDIWRNTSDIIVPSAITGDM	
TnpA_JMP134		RYSRKYFGRGKGVVAYTLLCNHVPLNGYLIGAHEYEAAHVFDIWRNTSDIIVPTAITGDM	
TnpA_UR-57		RFSAKYFRKGGVSALTLSVNHVPIINTKVISANEYEAAHVFDLLYNNTSHIQPKTLATDT	
		: *** :**** * *: :*****: * :* :***** :***: * :**** * * : : : : *	
tnpA_GJ31		HSINKANFAILYWFLRFEPFRFTLDDQQLFLYCADDLALYEKCLIRPAGQIDRQLIVGE	833
TnpA_ND6		HSINKANFAILYWFLRFEPFRFTLDDQQLFLYCADDLALYEKCLIRPAGQIDRQLIVGE	
TnpA_H		HSINKANFAILYWFLRFEPFRFTLDDQQLFLYCADDLALYEKCLIRPAGRSTGKLIVGE	
TnpA_JMP134		HSINKANFAILYWFLRFEPFRFTLDDQQLFLYCIDDPALYEKCLIPIGIDRQLITSE	
TnpA_UR-57		HGVNNVNFAILDLFYGFAPRYAKFKHVFNLFLEIYEDEILS---LKLKSLNLSLIQEE	
		* : : : : : ***** ** :* *::: * *	

Abb. 3.3.4.2: Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz mit modifiziertem D-D-35-E Motiv von TnpA4 aus *P. putida* GJ31 und Vergleich mit verwandten Transposasen. Hervorgehoben ist ein putatives D-D-35-E Motiv. Erläuterungen: Dunkelgrau hinterlegt mit weißer Schrift: D673, D772, E804. Hellgrau hinterlegt mit schwarzer Schrift: 31 Aminosäuren aus dem D-D-35-E Motiv, *: Übereinstimmung der Aminosäuren, :: strukturell sehr ähnliche Aminosäuren, .: strukturell ähnliche Aminosäuren. Aminosäuresequenzen: TnpA_GJ31 (*P. putida* GJ31, diese Arbeit), TnpA_ND6 (*Pseudomonas* sp. ND6, NCBI Acc. No. NP_943128.1, Li *et al.*, 2004), TnpA_H (*P. putida* H, NCBI Acc. No. T28654, Lauf *et al.*, 1998), TnpA_JMP134 (*Ralstonia eutropha* JM134, NCBI Acc. No. ZP_00165705.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), TnpA_UR-57 (*Proteus vulgaris* UR-57, NCBI Acc. No. NP_640046.1, Murata *et al.*, 2002).

3.3.5 Tn5501 und *cbz-TEGX*-Cluster in den Abkömmlingen von *P. putida* GJ31

Auf Grundlage der Nukleotidsequenz des *cbzTEGX*-Clusters und des Transposonbereiches Tn5501 (rund 21 kbp) von pKW1 aus *P. putida* GJ31 konnten gezielt Primer zur Untersuchung dieser Sequenzbereiche generiert werden. Weiterhin standen auf ihre Funktionalität mit DNA aus *P. putida* GJ31 getestete Primer zur Verfügung. Durch PCR-Experimente wurde mit Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31* und *P. putida* QM1 unter Verwendung der generierten und getesteten Primer untersucht, welche Bereiche der Nukleotidsequenz aus *P. putida* GJ31 in den jeweiligen Abkömmlingen vorhanden sind oder welche Bereiche fehlen (Übersicht der Experimente und der verwendeten Primer in **Abb. 3.3.5**).

Mittels PCR-Experimenten konnte in den beiden Abkömmlingen von *P. putida* GJ31 gezeigt werden, dass Bereiche des *tra*-Operons und der Transposonbereiches Tn5501 komplett vorhanden sind. Allerdings konnte mit Gesamt-DNA von *P. putida* QM1, eingesetzt in die PCR mit den Primern Qno32 und Qno33, kein Produkt erhalten werden. Somit fehlt ein Teil des offenen Leserahmens *traG* in Stamm QM1. Der Transposonbereich Tn5501 ist in beiden Abkömmlingen von *P. putida* GJ31 komplett vorhanden. Dies wurde durch PCR mit vier unterschiedlichen Primerpaaren gezeigt, die den kompletten Bereich amplifizieren konnten.

In *P. putida* GJ31* wurde bei unterschiedlichen PCR-Experimenten Produkte aller Bereiche des *cbzTEGX*-Clusters analog zu *P. putida* GJ31 erhalten. Im Unterschied dazu wurde bei Einsatz von Gesamt-DNA aus *P. putida* QM1 als Template in keinem Fall ein Produkt erhalten. Somit konnte der gesamte Bereich *traG* bis *tnpA3* in Stamm QM1 nicht nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob sich statt des *cbzTEGX*-Clusters ein anderer Nukleotidbereich zwischen *tra*-Operon und Tn5501 befindet oder dieser gesamte Bereich fehlt, wurde eine PCR mit den Primern QES1 und QES41 durchgeführt. Beide Primer liegen nachgewiesenermaßen in Nukleotidbereichen von QM1. Trotz einer Elongationszeit von 4 min. wurde aber kein Produkt erhalten. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass zwischen dem *tra*-Operon und Tn5501 in *P. putida* QM1 ein über 4 kbp großer Bereich insertiert ist und den *cbzTEGX*-Cluster ersetzt hat. Der *cbzTEGX*-Cluster oder Teile davon sind mit Gesamt-DNA von *P. putida* QM1 in PCR-Experimenten nicht nachweisbar. Wahrscheinlich ist in dem Stamm *P. putida* QM1, der durch Benzoat-Curing aus *P. putida* GJ31 gewonnen wurde, der Bereich um *cbzTEGX* durch einen anderen Bereich ersetzt.

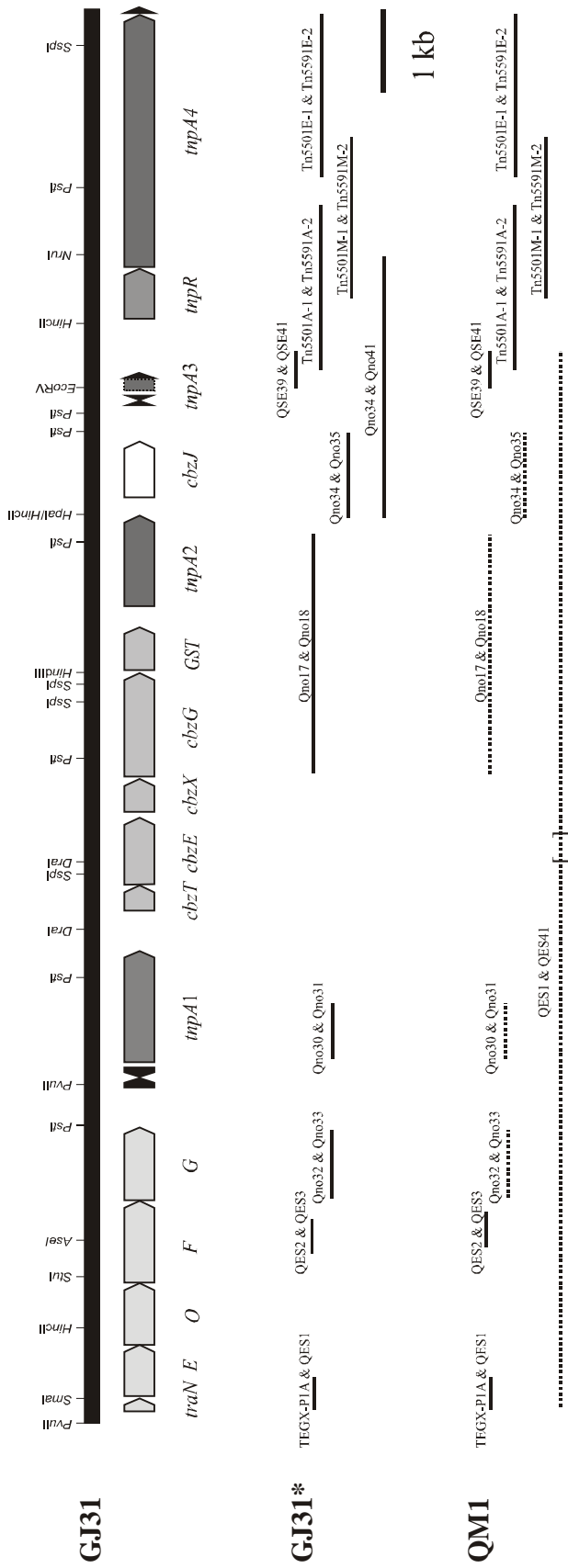


Abb. 3.3.5: Übersicht der PCR-Experimente zur Feststellung der Vollständigkeit des *cbzTEXG*-Clusters auf den Plasmiden der Abkömmlinge *P. putida* GJ31* und *P. putida* QM1 im Vergleich zu dem Plasmid pKW1 aus dem Wildstamm *P. putida* GJ31. Erläuterungen: Durchgezogene Balken: Produkte der PCR-Experimente. Gepunktete Balken: potentielle PCR-Produkte, die nicht erhalten wurden. Über den einzelnen Balken sind die verwendeten Primer angegeben. Genbezeichnungen und die zugehörigen Enzymbezeichnungen: *traN*, *traE*, *traO*, *traF*, *traG* als Bestandteil eines Transfer-Operons; *cbzT*: Ferredoxin-Reduktase; *cbzE*: 2,3-Dioxygenase; *cbzX*: Funktion unbekannt; *cbzG*: 2-Hydroxyumuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase; *GST*: Glutathion S-Transferase; *cbzJ*: 2-Oxopent-4-enoat-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 gesamte Darstellung ist maßstabgetreu.

3.4 Die Chloracetaldehyd-Dehydrogenase *aldA* aus *P. putida* GJ31

Nach Reifenrath (pers. Mitteilung) muss es neben den Acetaldehyd-Dehydrogenasen CbzQ (Kunze, 2002) und NahO (diese Arbeit) eine Acetaldehyd-Dehydrogenase geben, die für die Umsetzung von Chloracetaldehyd, einem Metabolit im 4-Chlorcatechol-Abbau, fungiert.

3.4.1 Klonierungsstrategie

Nach Sequenzvergleichen mit anderen Chloracetaldehyd-Dehydrogenasen wurden zwei Primerpärchen (*aldA*-1, *aldA*-2 und *aldA*-3, *aldA*-4) auf Grundlage der Nukleotidsequenz von *aldA* aus *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (NCBI Acc. No. AF029733) generiert und in eine PCR mit Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31 eingesetzt (Material und Methoden 2.3.16). Mit den Primern *aldA*-1 und *aldA*-2 konnte kein Produkt mit der errechneten Größe (1350 bp) erhalten werden.

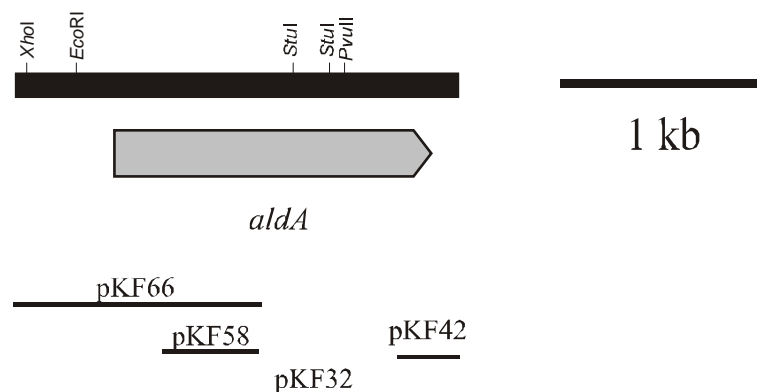


Abb. 3.4.1: Organisation der Chloracetaldehyd-Dehydrogenase *aldA* aus *P. putida* GJ31. Gezeigt ist die zur Sequenzierung verwendete Klonierungsstrategie, sowie wichtige Restriktionsschnittstellen. Die gesamte Darstellung ist maßstabsgetreu.

Die PCR mit den Primern *aldA*-3 und *aldA*-4 lieferte dagegen ein gewünschtes PCR-Produkt in einer Größe von 787 bp. Dieses wurde in den Vektor pPCR script Amp SK(+) ligiert (pKF32) und sequenziert.

Von dieser bekannten Sequenz ausgehend, wurden Genom Walk Schritte stromabwärts und stromaufwärts mit genspezifischen Primern und DNA-Bibliotheken von *P. putida* GJ31 begonnen (siehe **Tab.** 3.4.1). Es wurde insgesamt ein Bereich von rund 2,1 kbp sequenziert.

Tab. 3.4.1: Übersicht der Vektoren zur Sequenzierung der mittels Genom Walk erhaltenen PCR-Produkte.

Vektor		Primer 1. PCR	Primer 2. PCR	Gen-Bibliothek aus Gesamt DNA von <i>P. putida</i> GJ31
Bezeichnung	Insert [bp]	mit AP1	mit AP2	hydrolysiert mit...
pKF42 ^a	300	GSPAD-1	GSPAD-2	<i>StuI</i>
pKF58 ^b	500	GSPaldAupII-1	GSPaldAupII-2	<i>StuI</i>
pKF66 ^b	1100	GSPaldAupIII-1	GSPaldAupIII-2	<i>PvuII</i>

Vektoren: a: pPCR script Amp SK(+) (*SrfI* geschnitten), b: pCR[®] 4Blunt-TOPO[®], mit dem jeweiligen Insert ligiert.

3.4.2 Analyse nichtkodierender Bereiche

Die postulierte Ribosomenbindestelle von *aldA*:

Eine potentielle Ribosomenbindestelle konnte in *P. putida* GJ31 in dem für *Pseudomonas putida* typischen Abstand zum Startcodon von *aldA* ermittelt werden (**Tab. 3.4.2**).

Tab. 3.4.2: Die postulierte Ribosomenbindestellen stromaufwärts von *aldA* bei *P. putida* GJ31.

Leserahmen	Sequenz der Ribosomenbindestelle
<i>aldA</i>	TTTGCTCTACGCTTTCCA ACTCCCTAACAAACACAATAGCCAGGAGACACACCATG
16S-rRNA	3´-UCUUUCCUCCACUA-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

Die potentielle Promotorregion vor *aldA*:

Im Promotorbereich von *aldA* konnte ein *E. coli*-ähnlicher σ^{70} -Faktor abhängiger Promotor P_A ermittelt werden. Die potentielle Promotorregion lag in *P. putida* GJ31 261 bp stromaufwärts von dem Startcodon von *aldA*.

```

-35                        -10                                ⤴
GACGGTATGGACTTGCTGGGCATGGCGACTGAAATGATTGCTCTGCATTGTTGTAGTTCTCCGCAGA
TAGAGAGTCTCGCCAGCATCCTCCACCGGGAAGGCTTGCAATGCACCCTCCGGTTACGTGTCTGCAAAA
TGGCACAAAGTGTCAACCCCTGCGCGTACCGGCGCTGGCAGAGATCGTGGGCCAGGCCCAAAGAAC
CGAGCCAAGTCATTGATTTACCTGGCGCTCGAAACGCTGGCCCAACCTTTGCTCTACGCTTTCCAAC
TCCCTAACAAACACAATAGCCAGGAGACACACCATG

```

Abb. 3.4.2: Potentielle Promotorregion stromaufwärts von *aldA* in *P. putida* GJ31. Die -35-Region und die -10-Region sind grau hinterlegt. Der hier durch Neural Network Promotor Prediction (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) errechnete Startpunkt der Translation liegt 261 Nukleotide vor dem Beginn des Startcodons und ist fett gedruckt und durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Startcodon von *aldA* ist mit einer Welle unterstrichen

3.4.3 Analyse kodierender Bereiche - das Genprodukt AldA

Der offene Leserahmen *aldA* (GC-Gehalt 62,5%) kodiert für 507 Aminosäuren. Nach Sequenzvergleichen konnte eine Ähnlichkeit von 88% der Aminosäuresequenz mit AldA, der Acetaldehyd-Dehydrogenase aus *P. putida* KT2440, festgestellt werden. Die Proteinsequenz von AldA aus *P. putida* GJ31 ist zu 65-67% identisch mit Proteinsequenzen von Chloracetaldehyd-Dehydrogenasen (u.a. Bergeron *et al.*, 1998) aus NCBI-Datenbanken (siehe **Tab.** 3.4.3.1). Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz hat AldA aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 55,1 kDa.

Tab. 3.4.3.1: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit AldA aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit AldA in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. putida</i> KT2440	NP_742708.1	88	92
<i>P. putida</i> KT2440	NP_744824.1	86	89
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	ZP_00137465.1	84	91
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	NP_252711.1	84	90
<i>P. fluorescens</i> PfO-1	ZP_00086869.1	84	89
<i>Azotobacter vinelandii</i>	ZP_00088576.1	82	89
* <i>X. citii</i> 306	NP_640485.1	67	79
* <i>X. camprestri</i> ATCC33903	NP_635496.1	67	78
* <i>X. camprestri</i>	AAC13641.1	64	77
* <i>X. autotrophicans</i>	AAC13644.1	65	76

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren an. Bekannte Chloracetaldehyd-Dehydrogenasen sind zur Unterscheidung von (Acet-)aldehyd Dehydrogenasen mit einem * markiert.

Es handelt sich bei der hier aus *P. putida* GJ31 amplifizierten putativen Chloracetaldehyd-Dehydrogenase AldA nach Sequenzvergleichen und Motivanalyse durch BLAST um eine CoenzymA-unabhängige, NADH-abhängige Acetaldehyd-Dehydrogenase (Acylyating, E.C. 1.2.1.-). Diese Enzymfamilie beinhaltet folgende typischen Mitglieder: Aldehyd-Dehydrogenasen E.C.:1.2.1.3, Succinatsemialdehyd-Dehydrogenasen E.C.:1.2.1.16, Lactaldehyd-Dehydrogenase E.C.:1.2.1.22, Benzaldehyd-Dehydrogenasen E.C.:1.2.1.28, Methylmalonatsemialdehyd-Dehydrogenasen E.C.:1.2.1.27, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasen E.C.:1.2.1.9, Delta-1-pyrroline-5-carboxylat-Dehydrogenasen E.C.: 1.5.1.12, Acetaldehyd-Dehydrogenasen E.C.:1.2.1.10, Glutamat-5-semialdehyd-Dehydrogenasen

E.C.:1.2.1.41. Diese Familie beinhaltet auch Omega Crystallin, ein Augenlinsenprotein aus Tintenfisch and Octopus, das eine geringe Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität hat.

Welches Substratspektrum AldA aus *P. putida* GJ31 aufweist, sollte an Hand von Enzymtests ermittelt werden. Zur Überprüfung der Aktivität wurde *aldA* mittels PCR (Material und Methoden 2.3.16) unter Verwendung der Primer aldMod-1 und aldMod-2 mit modifizierten *NdeI* und *BamHI*-Schnittstellen amplifiziert. Das Produkt wurde zur Expression in pJOE2702 ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Es wurden Enzymtests nach Shingler *et al.* (1992) mit dem Rohextrakt des so erhaltenen Expressionsstammes *E. coli* DH5 α KF71 und den Substraten Chloracetaldehyd und Acetaldehyd durchgeführt (Material und Methoden 2.2.13). Außerdem wurde die CoA-Abhängigkeit der Reaktion im Enzymtest untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4.3.2 zusammengefasst. Als Negativkontrolle diente *E. coli* DH5 α .

Tab. 3.4.3.2: Aktivität der (Chlor)-Acetaldehyd-Dehydrogenase im Rohextrakt von *E. coli* DH5 α KF71 in U/g Protein.

Substrat	Aktivität in U/g Protein	
	Test mit CoA	Test ohne CoA
Acetaldehyd	140	279
Chloracetaldehyd	183	338

Erläuterungen: Der Enzymtest erfolgte wie unter Material und Methoden 2.2.13 beschrieben. *E. coli* DH5 α KF71 ist der Expressionsstamm für AldA aus *P. putida* GJ31.

Mit dem Rohextrakt aus der Negativkontrolle *E. coli* DH5 α konnte unter keiner der getesteten Bedingungen (CoA-Zugabe bzw. ohne CoA) Aktivität für eine (Chlor)-Acetaldehyd-Dehydrogenase festgestellt werden.

3.5 Der *benRXABC*-Cluster aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31*

P. putida GJ31 wächst nicht auf 3-Chlorbenzoat. *P. putida* GJ31* wurde durch 3-Chlorbenzoat-Selektion aus *P. putida* GJ31 erhalten (siehe Experimente und Ergebnisse 3.3.1). Mit ganzen Zellen von *P. putida* GJ31 war festgestellt worden, dass Benzoat umgesetzt wird (Zerlin, 2002). Es wurde vermutet, dass eine Veränderung in der Nukleotidsequenz des Benzoat-Dioxygenase-Clusters die Ursache für die Fähigkeit von *P. putida* GJ31* zum Wachstum auf 3-Chlorbenzoat sein könnte. Deshalb sollte der Benzoat-Abbau-Cluster auch in *P. putida* GJ31* untersucht werden. Aus diesem Grund wurden alle Schritte zur Amplifizierung bei beiden Stämmen parallel durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war, den Gen-Cluster zu finden, der für die Enzyme des Benzoat-Abbaus in *P. putida* GJ31 kodiert.

3.5.1 Klonierungsstrategie zur vollständigen Sequenzierung

Nach Vergleich verschiedener Nukleotidsequenzen von Benzoat-Dioxygenase-Untereinheiten-A wurden auf Grundlage der Sequenz von *P. putida* (NCBI Acc. No. AAF63448.2) die Primer Kay8 und Kay9 generiert. Diese Primer erbrachten, eingesetzt in eine PCR mit der Gesamt-DNA von *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31*, jeweils das Produkt mit der errechneten Größe (902 bp). Die PCR-Produkte wurden blunt-end in den Vektor pPCR script Amp SK(+) ligiert (pKF1 bzw. pKF3) und sequenziert. Von der 902 bp großen Sequenz ausgehend, wurden Genom Walk Schritte stromabwärts und stromaufwärts mit genspezifischen Primern und DNA-Bibliotheken von *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* begonnen (siehe **Tab.** 3.5.1).

Um einen zweiten Anker in der Nukleotidsequenz des Benzoat-Dioxygenase-Clusters zu bekommen, wurden verschiedener Nukleotidsequenzen von Benzoat-Dioxygenase-Regulatoren zur Erzeugung zwei Primer genutzt. Dies waren die Primer benR-1 und benR-2, die auf Grundlage der Nukleotidsequenz von *P. putida* KT2440 (NCBI Acc. No. NP_745303.1) erstellt wurden. Eingesetzt in eine PCR mit Gesamt-DNA der beiden Stämme GJ31 und GJ31* wurde mit ihnen das gewünschte Produkt mit der errechneten Größe von 618 bp erhalten. Die PCR-Produkte wurden blunt-end in den Vektor pPCR script Amp SK(+) ligiert (pKF27 bzw. pKF29) und sequenziert. Von der 618 bp großen Sequenz ausgehend, wurden Genom Walk Schritte stromaufwärts mit genspezifischen Primern und DNA-Bibliotheken von *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* begonnen (siehe **Tab.** 3.5.1).

Tab. 3.5.1: Übersicht der mittels Genom Walk erhaltenen PCR-Produkte.

Vektor		Primer 1. PCR	Primer 2. PCR	Gen-Bibliothek aus Gesamt DNA	
Bezeichnung	Insert [bp]	mit AP1	mit AP2	hydrolysiert mit	
				<i>P. putida</i> GJ31	<i>P. putida</i> GJ31*
pKF10 ^a	441	GSP1A	GSP2A	<i>AseI</i>	
pKF11 ^a	582	GSP1A	GSP2A		<i>SspI</i>
pKF13 ^a	755	GSP1B	GSP2B	<i>PvuII</i>	
pKF14 ^a	357	GSP1B	GSP2B	<i>StuI</i>	
pKF15 ^a	756	GSP1B	GSP2B		<i>PvuII</i>
pKF46 ^b	487	GSPbenRupI-1	GSPbenRupI-2	<i>EcoRV</i>	
pKF48 ^b	589	GSPbenRupI-1	GSPbenRupI-2		<i>Ec.oRV</i>
pKF59 ^b	886	GSPbenRupII-1	GSPbenRupII-2	<i>AseI</i>	

Vektoren: a: pPCR script Amp SK(+) (*SrfI* geschnitten), b: pCR[®] 4Blunt-TOPO[®], mit dem jeweiligen Insert ligiert.

Um den Lückenschluss zwischen den Bereichen um *benR* und *benAB* zu vollziehen, wurden zwei Primer auf Grundlage der bisher sequenzierten Teilstücke generiert. Die PCR mit den Primern Kay29 und Kay30 erbrachte mit Gesamt DNA aus *P. putida* GJ31 ein 1972 bp großes Produkt pKF43, das die Nukleotidsequenz der Gene *benX* komplett und von *benR* und *benA* in Teilen enthielt. Mit Gesamt-DNA aus Stamm GJ31* wurde das 1972 bp große Produkt pKF44 gewonnen. Die größte Ähnlichkeit der sequenzierten Teilstücke des Genclusters *benR* und *benA* aus *P. putida* GJ31 war mit dem Benzoat-Dioxygenase-Cluster aus *P. putida* KT2440 (NCBI Acc. No. NP_745303.1) festzustellen.

Weitere Bereiche des Benzoat-Dioxygenase-Clusters stromabwärts von *benB* sollten zusätzlich mittels PCR und dem Primerpaar KTbenBC-1 und KTbenBC-2 (*benBC*) amplifiziert werden. Grundlage zur Generierung der Primer war die Nukleotidsequenz von *P. putida* KT2440. Die Primerpaare lieferten mit Gesamt-DNA aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* jeweils die gewünschten PCR-Produkte (pKF25 bzw. pKF31) mit der errechneten Größe von 1020 bp.

Es wurden in *P. putida* GJ31 insgesamt rund 5,9 kbp und in *P. putida* rund 5,1 kbp des *benRXABC*-Clusters sequenziert.

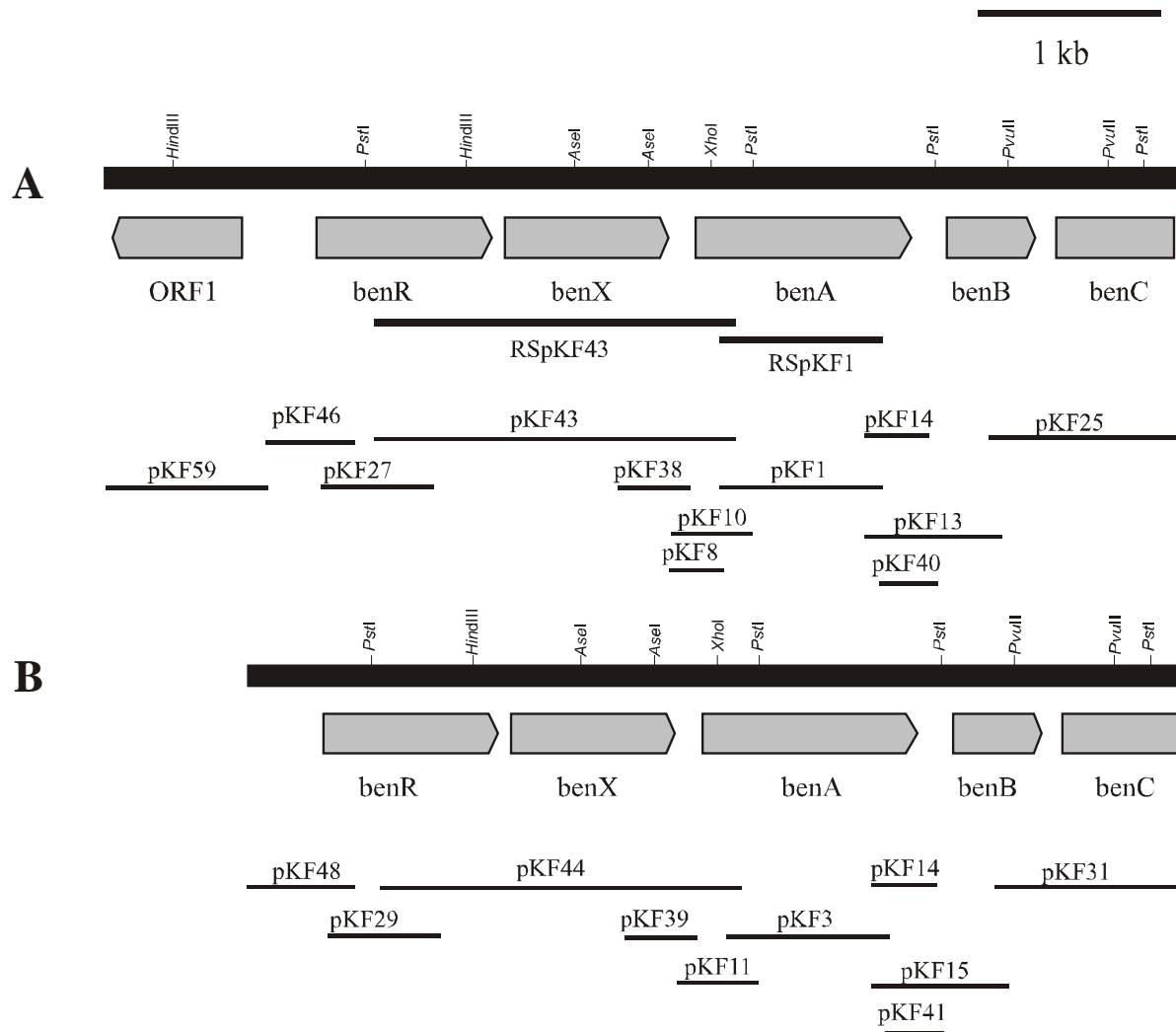


Abb. 3.5.1: Organisation des *benRXABC*-Clusters in *P. putida* GJ31 (A) und *P. putida* GJ31* (B). Gezeigt ist die zur Sequenzierung verwendete Klonierungsstrategie, sowie wichtige Restriktionsschnittstellen. Die dicken schwarzen Balken kennzeichnen die zur Lagefestellung verwendeten radioaktiven Sonden RSpKF43 und RSpKF1. Die gesamte Darstellung ist maßstabgetreu. Genbezeichnungen und die zugehörigen Enzymbezeichnungen: ORF: offener Leserahmen mit unbekannter Funktion, *benR*: Benzoat-Dioxygenase Regulator, *benX*: offener Leserahmen mit unbekannter Funktion, *benA*: Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-A, *benB*: Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-B, *benC*: Benzoat-Dioxygenase-Ferredoxin-Reduktase.

Zur genaueren Überprüfung zweier Sequenzbereiche, einem möglichen Promotorbereich stromaufwärts von *benA* und dem Sequenzbereich stromabwärts von *benA*, wurden auf Grundlage der Nukleotidsequenz von *P. putida* GJ31 zwei Primerpaare generiert. Das Primerpaar Kay25 und Kay26 lieferte mit der Gesamt-DNA der beiden Stämme GJ31 und GJ31* jeweils ein 395 bp großes Produkt (pKF38 bzw. pKF39) stromaufwärts von *benA*. Das Primerpaar Kay27 und Kay28 lieferte mit der Gesamt-DNA der beiden Stämme GJ31 und GJ31* jeweils ein 357 bp großes Produkt (pKF40 bzw. pKF41) stromabwärts von *benA*.

3.5.2 Lage auf pKW1 und pKW2

Aus den beiden Stämmen *P. putida* GJ31 und GJ31* wurde Plasmid-DNA isoliert (Material und Methoden 2.3.9) und einer Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *DraI*, *AseI* und *MluI* unterworfen. Vorversuche hatten erkennen lassen, dass diese drei Enzyme über vergleichsweise wenige Schnittstellen auf dem Plasmid pKW1 verfügen und somit relativ wenige Fragmente in der Größenordnung bis ca. 50 kbp produzieren.

Die Hybridisierung der hydrolysierten Plasmid-DNA erfolgte mit der homologen radioaktiv markierten Sonde RSpKF43. Sie wurde als PCR-Produkt mit dem Primern Kay29 und Kay30 erhalten und kodiert für einen Teil des *benRXABC*-Clusters (*benRXA*).

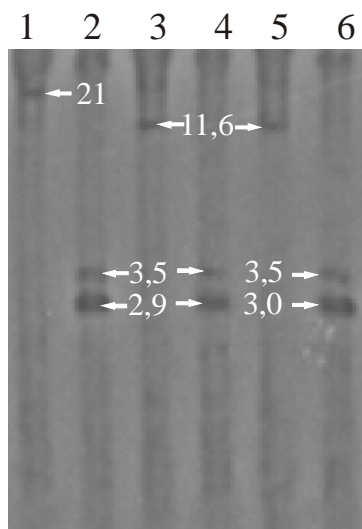


Abb. 3.5.2.1: Autoradiogramm der Hybridisierung hydrolysierten Plasmid-DNA von pKW1 mit der radioaktiv markierten Sonde RSpKF43. Die Hydrolyse erfolgte jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *DraI*, *AseI* und *MluI* sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander. Als homologe radioaktiv markierte Sonde RSpKF43 diente das PCR-Fragment (Primer Kay29 und Kay30), welches für einen Teil des *ben*-Clusters kodiert (*benRXA*). Die ungefähre Größe der hybridisierten Fragmente ist jeweils auf gleicher Höhe in [kbp] angegeben (weiße Schrift). Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über ein 0,7%iges Agarosegel.

Die Spurenbelegung war wie folgt:

1. pKW1, hydrolysiert mit *DraI*
2. pKW1, hydrolysiert mit *AseI*
3. pKW1, hydrolysiert mit *MluI*
4. pKW1, hydrolysiert mit *DraI* und *AseI*
5. pKW1, hydrolysiert mit *DraI* und *MluI*
6. pKW1, hydrolysiert mit *AseI* und *MluI*

Das Autoradiogramm der Hybridisierung der Sonde RSpKF43 mit *AseI*-Fragmenten der Plasmid-DNA aus *P. putida* GJ31 (Abb. 3.5.2.1) zeigt zwei Banden mit den Größen 3,5 und 2,9 kbp. Durch Vergleich der Nukleotidsequenz des *benRXABC*-Clusters mit der Restriktionskartierung (Material und Methoden 2.3.22) kann angenommen werden, dass es sich bei diesen beiden Banden um die *AseI*-Fragmente handelt, die für ORF1-*benRX* und *benXABC* kodieren. Der jeweilige zweite Schnitt liegt außerhalb des sequenzierten Bereiches. Das 424 bp große Zwischenstück, ein *AseI*-*AseI*-Fragmente (*benX*), konnte nicht detektiert werden.

Der *benRXABC*-Cluster auf pKW1 ist auf einem 21 kbp großen *DraI* bzw. einem 11,6 kbp großen *MluI*-Fragment lokalisiert.

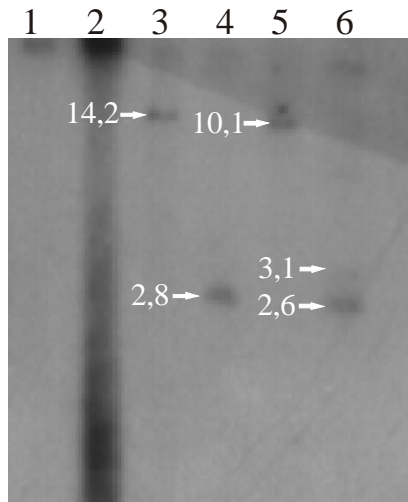


Abb. 3.5.2.2: Autoradiogramm der Hybridisierung hydrolysiertes Plasmid-DNA von pKW2 mit der radioaktiv markierten Sonde RSpKF43. Die Hydrolyse erfolgte jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *DraI*, *AseI* und *MluI* sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander. Als homologe radioaktiv markierte Sonde RSpKF43 diente das PCR-Fragment (Primer Kay29 und Kay30), welches für einen Teil des *ben*-Clusters kodiert (*benRXA*). Die ungefähre Größe der hybridisierten Fragmente ist jeweils auf gleicher Höhe in [kbp] angegeben (weiße Schrift). Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über ein 0,7%iges Agarosegel.

Die Spurenbelegung war wie folgt:

1. pKW2, hydrolysiert mit *DraI*
2. pKW2, hydrolysiert mit *AseI*
3. pKW2, hydrolysiert mit *MluI*
4. pKW2, hydrolysiert mit *DraI* und *AseI*
5. pKW2, hydrolysiert mit *DraI* und *MluI*
6. pKW2, hydrolysiert mit *AseI* und *MluI*

Der Vergleich des Autoradiogramms der Hybridisierung der hydrolysierten Plasmid-DNA von pKW1 und pKW2 mit der homologen radioaktiv markierten Sonde RSpKF43 (Abb. 3.5.2.1 und 3.5.2.2) zeigt folgende Unterschiede auf:

Zum einen ist das *MluI-MluI*-Fragment aus pKW2 mit 14,2 kbp etwas größer als das vergleichbare Fragment aus pKW1 (11,2 kbp). Außerdem wird das 14,2 kbp große *MluI*-Fragment bei der Hydrolyse mit *DraI* auf 10,1 kbp verkleinert, während dieses Fragment aus pKW1 bei der kombinierten Hydrolyse mit *MluI* und *DraI* seine Größe beibehält. Weiterhin sind bei den beiden *AseI*-Fragmenten geringfügige Unterschiede in der Größe zu beobachten.

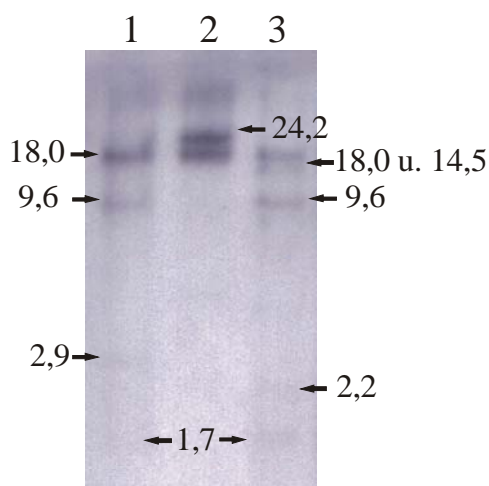


Abb. 3.5.2.3: Autoradiogramm der Hybridisierung hydrolysiertes Plasmid-DNA von pKW1 mit der radioaktiv markierten Sonde RSpKF1. Die Hydrolyse erfolgte jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander. Als homologe radioaktiv markierte Sonde RSpKF1 diente das PCR-Fragment (Primer Kay8 und Kay9), welches für einen Teil von *benA* kodiert. Die ungefähre Größe der hybridisierten Fragmente ist jeweils auf gleicher Höhe in [kbp] angegeben (weiße Schrift). Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über ein 0,7%iges Agarosegel.

Die Spurenbelegung war wie folgt:

1. pKW1, hydrolysiert mit *EcoRI*
2. pKW1, hydrolysiert mit *HindIII*
3. pKW1, hydrolysiert mit *EcoRI* und *HindIII*

Diese Indizien lassen vermuten, dass es in der Umgebung des *benRXABC*-Clusters auf dem Plasmid pKW1 bei der Entstehung von *P. putida* GJ31* aus *P. putida* GJ31 Veränderungen gegeben hat.

Für pKW1 wurde ein weiteres Autoradiogramm der Hybridisierung der hydrolysierten Plasmid-DNA mit der homologen radioaktiv markierten Sonde RSpKF1 erstellt (Abb. 3.5.2.3). Hier wurden die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* einzeln und in Kombination verwendet. Ziel war es, zu überprüfen, ob weitere Benzoat-Dioxygenasen auf pKW1 liegen. Aus diesem Grund wurde eine Sonde eingesetzt, die nur für Bereiche der Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-A kodiert. So sollte es möglich sein, auch Fragmente mit Genen zu markieren, die keine vollständige *benRXA*-Sequenz, wie in dem hier untersuchten Cluster, enthalten. Deshalb wurde neben der kleineren Sonde RSpKF1, kodierend für *benA*, die Enzyme *EcoRI* und *HindIII* ausgenutzt, um eine höhere Anzahl von Fragmenten von pKW1 zu produzieren.

Das Autoradiogramm deutet an, dass es mindestens zwei, wahrscheinlich sogar drei oder vier Benzoat-Dioxygenase-UntereinheitenA ähnlich zu *benA*, auf pKW1 gibt. Sie liegen auf *HindIII*-Fragmenten der Größe 24,2 und 18 kbp bzw. *EcoRI* Fragmenten der Größe 18, 9,6 und 2,9 sowie 1,7 kbp. Auf Grund der geringen Intensität der kleinen Banden (2,9 und 1,7 kbp) kann vermutet werden, dass es sich evtl. um einen *EcoRI*-Schnitt innerhalb eines einzigen Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-A-Gens handelt und die Sonde beide Fragmente markiert hat.

Durch Vergleich der Nukleotidsequenz des *benRXABC*-Clusters mit der Restriktionskartierung (Material und Methoden 2.3.22) kann angenommen werden, dass es sich bei diesen beiden Banden nicht um Fragmente aus dem in dieser Arbeit sequenzierten *benRXABC*-Cluster in *P. putida* GJ31 handelt.

Es scheint zudem möglich, dass das 24,2 kbp *HindIII*-Fragment zwei Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-A-Gene trägt, da im Doppelverdau mit *HindIII* und *EcoRI* ein *EcoRI*-Fragment mit 18 kbp und ein *HindIII-EcoRI*-Fragment mit 14,5 kbp zusammen diese Größe ergeben.

3.5.3 Analyse nichtkodierender Bereiche

Die postulierte Ribosomenbindestelle im *ben*-Cluster

Eine potentielle Ribosomenbindestelle konnte in dem für *Pseudomonas putida* typischen Abstand zum Startcodon der offenen Leserahmen im *ben*-Cluster aus *P. putida* GJ31 sowie *P.*

putida GJ31* ermittelt werden (Tab. 3.5.3.1). Diese Sequenzbereiche waren in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* gleich.

Tab. 3.5.3.1: Gegenüberstellung der postulierten Ribosomenbindestellen des *benRXABC*-Clusters bei *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31*.

Leserahmen	Sequenz der Ribosomenbindestelle
<i>benR</i>	TCCCTAACAAACACAATAGCCAGGAGACACACCATG
<i>benX</i>	CCATCATTTTTTCCATCTCGGAGAAATG
<i>benA</i>	GTCTAAACAATAACAAGGGAGACCCTGGCCATG
<i>benB</i>	GCCTTGAAGGATGAACAGCAACTGATCCCCGTGGAGGCTGTGCAATG
<i>benC</i>	CCGTGGCCCGGCTCGCCCGCGAGGTGCAACATG
16S-rRNA	3´-UCUUUCCUCCACUA-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

In der postulierten Ribosomenbindestelle stromaufwärts von *benA* in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* konnten durch Sequenzvergleiche keine Unterschiede in der Nukleotidsequenz festgestellt werden. Somit konnte eine mögliche Erklärung für den Unterschied von *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31*, verworfen werden.

Tab. 3.5.3.2: Gegenüberstellung der postulierten Ribosomenbindestellen upstream von *benA* bei *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31*.

Leserahmen	Sequenz der Ribosomenbindestelle
GJ31	AAACAATAACAAGGGAGACCCTGGCCATG
GJ31*	AAACAATAACAAGGGAGACCCTGGCCATG
16S-rRNA	3´-UCUUUCCUCCACUA-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.

Die potentielle Promotorregion vor *benR* und *benA*

Im Promotorbereich von *benR* und *benA* zwei *E. coli*-ähnliche σ^{70} -Faktor abhängige Promotoren (P_{BR} und P_{BA}) ermittelt werden.

Die potentielle Promotorregion lag in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* 390 bp stromaufwärts von dem Startcodon von *benR* (Abb. 3.5.3.1).

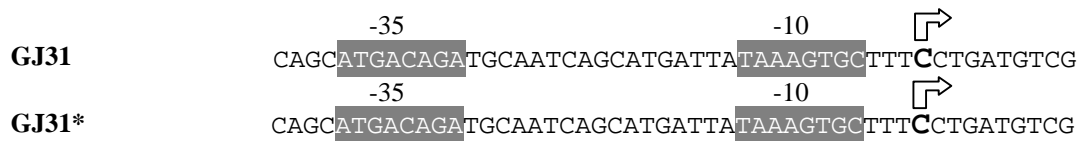


Abb. 3.5.3.1: Potentielle Promotorregion stromaufwärts von *benR* in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* im Vergleich. Die -35-Region und die -10-Region sind grau hinterlegt. Der durch Neural Network Promotor Prediction (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) errechnete Startpunkt der Translation liegt 390 Nukleotide vor dem Beginn des Startcodons und ist fett gedruckt und durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die potentielle Promotorregion stromaufwärts von *benA* lag in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* jeweils 56 bp vor dem Startcodon von *benA* (**Abb. 3.5.3.2**).

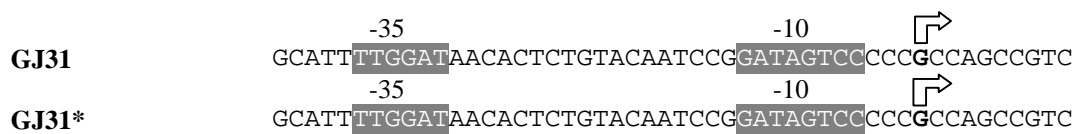


Abb. 3.5.3.2: Potentielle Promotorregionen stromaufwärts von *benA* in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* im Vergleich. Die -35-Region und die -10-Region sind grau hinterlegt. Der durch Neural Network Promotor Prediction (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) errechnete Startpunkt der Translation liegt 56 Nukleotide vor dem Beginn des Startcodons und ist fett gedruckt und durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Promotorregionen und potentiellen Ribosomenbindestellen stromaufwärts von *benR* und *benA* in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* stimmen in ihren Nukleotidsequenzen überein. Auch hier wurde kein Unterschied in der Nukleotidsequenz gefunden, der den phänotypischen Unterschied von *P. putida* GJ31 und Stamm GJ31* auf genetischer Ebene erklären würde.

3.5.4 Analyse kodierender Bereiche in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31*

3.5.4.1 ORF1 aus *P. putida* GJ31

Der offene Leserahmen ORF1 (GC-Gehalt 48%) kodiert für 237 Aminosäuren und besitzt keinerlei Ähnlichkeit mit Proteinsequenzen der Datenbanken. Eine Datenbanksuche mit BLAST (Material und Methoden 2.3.22) war ohne Erfolg. Auf Grundlage der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz, hat das Genprodukt aus ORF1 aus *P. putida* GJ31 ein berechnetes Molgewicht von 26,36 kDa.

3.5.4.2 Das Genprodukt BenR

Der offene Leserahmen *benR* (GC-Gehalt 60,2% in *P. putida* GJ31 und 60,4% in *P. putida* GJ31*) kodiert für jeweils 318 Aminosäuren. Die Nukleotidsequenzen von *benR* aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* unterscheiden sich in zwei Positionen. Auf Grund der

Mutation von Adenin zu Guanin und eines Thymins zu Cytosin jeweils von Stamm GJ31 zu seinem Abkömmling Stamm GJ31*, ist die Aminosäuresequenz der Regulatorgene unterschiedlich (siehe **Abb. 3.5.4.2.1**). Statt Isoleucin-Tyrosin (Position 75-76) in BenR aus *P. putida* GJ31 und dem nächst verwandten Benzoat-Regulatorprotein BenR aus *P. putida* KT2440 finden sich nun die Aminosäuren Valin-Histidin in BenR aus *P. putida* GJ31* in den Positionen 75-76 (markiert in **Abb. 3.5.4.2.1-A**).

A

```

BenR_GJ31      MESRLLSERSSVFHHADPYAVSDYVNQHVQGHCIGLSRTTHPQASLSHRKFAELDLCRIS
BenR_GJ31*    MESRLLSERSSVFHHADPYAVSDYVNQHVQGHCIGLSRTTHPQASLSHRKFAELDLCRIS
BenR_KT2440   MESRLLSERSSVFHHADPYAVSDYVNQHVQGHCIGLSRTTHPQASLSHRKFAELDLCRIS
*****

BenR_GJ31      YGGSVRVTSPALETIVHLQVLLNGNCLWRGHKREHHLVPGELLLINPDDPVDLTYSEDCE
BenR_GJ31*    YGGSVRVTSPALETIVHLQVLLNGNCLWRGHKREHHLVPGELLLINPDDPVDLTYSEDCE
BenR_KT2440   YGGSVRVTSPALETIVHLQVLLNGNCLWRGHKREHHLVPGELLLINPDDPVDLTYSEDCE
*****:*****:*****

BenR_GJ31      KFILKVPTRLLDSTCDEQRWHRPDGGVRFRLRNHYRLDELDFVNLLAMVCQEAEVSDSLP
BenR_GJ31*    KFILKVPTRLLDSTCDEQRWHRPDGGVRFRLRNHYRLDELDFVNLLAMVCQEAEVSDSLP
BenR_KT2440   KFILKVPTRLLDSTCDEQRWHRPDGGVRFRLRNHYRLDELDFVNLLAMVCHEAEVSDSLP
*****:*****:*****

BenR_GJ31      RVQGHYSQIVASKLLTLMSTNIRRESLSAPQAGLERILEYIERNLKLELSAEVLAEQACM
BenR_GJ31*    RVQGHYSQIVASKLLTLMSTNIRRESLSAPQAGLERILEYIERNLKLELSAEVLAEQACM
BenR_KT2440   RVQGHYSQIVASKLLTLMSTNIRRESLSAPQAGLERILDYIERNLKLELSAEVLAEQACM
*****:*****

BenR_GJ31      SLRSLYALFDQHLGTTPKHYIRQRKLERVHACLNDPTCGVRSVTEALDYGFHLHGRFSE
BenR_GJ31*    SLRSLYALFDQHLGTTPKHYIRQRKLERVHACLNDPTCGVRSVTEALDYGFHLHGRFSE
BenR_KT2440   SLRSLYALFDQHLGITPKHYVRQRKLERVHACLSDPTCGVRSVTEALDYGFHLHGRFSE
*****:*****

BenR_GJ31      VYRQQFGELPSQTFKRRG
BenR_GJ31*    VYRQQFGELPSQTFKRRG
BenR_KT2440   IYRQQFGELPSQTFKRRA
*****

```

B

```

benR_GJ31 181 TACGGCGGCAGCGTGCGCGTTACCTCGCCGGCACTGGAAACCATCTACCACCTGCAGGTG 240
benR_GJ31* TACGGCGGCAGCGTGCGCGTTACCTCGCCGGCACTGGAAACCATCCACCACCTGCAGGTG
benR_KT2440 TACGGCGGCAGCGTGCGCGTTACCTCGCCGGCACTGGAAACCATCTACCACCTGCAGGTG
*****

```

Abb. 3.5.4.2.1: A Proteinsequenz von BenR aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* im Vergleich zu BenR aus *P. putida* KT2440. **B** Nukleotidsequenz-Ausschnitt von *benR* aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31*. Gezeigt sind die Basenpaare 181-240 aus *benR*, in denen die beiden Mutationen der Sequenz enthalten sind. Die jeweiligen Veränderungen in den Nukleotid- wie Proteinsequenzen sind grau hinterlegt und in weißer Schrift gehalten. Erläuterungen: *: Übereinstimmung der Aminosäuren, :: strukturell sehr ähnliche Aminosäuren, .: strukturell ähnliche Aminosäuren. Aminosäuresequenzen: BenR_GJ31 (*P. putida* GJ31, diese Arbeit), BenR_GJ31* (*P. putida* GJ31*, diese Arbeit), BenR_KT2440 (*P. putida* KT2440, NCBI Acc. No. NP_745303, Nelson *et al.*, 2002). Nukleotidsequenzen: benR_GJ31 (*P. putida* GJ31, diese Arbeit), benR_GJ31* (*P. putida* GJ31*, diese Arbeit), benR_KT2440 (*P. putida* KT2440, NCBI Acc. No. NC_002947, Nelson *et al.*, 2002).

Es konnte eine Ähnlichkeit von 96% der Aminosäuresequenz von BenR aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* mit BenR, dem Regulator des Benzoatabbau-Clusters aus *P. putida*

KT2440, festgestellt werden. BenR aus *P. putida* GJ31 hat ein berechnetes Molgewicht von 36,42 kDa während das von BenR aus *P. putida* GJ31* 36,38 kDa ist.

Das Regulatorprotein BenR gehört zur Klasse der AraC/XylS-Regulatoren (Burke und Wilcox, 1987; Ramos *et al.*, 1990, 1997a, 1997b; Gallegos *et al.*, 1993). Diese Klasse der Regulatoren verfügt über eine stark konservierte Region von ungefähr 99 Aminosäuren. Es handelt sich dabei um zwei α -Helix-Turn- α -Helix-Motive (HTH-Motive).

Tab. 3.5.4.2.1: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit BenR aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31*.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit BenR in [%] aus ...			
		Identische		Homologe	
		GJ31	GJ31*	GJ31	GJ31*
<i>P. putida</i> KT2440	NP_745303.1	96	96	98	98
<i>P. putida</i>	AAF634471	95	95	97	97
<i>P. fluorescens</i> PfO-1	ZP_00263036.1	79	79	88	88
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	NP_251209.1	63	63	76	76
<i>P. putida</i> MT53	AAA26032.1	62	61	76	76
<i>P. putida</i> MT53	AAA70302.1	61	60	75	75
<i>P. putida</i>	AAA84989.1	61	60	75	75
<i>P. putida</i>	NP_542858.1	60	60	75	75
<i>Pseudomonas</i> sp. ST41	AAT09784.1	60	59	75	75
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AAO19124.1	60	59	75	75

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

Vermutlich handelt es sich bei dem ersten HTH-Motiv um die DNA-Bindestelle zur Erkennung von verschiedenen DNA Ziel-Sequenzen (Promotorbereich) und bei dem zweiten HTH-Motiv um eine allgemeine Funktion aller Mitglieder der AraC/XylS-Familie, zum Beispiel den Kontakt zum Transkriptionssystem (Gallegos *et al.*, 1997).

Durch einen Aminosäuresequenzvergleich mit verschiedenen Regulatoren (AraC, XylS, XylR und BenR) konnte festgestellt werden, dass die beiden bekannten Sequenzen von BenR aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* den *benR*-Regulatoren fast identisch und vielen XylS-Regulatorproteinen sehr ähnlich sind. Dies gilt insbesondere für XylS-Proteine aus Pseudomonaden. Dagegen ist die Ähnlichkeit zur AraC- und XylR-Regulatorproteinen wesentlich geringer.

Die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen von *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* liegen in dem HTH-Motiv, das möglicherweise als DNA-Bindestelle zur Erkennung von

verschiedenen DNA-Ziel-Sequenzen dient. Deshalb ist es denkbar, dass diese Mutation die Ursache für die phänotypische Veränderung von *P. putida* GJ31* im Vergleich zu dem Wildstamm GJ31 sein kann.

BenR_GJ31	MESRLLSERSSVFHHADPYAVSDYVNVQHVHGQHCIGLSRTHPQASLSHRKFAE	LDL	CRIS
BenR_GJ31*	MESRLLSERSSVFHHADPYAVSDYVNVQHVHGQHCIGLSRTHPQASLSHRKFAE	LDL	CRIS
BenR_KT2440	MESRLLSERSSVFHHADPYAVSDYVNVQHVHGQHCIGLSRTHPQASLSHRKFAE	LDL	CRIS
benR_Pp	MESRLLSERSSVFHHADPYAVSDYVNVQHVHGQHCIGLSRTHPQASLSHRKFAE	LDL	CRIS
BenM_P111	MNASLLSERSRVFERADPYAVSGYVNRHVGTCHIRLPAAGRPAQSLDHRTFAS	LDL	CRIS
XylS_P.putida	MDFCLLNEKSQIFVHAEPEYAVSDYVNVQVVGTHSIRLPKGGRPAGRLHHRIFGC	LDL	CRIS
	*: *:*:* :* :*:*****.***::** *. * . :* . * * * * . *****		
BenR_GJ31	YGGSVRVTSAPLET	YH	QLVLLNGNCLWRGHKREHHLVPGELLLINPDDPVDLTYS
BenR_GJ31*	YGGSVRVTSAPLET	VH	HLQVLLNGNCLWRGHKREHHLVPGELLLINPDDPVDLTYS
BenR_KT2440	YGGSVRVTSAPLET	YH	QLVLLNGNCLWRGHKREHHLVPGELLLINPDDPVDLTYS
benR_Pp	YGGSVRVTSAPLET	YH	QLVLLNGNCLWRGHKREHHLVPGELLLINPDDPVDLTYS
BenM_P111	YGAAVRVTSAPLES	IF	HLQILLRGHCLWRGGQEHALAPGELLLINPDDPVDLTYS
XylS_P.putida	YGGSVRVISPGLET	CV	HLQIILKGHCLWRGHGQEHYFAPGELLLINPDDQADLTYS
	.:* *:*:* :***::*:*:***** :*: :.*****:*** .***** **		
BenR_GJ31	KFILKVPTRLLDSTCDEQRWHRPDGGVFRFLRNHYRLDELDGFVNLLAM	VCQEA	EVSDSLP
BenR_GJ31*	KFILKVPTRLLDSTCDEQRWHRPDGGVFRFLRNHYRLDELDGFVNLLAM	VCQEA	EVSDSLP
BenR_KT2440	KFILKVPTRLLDSTICDEQRWQRPDGGVFRFLRNHYRLDELDGFVNLLAM	VCH	EAEVSDSLP
BenR_Pp	KFILKVPTRLLDSTICDEQRWQRPDGGVFRFLRNHYRLDELDGFVNLLAM	VCH	EAEVSDSLP
BenM_P111	KFIVKLPICALLEAICAEQRWVHPARGVFRFLRHYRLDQLEGFVGLLAL	VCREA	ESGERLA
XylS_P.putida	KFIVKLPVSVLDRACSDNNWHKPREGIRFAARHN-LQQLDGFINLLGL	VCDEA	EHTKSM
	:*:* :*: * :*: * * * * * .: *:*::*** .***** ** .:		
BenR_GJ31	RVQGHYSQIVASKLLTLMSTNIRRESLSAPQAGLERILEYIERNLKLELSAEVLAEQACM		
BenR_GJ31*	RVQGHYSQIVASKLLTLMSTNIRRESLSAPQAGLERILEYIERNLKLELSAEVLAEQACM		
BenR_KT2440	RVQGHYSQIVASKLLTLMSTNIRRESLSAPQAGLERILEYIERNLKLELSAEVLAEQACM		
BenR_Pp	RVQGHYSQIVASKLLTLMSTNIRRESLSAPQAGLERILEYIERNLKLELSAEVLAEQACM		
BenM_P111	RVDSHFEQILGSKLLTLKTNVSRDPGDAQVVFARLDAYIRRHLQSEIEVALAEQAHM		
XylS_P.putida	RVQEHYAGI IASKLLEMLGNSVREIFSKGNPSFERVVQFIEENLKRNISLERLAELAMM		
	:*: *:*:* :* :*: * * . : *:* :*.*:***: :.*** ** *		
BenR_GJ31	SLRSLYALFDQHLGTTPKHYIRQKLERVHACLNDPTCGVRSVTEALALDYGFLHLGRFSE		
BenR_GJ31*	SLRSLYALFDQHLGTTPKHYIRQKLERVHACLNDPTCGVRSVTEALALDYGFLHLGRFSE		
BenR_KT2440	SLRSLYALFDQHLGITPKHYVRQKLERVHACLSDPCTCGVRSVTEALALDYGFLHLGRFSE		
BenR_Pp	SLRSLYALFDQHLGITPKHYVRQKLERVHACLSDPCTCGVRSVTEALALDYGFLHLGRFSE		
BenM_P111	STRSLYALFERQLGESPRQYIRRLRLERIRACLEDPGCRVRLNTEALALDFGFHLGRFAE		
XylS_P.putida	SPRSLYNLFEKHAGTTPKNIIRNRKLESIRACLNDPSANVRSITEIALDYGFLHLGRFAE		
	* **** *::: * :*:***. :* :*:***.* * . *:*:***:***:*** *****:*		
BenR_GJ31	VYRQQFGELPSQTFKRRG----		
BenR_GJ31*	VYRQQFGELPSQTFKRRG----		
BenR_KT2440	IYRQQFGELPSQTFKRRG----		
BenR_Pp	IYRQQFGELPSQTFKRRG----		
BenM_P111	QYRRQFGELPSETLRRRA----		
XylS_P.putida	NYRSAFGELPSDTLRQCKKEVA		
	** *****:***:		

Abb. 3.5.4.2.2: Die α -helix-turn- α -helix-Motive in BenR aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* im Vergleich zu anderen Regulatoren des Benzoatabbaus, sowie XylS aus *P. putida*. Das erste HTH-Motiv (mögliche DNA-Bindestelle zur Erkennung von verschiedenen DNA Ziel-Sequenzen) ist dunkelgrau hinterlegt und in weißer Schrift dargestellt. Das zweite HTH-Motiv (möglicher Kontakt zum Transkriptionssystem) ist hellgrau hinterlegt und in schwarzer Schrift dargestellt. Die Veränderungen in der Aminosäuresequenz von *P. putida* GJ31* im Vergleich zu *P. putida* GJ31 und den anderen Stämmen ist ebenfalls hellgrau hinterlegt und in schwarzer Schrift dargestellt. Erläuterungen: *: Übereinstimmung der Aminosäuren, :: strukturell sehr ähnliche Aminosäuren, .: strukturell ähnliche Aminosäuren. Aminosäuresequenzen: BenR_GJ31 (*P. putida* GJ31, diese Arbeit), BenR_GJ31* (*P. putida*, diese Arbeit), BenR_KT2440 (*P. putida* Acc. No. NP_745303.1, Nelson *et al.*, 2002), BenR_Pp (*P. putida*, NCBI Acc. No. AAF63447, Cowles *et al.*, 2000), BenM_P111 (*P. putida* P111, NCBI Acc. No. AY026914, Totevova *et al.*, 2001 - nicht veröffentlicht), XylS_P.putida (*P. putida* PaW1, NCBI Acc. No. M10143, Inouye *et al.*, 1985).

Um festzustellen, ob die Veränderung der Aminosäuresequenz von BenR aus dem Wildstamm GJ31 und Stamm GJ31* eine unterschiedliche Induktion durch verschiedene Benzoate bewirkt, wurden die Regulatoren nach Cowles *et al.* (2000) getestet. Das Reporterplasmid pCCH101 wurde in die Stämme *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* gebracht und die unterschiedliche Induktion über eine Messung der β -Galactosidaseaktivität bestimmt (Material und Methoden 2.2.14, siehe **Tab. 3.5.4.2.2**).

In beiden Stämmen konnte mit dem Induktor 3-Chlorbenzoat keine erhöhte β -Galactosidaseaktivität im Vergleich zu der Kontrolle, angezogen auf Succinat ohne Induktor, festgestellt werden. Dagegen wurde für *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* mit Benzoat eine mindestens doppelt erhöhte Aktivität im Vergleich zu der Kontrolle ohne Induktor beobachtet. Der Induktionsversuch nach Cowles *et al.* (2000) ist allerdings ungenau. So war das beschriebene Ergebnis zwar reproduzierbar, aber mit hohen Schwankungen der absoluten Werte verbunden.

Tab. 3.5.4.2.2: Induktionsversuche mit *benR* nach Cowles *et al.* (2000).

Induktoren	β -Galactosidaseaktivität [Miller-Einheiten]	
	<i>P. putida</i> GJ31 (pCCH101)	<i>P. putida</i> GJ31* (pCCH101)
Succinat	350	40
Succinat + Benzoat	630	200
Succinat + 3-Chlorbenzoat	340	36

Das Reporterplasmid pCCH101 wurde mittels *E. coli* S17.1 in Zellen von *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* übertragen. Diese Stämme wurden auf Succinat angezogen, dem als Induktor Benzoat oder 3-Chlorbenzoat zugesetzt wurde. Es wurden Enzymtests auf β -Galactosidaseaktivität nach Miller (1972) durchgeführt (Material und Methoden 2.2.14).

Das Experiment erbrachte keine Unterschiede in der Induktion von BenR in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* mit Benzoat oder 3-Chlorbenzoat als Induktor. Vermutlich ist die Mutation in dem in dieser Arbeit sequenzierten Benzoat-Dioxygenase-Regulatorgen nicht die Ursache für das Wachstumsvermögen von *P. putida* GJ31* auf 3-Chlorbenzoat durch eine veränderte Induktion durch 3-Chlorbenzoat oder Benzoat.

3.5.4.3 Das Genprodukt BenX

Der offene Leserahmen *benX* (GC-Gehalt 49,9%) kodiert für 299 Aminosäuren. Eine Ähnlichkeit von 40% der Aminosäuresequenz mit BenX, einem Protein mit unbekannter

Funktion aus *P. putida* KT2440, konnte festgestellt werden. BenX aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* hat ein berechnetes Molgewicht von 33,07 kDa.

Tab. 3.5.4.3: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit BenX aus *P. putida* GJ31 bzw. dem identischen BenX aus *P. putida* GJ31*.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit BenX in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. putida</i> KT2440	NP_745304.1	40	54
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	ZP_00205769.1	32	47

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

3.5.4.4 Das Genprodukt BenA

Das Gen *benA* (GC-Gehalt 63,0%) kodiert für 392 Aminosäuren. Nach Sequenzvergleichen konnte eine Ähnlichkeit von 99% mit BenA, der Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-A aus *P. putida* KT2440, festgestellt werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von BenA aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* zeigt ein Molgewicht von 45,4 kDa.

Tab. 3.5.4.4: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit BenA aus *P. putida* GJ31 bzw. dem identischen BenA aus *P. putida* GJ31*.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit BenA in [%]	
		Identische	Homologe
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	AAN68769.1	99	100
<i>Pseudomonas putida</i>	AAF63448.2	99	100
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PFO-1	ZP_00087912.1	91	95
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NP_251208.1	82	92
<i>Pseudomonas putida</i> P111	AAK52287.1	82	92
<i>Azotobacter vinelandii</i>	ZP_00092928.1	78	91
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AAO19113	75	87
<i>Pseudomonas putida</i> PaW630	AAD31447.1	75	87
<i>Pseudomonas putida</i>	NP_542871.1	74	87
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	BAB62286.1	70	83
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	AAC46436.2	69	81
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PHEA-2	CAD92319.1	69	81

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


```

BenA_GJ31      1  -----MSLGFYDLNALLEDDREKGIYRCKREMFTDPRLFDEMKNHIFEGNWIYLAH
BenA_GJ31*    1  -----MSLGFYDLNALLEDDREKGIYRCKREMFTDPRLFDEMKNHIFEGNWIYLAH
BenA_KT2440   -----MSLGFYDLNALLEDDREKGIYRCKREMFTDPRLFDEMKNHIFEGNWIYLAH
BenA_P.putida -----MSLGFYDLNAMLEDDREKGIYRCKREMFTDPRLFDEMKNHIFEGNWIYLAH
Pflu5203_PfO-1 -----MEALAMSLGNDYLNALLEEDKEKGIYRCKREMFTDPRLFEMTHIFEGNWIYLAH
XylX_PAO-1    -----MSLGS DYLRSLLEEDPERGVYRCKREMFTDPRLFEMKNHIFEGNWIYLAH
BenA_P111     -----MSLGS DYLRSLLEEDPERGVYRCKREIFTDPRLFEMKNHIFEGNWIYLAH
Avin4673     -----MTLGIDINGLLEEDREKGLYRCKRDMFIDPELFEMKNHIFEGNWIYLAH
XylX_S-47    -----MTMTMHLGLDYINSLVEEDEDEGIYRCKREMFTDPRLFDEMKNHIFEGNWIYLAH
XylX_PaW630  -----MNLGLDYIDSLVEEDENEGIYRCKREMFTDPRLFDEMKNHIFEGNWIYLAH
XylX_pWW0    -----MTMTMHLGLDYIDSLVEEDENEGIYRCKREMFTDPRLFDEMKNHIFEGNWIYLAH
BenA_RHA1    MDTDTLYTAPSDDVRAKLADALIEDAETGRYQVRRSVFTDEDLFEMKNHIFEGNWIYLAH
BenA_ADPI    MPRIPVINTSH--LDRIDELLVDNTEGTFKLRHRSVFTDQALFDLEMKYIFEGNWIYLAH
BenA_PHEA-2  MPRIPVINTSH--LDRIDELLVDNIDTGEFKLHRSVFTDEALFDLEMKYIFEGNWIYLAH
                :      :  :: : *  :: : *. : * *  * : : : : : * : : : : : : : :
                :      :  :: : *  :: : *. : * *  * : : : : : * : : : : : : : :

BenA_GJ31     ESQIPEKNDFLTLTMGRQPIFIARNKDGELNAFLNACSHRGAMLCRHKRGNRSSYTCPFH
BenA_GJ31*    ESQIPEKNDFLTLTMGRQPIFIARNKDGELNAFLNACSHRGAMLCRHKRGNRSSYTCPFH
BenA_KT2440   ESQIPEKNDFLTLTMGRQPIFIARNKDGELNAFLNACSHRGAMLCRHKRGNRSSYTCPFH
BenA_P.putida ESQIPEKNDFLTLTMGRQPIFIARNKDGELNAFLNACSHRGAMLCRHKRGNRSSYTCPFH
Pflu5203_PfO-1 ESQLPNNNDFLTTMTGRQPIFIARNKDGVLNAFLNACSHRGAMLCRHKSGNRSSYTCPFH
XylX_PAO-1    ESQVAGVNDYLTQTIGRQSIIVARNRDGQLNAFINACSHRGAMLCRHKSGNRSSYTCPFH
BenA_P111     ESQIAGINDYLTQTIGRQSIIVARNRDGQLNAFINACSHRGAMLCRHKSGNRSSYTCPFH
Avin4673     ESQIPEKNDYTTYIGRQPIVIARNKDGELNAFINACSHRGAALCRYKSGNKATYTCPFH
XylX_S-47    ESQIPEKNDYTTYIGRQPIFITRNKDGELNAFINACSHRGATLCRFRSGNKATHTCSFH
XylX_PaW630  ESQIPEKNDYTTYIGRQPIFITRNKDGELNAFINACSHRGATLCRFRSGNKATHTCSFH
XylX_pWW0    ESQIPEKNDYTTYIGRQPIFITRNKDGELNAFINACSHRGATLCRFRSGNKATHTCSFH
BenA_RHA1    ESQIPNVGDYFTTYMGRQPIVISRNKEGELNALVNACSHRGAMLCRRKTDNRTTFTCPFH
BenA_ADPI    ESQIPNNNDYTTYIGRQPIIIVARNRNGELNAMINACSHRGAQLCRHKRGNKTTYTCPFH
BenA_PHEA-2  ESQIPNNNDYTTYIGRQPIIIVARNRNGELNAMINACSHRGAQLCRYKRGNKATYTCPFH
                ***.: . * : *  : : : : : * : : : : : * : : : : : * : : : : : * : : : : : * : : : : : *
                :      :  :: : *  :: : *. : * *  * : : : : : * : : : : : * : : : : : * : : : : : *

BenA_GJ31     GWTFNNSGKLLKVKDP SNAGYPSDFNCDGSHDLTKVARFESYRGFLFGSLNADVKPLVEH 171

BenA_GJ31*    GWTFNNSGKLLKVKDP SNAGYPSDFNCDGSHDLTKVARFESYRGFLFGSLNADVKPLVEH 171
BenA_KT2440   GWTFNNSGKLLKVKDP SNAGYPSDFNCDGSHDLTKVARFESYRGFLFGSLNADVKPLVEH
BenA_P.putida GWTFNNSGKLLKVKDP SEAGYPSDFNCEGSHDLTKVARFESYRGFLFGSLNPNVKPLAEH
Pflu5203_PfO-1 GWTFNNSGKLLKVKDPAEAGYPSDFNCEGSHDLTRVARFESYRGFLFGSLNPNVPLAEH
XylX_PAO-1    GWTFNNSGKLLKVKDPAEAGYPSDFNCEGSHDLTRVARFESYRGFLFGSLNPNVPLAEH
BenA_P111     GWTFNNSGKLLKVKDPAEAGYPSDFNCEGSHDLTRVARFESYRGFLFGSLNPNVPLAEH
Avin4673     GWTFNNSGKLLKVKDP SDAGYPSDFNCEGSHDLQKIARFESYRGFLFGSLSAEVKPLGEF
XylX_S-47    GWTFNSGKLLKVKDPKAGYPSDFDCDGS HDLKKVARFAS YRGFLFGSLREDVAPLEEF
XylX_PaW630  GWTFNSGKLLKVKDPKAGYPSDFDCDGS HDLKKVARFAS YRGFLFGSLREDVAPLEEF
XylX_pWW0    GWTFNSGKLLKVKDPKAGYPSDFDCDGS HDLKKVARFAS YRGFLFGSLREDVAPLEEF
BenA_RHA1    GWTFNNSGKLLKVKDP REAGYPSDFNCKDGS HDLTKVARFENYRGFLFGSLNADVPPL EEH
BenA_ADPI    GWTFNNSGKLLKVKDP SDAGYSDCFNQDGS HDLKKVARFESYKGF LFGSLNPDVPSLQEF
BenA_PHEA-2  GWTFNNSGKLLKVKDP SEAGYSDCFNQDGS HDLKKVARFESYKGF LFGSLNPDVPSLQEF
                ****.***** * : : * : : : : : * : : : : : * : : : : : * : : : : : *

```

Abb. 3.5.4.4: Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz von BenA aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* sowie verwandten Benzoat-Dioxygenase-Untereinheiten-A. Eine Rieske-[2Fe-2S]-Domäne ist dunkelgrau unterlegt und in weißer Schrift dargestellt. Zwei konservierte Cysteine und zwei Histidine, die jeweils ein Eisen-Ion koordinieren, sind durch einen hellgrauen Hintergrund und schwarze Schrift hervorgehoben. Erläuterungen: *: Übereinstimmung der Aminosäuren, :: strukturell sehr ähnliche Aminosäuren, .: strukturell ähnliche Aminosäuren. Aminosäuresequenzen: benA_GJ31 (*P. putida* GJ31, diese Arbeit), benA_GJ31* (*P. putida* GJ31*, diese Arbeit), BenA_KT2440 (*P. putida* KT2440, NCBI Acc. No. AAN68769.1, Nelson *et al.*, 2002), BenA_P. putida (*P. putida*, NCBI Acc. No. AAF63448.2, Cowles *et al.*, 2000), Pflu5203_PfO-1 (*P. fluorescens* PfO-1, NCBI Acc. No. ZP_00087912.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), XylX_PAO-1 (*P. aeruginosa* PAO1, NCBI Acc. No. NP_251208.1, Stover *et al.*, 2000), BenA_P111 (*P. putida* P111, NCBI Acc. No. AAK52287.1, Totevova *et al.*, 2001), Avin4673 (*Azetobacter vinelandii*, NCBI Acc. No. ZP_00092928.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), XylX_S-47 (*Pseudomonas* sp. S-47, NCBI Acc. No. AAO19113, Park *et al.*, 2000), XylX_PaW630 (*P. putida* PaW630, NCBI Acc. No. AAD31447.1, Wessler *et al.*, 1999) XylX_pWW0 (*P. putida* PaW1, NCBI Acc. No. NP_542871.1, Greated *et al.*, 2002), BenA_RHA1 (*Rhodococcus* sp. RHA1, NCBI Acc. No. BAB62286.1, Kitagawa *et al.*, 2001a und 2001b), BenA_ADPI (*Acinetobacter* sp. ADPI, NCBI Acc. No. AAC46436.2, Collier *et al.*, 1998), BenA_PHEA-2 (*Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2, NCBI Acc. No. CAD92319.1, Xu *et al.*, 2003).

Die Benzoat-Dioxygenase-Untereinheiten-A aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* weisen hohe Ähnlichkeiten mit den Proteinen BenA und XylX aus verschiedenen Stämmen auf (E.C.-Nummer 1.14.12.10). BenA und XylX Proteine enthalten eine konservierte Rieske-Domäne mit einem [2Fe-2S]-Zentrum.

Zwei konservierte Cysteine koordinieren ein Eisen-Ion während das andere Eisen-Ion von zwei konservierten Histidinen koordiniert wird (siehe **Abb.** 3.5.4.4).

Fast identisch ist BenA aus *P. putida* GJ31 bzw. *P. putida* GJ31* mit BenA aus *P. putida* KT2440 und BenA aus *P. putida*.

3.5.4.5 Das Genprodukt BenB

Das Gen *benB* (GC-Gehalt 60,1%) kodiert für 162 Aminosäuren. Es konnte eine Ähnlichkeit von 96% der Aminosäuresequenz mit BenB, der Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-B aus *P. putida*, festgestellt werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von BenB aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* hat ein berechnetes Molgewicht von 19,2 kDa.

Tab. 3.5.4.5: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit BenB aus *P. putida* GJ31 bzw. dem identischen BenB aus *P. putida* GJ31*.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit BenB in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. putida</i>	AAF63449.1	96	98
<i>P. putida</i> KT2440	NP_745306.1	95	98
<i>P. fluorescens</i> PfO-1	ZP_00263038.1	90	96
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AAO019114.1	77	89
<i>Pseudomonas</i> sp. ST41	AAT09772.1	77	88
<i>P. putida</i> PaW630	AAD31448.1	77	88
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	NP_251207.1	76	88
<i>P. putida</i>	NP_542870.1	75	88
<i>Azotobacter vinelandii</i>	ZP_00092927.1	74	87
<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	ZP_00151105.1	68	81
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	AAC46437.1	67	80
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	BAB70669.1	63	77
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	ZP_00276137.1	63	71

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

```

BenB_GJ31      MS-----LYATVRDFLE REARYLDDAQWDQWLEMYASDCTFWMPSWDDDDTLTEDPQ
BenB_GJ31*    MS-----LYATVRDFLE REARYLDDAQWDQWLEMYASDCTFWMPSWDDDDTLTEDPQ
BenB_Pp       MS-----LYETVRDFLY REARYLDDAQWDQWLELYASDASFWMPSWDDDDTLTEDPQ
BenB_KT2440   MS-----LYDTRVDFLY REARYLDDAQWDQWLELYASDASFWMPSWDDDDTLTEDPQ
COG5517_PfO-1 MSN-----LYDTRVDFLY REARYLDDGQWDQWLELYAADASFWMPSWDDDDTLTEDPQ
XylY_S-47     MTI-----SYEAVRDFLY REARYLDDKQWESWLEMYAPDATFWMPAWDDRDQLTEDPQ
XylY_ST41     MTI-----SYEAVRDFLY REARHLDDKQWDSWLEMYAPDATFWMPAWDDRDQLTEDPQ
XylY_PaW630   MTI-----SYEAVRDFLY REARYLDDKQWDSWLEMYAPDATFWMPAWDDRDQLTEDPQ
XylY_PA01     MSL-----GYDALRDFLY REARYLDDKDWDAWLALYAADASFWMPSWDDRDQLTEDPQ
XylY          MTI-----SYEAVRDFLY REARYLDDKQWESWLEMYAPDATFWMPAWDDRDQLTEDPQ
Avin4672      MSA-----TYEAVRDFLY REARYLDEKDWGWLEQYAPDCTFWMPWTWDDRDDELTEDPQ
BenB_ADP1     MNATALLDTISIEQISQFLY SEARFLDDEQWDDWLECYAPQASFWMPSWDDDDNQLTENPQ
BenB_RHA1     MTAVAES-TVTHQHDIEQFLY REARYLDDREFEKWIECYHPASEFWMPAWADDGELTTDPM
CH34          MSA-----VIPMSDVSAFLY RECRLLDDEQWDEWLTCYHPDARFWMPCWDDDGKLVTDPE
* .          : ** : * . * * : : : : * . . * * * * * . * . : *

BenB_GJ31     SEISLIWYGNRGGLEDVFR IKTERS SAT VPDTRTSHNISNIEIVEQEGESCQVRFNWH
BenB_GJ31*    SEISLIWYGNRGGLEDVFR IKTERS SAT VPDTRTSHNISNIEIVEQEGESCQVRFNWH
BenB_Pp       SEISLIWYGNRGGLEDVFR IKTERS SAT VPDTRTSHNISNIEIVEQAEAGSCQVRFNWH
BenB_KT2440   SEISLIWYGNRGGLEDVFR IKTERS SAT VPDTRTSHNISNIEIVEQGEDNCQVRFNWH
COG5517_PfO-1 SEISLIWYGNRGGLEDVFR IKTERS SAT IPDTRTSHNLSNIEIVEQEGEQCVRFNWH
XylY_S-47     SQISLIWYGNRGGLEDVFR IKTERS SAT IPDTRTSHNISNLELLEQSGGFCKLRYNWH
XylY_ST41     SQISLIWYGNRGGLEDVFR IKTERS SAT IPDTRTSHNISNLELLEQSGGFCKLRYNWH
XylY_PaW630   SQISLIWYGNRGGLEDVFR IKTERS SAT IPDTRTSHNISNLELLEQSDGFCKLRYNWH
XylY_PA01     REISLIWYGNRGGLEDVFR IRTERS SAT LPDTRTSHNLSNIEELGEDDGCIRVRCNWH
XylY          SQISLIWYGNRSGLEDVFR IKTERS SAT IPDTRTSHNISNLELLEQSDGVCKLRYNWH
Avin4672      SQISLIWYGNRSGLEDVFR IRTERS SAT IPDTRTSHN IANLE ILEKTDLCLRLRFNWH
BenB_ADP1     TEISLIYYPDRQGLEDRVFR IKTERS SAT MPDTRTAHNISNIEVESRDGLQITVRFNWN
BenB_RHA1     TEISLIYYANRGGIEDRVFR IKTERS SAT SLPEPRTGHNISNVEVIERRGDVVDVRFNWH
CH34          REISLIYFPNRQGLDR IFR IKTERS SAT IPDTRTSHNLSNIEIESTDGLATVRFNWH
: * * * : * . * * : * * * : * * * * : * . . * * : * * * : * * *

BenB_GJ31     TLSFRYKTTDSYFGT SFYTL DLRGEQPLIKAKKVVLKNDYVRQVIDIYHI
BenB_GJ31*    TLSFRYKTTDSYFGT SFYTL DLRGEQPLIKAKKVVLKNDYVRQVIDIYHI
BenB_Pp       TLSFRYKTTDSYFGT SFYTL DLRGEQPLIKAKKVVLKNDYVRQVIDIYHI
BenB_KT2440   TLSFRYKTTDSYFGT SFYTL DLRGEQPLIKAKKVVLKNDYVRQVIDIYHI
COG5517_PfO-1 TLSFRYQVTDYFGT SFYTL DLRGEQPLIKAKKVVLKNDYVRQVIDIYHI
XylY_S-47     TMSYRYKTVDHFFGT NFCTLDTCGETPLIKAKKVVLKNDYIRQVIDVYHV
XylY_ST41     TMSYRYNTVDHFFGT NFCTLDTCGETPLIKAKKVVLKNDYIRQVIDVYHV
XylY_PaW630   TLNRYKTVDHFFGT NFCTLDTCGESPLIKAKKVVPKNDYVRQVIDVYHV
XylY_PA01     TLSYRYKTVDSYFGTTFYDL DVRGESPLIKAKKVILKNDYVRQLIDVYHV
XylY          TMNRYKTVDHFFGT NFCTLDTCGETPLITAKKVVLKNDYIRQVIDVYHV
Avin4672      TLSFRYKIVDQFYGT SFYTL DIRGANPLIKAKKVVLKNDYVRHVLDVYHV
BenB_ADP1     TLSFRYKNSYSGT SFYTL DFRSAGEQPKILSKYVMLKNDYINQVIDIYHI
BenB_RHA1     TLYFRYNTVDYFGT SFYTL DFRSAGEQPLILKAKKVVLKNDYIHHVVDIYHI
CH34          TLAHRYQTNFYFGT SFYTL DFRSOGTPIRLDKYVVLKNDYIHOVIDIYHI
* : . * * : : : . : * * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * :

```

Abb. 3.5.4.5: Aminosäuresequenz von BenB aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* sowie verwandten Benzoat-Dioxygenase-Untereinheiten-B. Die charakteristische Domäne von ringhydroxylierenden Dioxygenase-Untereinheiten-B (pfam00866) ist dunkelgrau unterlegt und in weißer Schrift dargestellt. Erläuterungen: *: Übereinstimmung der Aminosäuren, :: strukturell sehr ähnliche Aminosäuren, .: strukturell ähnliche Aminosäuren. Aminosäuresequenzen: BenB_GJ31 (*P. putida* GJ31, diese Arbeit), BenB_GJ31* (*P. putida* GJ31*, diese Arbeit), BenB_Pp (*P. putida*, NCBI Acc. No. AAF63449.1, Cowles *et al.*, 2000), BenB_KT2440 (*P. putida* KT2440, NCBI Acc. No. NP_745306.1, Nelson *et al.*, 2002), COG5517_PfO-1 (*P. fluorescens* PfO-1, NCBI Acc. No. ZP_00263038.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), XylY_S-47 (*Pseudomonas* sp. S-47, NCBI Acc. No. AAO019114.1, Park *et al.*, 2000), XylY_ST41 (*Pseudomonas* sp. ST41, NCBI Acc. No. AAT09772.1, Stallwood *et al.*, 2004), XylY_PaW630 (*P. putida* PaW630, NCBI Acc. No. AAD31448.1, Wessler, *et al.*, 2004), XylY_PA01 (*P. aeruginosa* PA01, NCBI Acc. No. NP_251207.1, Stover *et al.*, 2000), Avin4672 (*Azotobacter vinelandii*, NCBI Acc. No. ZP_00092927.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), BenB_ADP1 (*Acinetobacter* sp. ADP1, NCBI Acc. No. AAC46437.1, Collier *et al.*, 1998), BenB_RHA1 (*Rhodococcus* sp. RHA1, NCBI Acc. No. BAB70669.1, Kitagawa *et al.*, 2001a und 2001b), CH34 (*Ralstonia metallidurans* CH34, NCBI Acc. No. ZP_00276137.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation).

Die kleine Untereinheit der ringhydroxylierenden-Dioxygenase hat eine ähnliche Struktur wie Kerntransportfaktoren-2 (NTF-2), Ketosteroid-Isomerasen und Scytalone-Dehydratasen (Nam *et al.*, 2001). Der Abbau von aromatischen Verbindungen durch aerobe Bakterien beginnt meist mit der Dehydroxylierung der Substrate durch eine nicht-hämhaltige aber eisenhaltige Dioxygenase. Diese Enzyme beinhalten zwei oder drei lösliche Proteine, die interagieren und so eine Elektronentransportkette bilden. In der Elektronentransportkette wird ein Elektron von reduziertem NADH via Flavin und ein [2Fe-2S]-Redoxzentrum zu einer terminalen Dioxygenase transportiert (Geary *et al.*, 1984). Allerdings ist der aktive Bestandteil dieser Enzyme die Untereinheit A, wie zum Beispiel BenA aus *P. putida* GJ31 und die ihm verwandten Proteine (siehe Experimente und Ergebnisse 3.5.4.4). Der kleineren Untereinheit-B konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden. Sie spielt aber evtl. eine strukturelle Rolle beim Aufbau der Dioxygenasen (Butler und Mason, 1997).

3.5.4.6 Das Genprodukt BenC

Der unvollständige offene Leserahmen *benC* zeigt einen GC-Gehalt von 63,9%. Diese Teilsequenz kodiert für insgesamt 227 Aminosäuren.

Tab. 3.5.4.6: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit BenC aus *P. putida* GJ31 bzw. dem identischen BenC aus *P. putida* GJ31*.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit BenC in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. putida</i>	AAF63450.1	91	92
<i>P. putida</i> KT2440	NP_745307.1	89	92
<i>P. fluorescens</i> PfO-1	ZP_00266983.1	80	88
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	AAO19115.1	74	85
<i>Pseudomonas</i> sp. ST41	AAT09773.1	74	85
<i>P. putida</i> PaW630	AAD31449.1	73	85
<i>Azotobacter vinelandii</i>	ZP_0092926.1	73	82
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	NP_251206.1	71	81
<i>P. putida</i> P111	AAK52289.1	70	86
<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	ZP_00151108.1	69	84
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	YP_046124.1	53	70
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	BAB70700.1	52	73

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren an. Es wurden 227 Aminosäuren des unvollständig sequenzierten BenC aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* mit den bekannten Proteinen verglichen. Das komplette BenC aus *P. putida* ist zum Beispiel 336 Aminosäuren groß.

In Sequenzvergleichen konnte eine Ähnlichkeit von 91% mit BenC, der Benzoat-Dioxygenase-Ferredoxin-Reduktase aus *P. putida*, festgestellt werden. BenC aus *P. putida* (NCBI Acc.No. AAF63450.1) ist ein insgesamt 336 Aminosäuren großes Protein.

In den Aminosäureteilsequenzen der Benzoat-Dioxygenase-Ferredoxin-Reduktase (E.C.-Nummer 1.18.1.3) BenC aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* konnten zwei charakteristische Domänen erkannt werden. Erstens eine [2Fe-2S] Eisen-Schwefel-Cluster Bindedomäne (siehe **Abb. 3.5.4.6**, dunkelgrau hinterlegt mit weißer Schrift) und zweitens eine Oxidoreduktase FAD-Bindedomäne (siehe **Abb. 3.5.4.6**, hellgrau hinterlegt mit schwarzer Schrift).

Eisen-Schwefel-Proteine spielen eine wichtige Rolle beim Elektronentransfer-Prozess und in verschiedenen enzymatischen Reaktionen. Diese Proteinfamilie beinhaltet Pflanzen- und Algen-Ferredoxine, die als Elektronen-Carrier in der Photosynthese dienen und als Ferredoxine, die Teil der Redoxketten sind.

Abb. 3.5.4.6 (siehe nächste Seite): Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz von BenC aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* (jeweils Aminosäuren 1 bis 219) und verwandten Proteinen. Erläuterungen: Dunkelgrau mit weißer Schrift: [2Fe-2S] Eisen-Schwefel-Cluster Bindedomäne. Hellgrau mit schwarzer Schrift: Oxidoreduktase FAD-Bindedomäne. Erläuterungen: *: Übereinstimmung der Aminosäuren, :: strukturell sehr ähnliche Aminosäuren, .: strukturell ähnliche Aminosäuren. Aminosäuresequenzen: BenC_GJ31 (*P. putida* GJ31, diese Arbeit), BenC_GJ31* (*P. putida* GJ31*, diese Arbeit), BenC_Pputida (*P. putida*, NCBI Acc. No. AAF63450.1, Cowles *et al.*, 2000), BenC_KT2440 (*P. putida* KT2440, NCBI Acc. No. NP_745307.1, Nelson *et al.*, 2002), PfO-1 (*P. fluorescens* PfO-1, NCBI Acc. No. ZP_00266983.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), XylZ_S-47 (*Pseudomonas* sp. S-47, NCBI Acc. No. AAO19115.1, Park *et al.*, 2000), XylZ_ST41 (*Pseudomonas* sp. ST41, NCBI Acc. No. AAT09773.1, Stallwood *et al.*, 2004), XylZ_PaW630 (*P. putida* PaW630, NCBI Acc. No. AAD31449.1, Wessler *et al.*, 2004), Avin4671 (*Azotobacter vinelandii*, NCBI Acc. No. ZP_0092926.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), XylZ_PAO1 (*P. aeruginosa* PAO1, NCBI Acc. No. NP_251206.1, Stover *et al.*, 2000), BenC_P111 (*P. putida* P111, NCBI Acc. No. AAK52289.1, Totevova *et al.*, 2001), RCB (*DE.C.hloromonas aromatica* RCB, NCBI Acc. No. ZP_00151108.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), BenC_ADPI (*Acinetobacter* sp. ADPI, NCBI Acc. No. YP_046124.1, Barbe *et al.*, 2004), BenC_RHA1 (*Rhodococcus* sp. RHA1, NCBI Acc. No. BAB70700.1, Kitagawa *et al.*, 2001a und 2001b).

```

BenC_GJ31      1 -----MSYQIALNFEDGVTRFIEATGHETVADAAYRQGINIPLDCR
BenC_GJ31*     1 -----MSYQIALNFEDGVTRFIEATGHETVADAAYRQGINIPLDCR
BenC_Pputida   -----MSYQIALNFEDGVTRFIEATGHETVADAAYRQGINIPLDCR
BenC_KT2440    -----MSYQIALNFEDGVTRFIEATGQETVADAAYRQGMNIPDCR
Pfo-1          -----MSFQIALNFEDGITRFIEAQGHETVADAAYRQGINIPLDCR
XylZ_S-47      -----MTHKVALNFEDGVTRFIDANAGETVADAAYRQGINLPLDCR
XylZ_ST41      -----MTHKVALNFEDGVTRFIDANAGETVADAAYRQGINLPLDCR
XylZ_PaW630    -----MTHKVALNFEDGVTRFIDANAGETIADAAYRQGINLPMDCR
Avin4671       MSRPLPGGRANPRIRAGCHMSYKVALNFEDGVTRFIEVDSGETVADASYRQGINIPLDCR
XylZ_PA01      -----MNHRIALNFEDGVTRFIIHAAPGETVADAAYRQGINIPLDCR
BenC_P111      -----MNHRIALNFEDGVTRFIIHAAPGETVADAAYRQGINIPLDCR
RCB            -----MTYRIALNFEDGVTRFIDCKPTEIVADAAYRQSNINVPIDCR
BenC_ADP1      -----MSLYLNRI PAMSNHQVALQFEDGVTRFIRIAQGETLSDAAYRQGINIPMDCR
BenC_RHA1      -----MTFQVALSFEDGITRFIKCDGDETVADASYRARINIPDCR
               . . . : * * . * * * : * * * *      * * : * * * : * : * * * *

BenC_GJ31      DGACGTCKCKAESGRYDLGD-NFIEDALSEDEIAEGYVLTQCMRAESDCVIRIPASSQLC
BenC_GJ31*     DGACGTCKCKAESGRYDLGD-NFIEDALSEDEIAEGYVLTQCMRAESDCVIRIPASSQLC
BenC_Pputida   DGACGTCKCKAESGRYDLGD-NFIEDALNEDEIAEGYVLTQCMRAESDCVIRIPASSQLC
BenC_KT2440    DGACGTCKCKAESGRYDLGD-NFIEDALSEDEIAEGYVLTQCMRAESDCVIRIPASSQLC
Pfo-1          DGACGTCKCFEAEGRYDMGD-NFIEDALSEDEL TQGYVLTQCMRAQSDCVVRVPAASQVC
XylZ_S-47      DGACGACKCFAESGRYSLGE-EYIEDALSEAEAEQGYVLTQCMRAESDCVIRVPAASDVC
XylZ_ST41      DGACGACKCFAESGRYDLGE-EYIEDALSEAEAEQGYVLTQCMRAESDCVIRVPAASDVC
XylZ_PaW630    DGACGACKCFAESGRYDLGE-EYIEDALSEAEAEQGYVLTQCMRAESDCVIRVPAASDVC
Avin4671       DGACGACKCLAESGRYDLGE-NYIEDALSEEEKAAGLVLTQCMRPESDCVLRIPASSEVC
XylZ_PA01      DGACGTCKCLAEAGRYALGQ-DYIDDALSAAEAARGYVLTQCMRAESDCVLRVPAASSTLC
BenC_P111      DAPCGTCKCLAEAGRYALGQ-DYIDDALSAAEAARGYVLTQCMRAESDCVLRVPAASSTLC
RCB            DGACGACKCSCESGSFRLG--EYIDDALSADAAAQGMVLTQCMYPQGDVVRVPAASDVC
BenC_ADP1      EGACGT CRAFTCESGNYPEDNYIEDALTPAEAQQGYVLACQCRPTSDAVFQIQASSEVC
BenC_RHA1      DGACGTCKSLCESGTYDGD--YIEEALTDEEAEHG YCLPCQMPPESDLVLIQIPTTS DVA
               . . . * * * : . * * * :      : * * * * . * * * * . * * * . : * * * : .

BenC_GJ31      KTEQASFEEA AISDVRQLSASTIALSIKGE-SLSRLAFLPGQYVNLKVP GSEQSRAYSFSS
BenC_GJ31*     KTEQASFEEA AISDVRQLSASTIALSIKGE-SLSRLAFLPGQYVNLKVP GSEQSRAYSFSS
BenC_Pputida   KTEQASFEEA AISDVRQLSASTIALSIKGE-ALSRLAFLPGQYVNLKVP GSEQSRAYSFSS
BenC_KT2440    KTEQATFEEA AISDVRQLSVSTIALSIKGE-ALSRLAFLPGQYVNLKVP GSEQSRAYSFSS
Pfo-1          KTEQESFQASISDVRQLSESTIALSIKGD-CLNKLAFPLPGQYVNLQVP GSDQTRAYSFSS
XylZ_S-47      KTQQASYQAAISNVRQLESTIALSIKSA-SLNQLAFLPGQYVNLQVP GSDQTRAYSFSS
XylZ_ST41      KTQQASYQAAISNVRQLESTIALSIKSA-SLNQLAFLPGQYVNLQVP GSDQTRAYSFSS
XylZ_PaW630    KTQQASYQAAISNVRQLESTIALSIKSA-SLNQLAFLPGQYVNLQVP GSDQTRAYSFSS
Avin4671       KTEQASYAAVISDVRALSPSVISLSIKGD-SLVRLSFLPGQYVNLQVP GSDQTRAYSFSS
XylZ_PA01      RTGQARYEARISEVRQLSPSTIGLSLRGE-ALASLAFPLPGQYVNLQVP GSEQRRAYSFSS
BenC_P111      RTGQARYEARISEVRQLSPSTIGLSLRGE-ALASLAFPLPGQYVNLQVP GSEQRRAYSFSS
RCB            KTKQASFNATISDLRQLSDSTISLTLSGE-ALNKLAFPLPGQYANLAVPGT PQHRAYSYS
BenC_ADP1      KTKIHHFEGTLARVENLSDSTITFDIQLDDGQPD IHFLAGQYVNVTLPGTTETRSYSFSS
BenC_RHA1      KTAAGTFTSTVTEIRKFSDTTIGFTIEIA-NRDDLVLPLPGQYVNVITVPGTEATRSYSFST
               :*      : . : : . : * : * : :      : * * . * * * . * : * * : * * * * *

BenC_GJ31      LQKDGEVSFLIRNVP GGLMSSFLTNLAKAGDSMTLAGPLGSFYLRPIQRPLLLL LAGGTGL 219
BenC_GJ31*     LQKDGEVSFLIRNVP GGLMSSFLTNLAKAGDSMTLAGPLGSFYLRPIQRPLLLL LAGGTGL 219
BenC_Pputida   LQKGEVSFLIRNVP GGLMSSFLTNLAKAGDSMSLAGPLGSFYLRPIQRPLLLL LAGGTGL
BenC_KT2440    LQKDGEVSFLIRNVP GGLMSSFLTNLAKAGDSL SLAGPLGSFYLRPIQRPLLLL LAGGTGL
Pfo-1          LQKDGEVSFLIRNVTGGLMSSFLTGLAKAGDSMNLAGPLGSFYLRREIKRPLLLL LAGGTGL
XylZ_S-47      LQKDGEVGFIRNVP GGLMSSFLTSLAKVGDSVSLAGPLGAFYLREIKRPLLLL LAGGTGL
XylZ_ST41      LQKDGEVSFLIRNVP GGLMSSFLTSLAKVGDSVSLAGPLGAFYLREIKRPLLLL LAGGTGL
XylZ_PaW630    LQKDGEVGFIRNVP GGLMSSFLTSLAKVGDSVSLAGPLGAFYLREIKRPLLLL LAGGTGL
Avin4671       MPH DGEVSFLIRNVP GGLMSGYLSQARAGDPMTLTGPLGSFYLRREIRRPLLLMLAGGTGL
XylZ_PA01      LAKDGEVSFLIRNVP GGLMSGFLSGTARAGDSLAMDGPLGSFYLRREIHRPLLLMLAGGTGL
BenC_P111      LAKDGEVSFLIRNVP GGLMSGFLSGTARAGDSLAMDGPLGSFYLRREIHRPLLLMLAGGTGL
RCB            MPKEGSVFLIRNVP GGLMSGYLREQAKAGDSITMAGPLGSFYLRREIKRPLVLLMLAGGTGL
BenC_ADP1      QPGNRLTGFVVRNVP QGKMSEYLSVQAKAGDKMSFTGPF GSFYLRDVKRPLVLLMLAGGTGI
BenC_RHA1      GPTSKELSFLVKITDGGMLSEYLSRAQVGD TLEFTGPMGSFFLREQKRRALLMLAGGTGL
               . * : : . * * * : *      : * * * * : : * * * * * * : * * * * *

```

Abb. 3.5.4.6: Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz von BenC aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* (jeweils Aminosäuren 1 bis 219) und verwandten Proteinen. Erläuterungen siehe oben.

3.5.5 Benzoat-Dioxygenase Aktivität: Umsatzraten verschiedener Benzoate

Um die Analyse der Sequenzvergleiche des *benRXABC*-Clusters aus *P. putida* GJ31 und Stamm GJ31* zu bestätigen, wurden die Umsatzraten verschiedener Benzoate mit den verglichenen Stämmen gemessen (siehe Tab. 3.5.5). *P. putida* GJ31 wurde auf Benzoat, *P. putida* GJ31* auf Benzoat und 3-Chlorbenzoat in Flüssigkultur angezogen. Es wurde eine OD_{546} von 3 eingestellt und jeweils 10 mM einer Benzoatlösung zugegeben. Proben wurden genommen, abzentrifugiert und aus dem Überstand mittels HPLC (siehe Material und Methoden 2.2.5) die Benzoat-Konzentration bestimmt (220 nm, 60% MeOH, 1 ml/min Fluß).

Tab. 3.5.5: Umsatzraten bei $OD_{546} = 3$.

Stamm	angezogen auf	Umsatzrate in $\mu\text{M}/\text{min}$ mit		
		Benzoat	3CBA	4CBA
GJ31	Benzoat	21	11	0
GJ31*	Benzoat	44	34	0
GJ31*	3CBA	92	48	0

Es konnte gezeigt werden, dass *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* sowohl Benzoat als auch 3-Chlorbenzoat umsetzen können. 4-Chlorbenzoat können beide Stämme nicht umsetzen. Benzoat ist für beide Stämme das bessere Substrat. *P. putida* GJ31 wächst nicht auf 3-Chlorbenzoat, kann allerdings dieses Substrat umsetzen. Wie auch die genetische Analyse der Strukturgene *benABC* des *benRXABC*-Clusters für die Nukleotidsequenz gezeigt hat, sind die Benzoat-Dioxygenasen aus beiden Stämmen auch bezüglich ihrer Substratspezifität gleich.

3.5.6 Der *benRXABC*-Cluster in dem Abkömmling *P. putida* QM1

Mittels zweier PCR-Experimente konnte nachgewiesen werden, dass Teile des *benRXABC*-Clusters in *P. putida* QM1 vorkommen: Die PCR mit den Primern Kay29 und Kay30 wies das erwartete 1972 bp große Produkt nach, das für große Teile von BenRXA kodiert. Des weiteren gelang mit den Primern Kay35 und Kay36 der Nachweis des gewünschten 232 bp großen Produkts. Dieses kodiert für den Bereich von *benR*, in dem sich, wie in Kapitel 3.5.4.2 beschrieben, die Nukleotidsequenz von *benR* aus dem Wildstamm GJ31 und von *benR* aus dem Stamm GJ31* in zwei Basen unterscheidet.

P. putida QM1 ist analog zu *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* zum Abbau von Benzoat befähigt. Aus diesem Grund konnte angenommen werden, dass der *benRXABC*-Cluster in diesem Abkömmling analog des Wildstammes GJ31 und zu dem anderen Abkömmling Stamm GJ31* vorliegt.

3.5.7 Induktion des Benzoat-Abbaus und des *meta*-Weges in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31*

Cowles *et al.* (2000) zeigten am Beispiel von BenR aus *Pseudomonas putida*, dass der Benzoat-Dioxygenase-Regulator nicht nur die Expression von *benABC*, sondern auch die Expression wichtiger Enzyme aus dem *meta*-Operon des TOL-Plasmids bewirkt. BenR aus *P. putida* GJ31 ist zu 95% mit diesem Aktivator identisch. Experimente zur Regulation des Benzoat-Abbaus (Ergebnisse und Experimente 3.5.4.2) haben analog zu den Ergebnissen von Cowles *et al.* (2000) aufgezeigt, dass BenR aus *P. putida* GJ31 mit Benzoat als Induktor wirkt. Allerdings konnte keine Wirkung von BenR mit 3-Chlorbenzoat als Induktor nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung des Einflusses von Benzoat und 3-Chlorbenzoat auf die Induktion des Abbaus von Benzoat und der *meta*-Weg-Aktivitäten wurden charakteristische Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von den Induktoren getestet (siehe **Tab.** 3.5.7). Da ein Enzymtest der Benzoat-Dioxygenase auf Grund der Membrangebundenheit des Proteins im Rohextrakt nicht möglich ist, wurde die Aktivität der DHB-Dehydrogenase getestet. Die DHB-Dehydrogenase ist als *benD* Bestandteil des *benRXABCD*-Clusters, wurde aber in dieser Arbeit nicht sequenziert.

Tab. 3.5.7: Enzymaktivitäten.

		in U/g Protein					
Enzym	Substrat	<i>P. putida</i> GJ31			<i>P. putida</i> GJ31*		
		Acetat	Benzoat	3CBA	Acetat	Benzoat	3CBA
DHB-DH	3-Br-DHB	0	42	0	0	33	18
C23O	Catechol	170	553	155	129	167	299
C23O	3-Cl-Catechol	221	404	114	110	156	317

Erläuterungen: DHB: 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure, DH: Dehydrogenase, C23O: Catechol-2,3-Dioxygenase, 3CBA: 3-Chlorbenzoat, 3-Cl-Catechol: 3-Chlorcatechol. *P. putida* GJ31 und Stamm GJ31* wurden auf Acetat angezogen. Beiden wachsenden Stämmen wurde Benzoat bzw. 3-Chlorbenzoat in einer Konzentration von 5 mM zugegeben und die Kulturen für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde Rohextrakt (Material und Methoden 2.2.6) hergestellt und die Enzymtests durchgeführt (Material und Methoden 2.2.11 und 2.2.12).

In *P. putida* GJ31* konnte eine Induktion der DHB-Dehydrogenase durch 3-Chlorbenzoat beobachtet werden, was in *P. putida* GJ31 nicht möglich war. In *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* ist Benzoat im Vergleich zu 3-Chlorbenzoat der bessere Induktor für die DHB-Dehydrogenaseaktivität.

Die Catechol-2,3-Dioxygenasen haben in beiden Stämmen eine hohe konstitutive Aktivität. Die Induktion mit Benzoat in *P. putida* GJ31 und die Induktion mit 3-Chlorbenzoat in *P. putida* GJ31* führten zu erhöhten Aktivitäten der Catechol-2,3-Dioxygenase sowohl für Catechol als auch für 3-Chlorcatechol.

Die Fähigkeit zum Abbau von 3-Chlorbenzoat durch *P. putida* GJ31* scheint allerdings nicht in der Induktion des Regulators *benR* durch 3-Chlorbenzoat begründet zu sein (siehe Experimente und Ergebnisse 3.5.4.2).

3.6 Suche nach einer Integrase *IntI* nach Nield *et al.* (2001)

Neben den Transposons sind Integrasen häufige Bestandteile von Plasmiden, die es erlauben, mobile genetische Elemente aufzubauen und die Übertragung von genetischen Informationen zwischen einzelnen Stämmen zu erlauben (Einleitung 1.3.2). Gerade bei großen degradativen Plasmiden könnte das Vorkommen eines Integrans inklusive Integrase erwartet werden. Deshalb wurde mit der Methode von Nield *et al.* (2001) mittels PCR nach einem Integrase-System gesucht.

Durch PCR mit den Primern HS298 und HS286 konnte mit der DNA der Stämmen *P. putida* GJ31, *P. putida* GJ31* und *P. putida* QM1 ein jeweils 1600 bp großes Produkt erhalten werden. Die Produkte wurden aus dem Gel isoliert. Die Sequenzierung des Produkts aus *P. putida* GJ31 konnte keinen Aufschluss darüber geben, ob es sich bei dem amplifizierten Produkt um Teile einer Integrase handelt. Vielmehr konnte bei einem offenen Leserahmen eine hohe Ähnlichkeit der Nukleotidsequenz von 75% und der Aminosäuresequenz von 70% mit der Glucose-Dehydrogenase Gcd aus *P. aeruginosa* PAO1 festgestellt werden. Gcd aus *P. aeruginosa* PAO1 besteht aus 803 Aminosäuren. Der unvollständige offene Leserahmen (54,4% GC-Gehalt) aus *P. putida* GJ31 kodiert nur für 491 Aminosäuren.

Tab. 3.6: Ähnlichkeiten von Aminosäuresequenzen aus NCBI-Datenbanken mit Gcd aus *P. putida* GJ31.

Spezies	NCBI Acc. No.	Aminosäuren mit Gcd in [%]	
		Identische	Homologe
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	NP_250980.1	70	80
<i>P. putida</i> KT2440	AAN67066.1	66	77
<i>P. fluorescens</i> PfO-1	ZP_00264005.1	64	79
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	AAO57652.1	63	73
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	ZP_00126575.1	59	71

Die Prozentangabe in der Spalte homologe Aminosäuren gibt die Summe aus der Anzahl der identischen und der Anzahl der strukturähnlichen Aminosäuren an. Es wurden 491 Aminosäuren des unvollständig sequenzierten Gcd aus *P. putida* GJ31 mit den bekannten Proteinen verglichen. Das komplette Gcd aus *P. aeruginosa* PAO1 ist zum Beispiel 803 Aminosäuren groß.

3.6.1 Die Glucose-Dehydrogenase Gcd in *P. putida* GJ31

Bei der Suche nach einer Integrase mittels PCR (Experimente und Ergebnisse 3.6) wurde ein Teil eine Glucose-Dehydrogenase gefunden. Glucose-Dehydrogenasen (E.C.-Nummer 1.1.1.47) katalysieren die Reaktion von D-Glucose zu D-Glucono-1,5-Lacton unter Bildung

von NADH (siehe **Abb. 3.6.1.1**) und sind Enzyme des zentralen Metabolismus eines Bakteriums. Bisher wurden dagegen für *P. putida* GJ31 vor allem Enzyme von Abbauwegen für (Chlor-)Aromaten beschrieben.

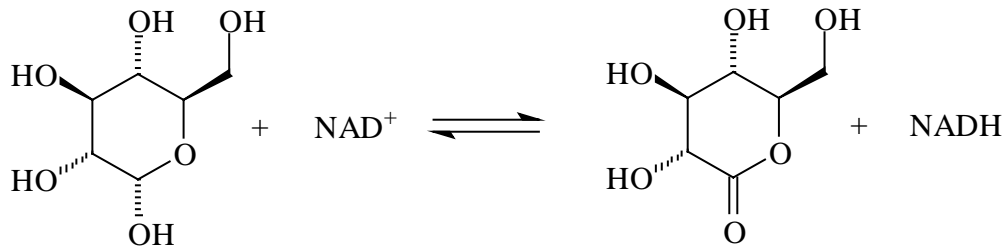


Abb. 3.6.1.1: Glucose-Dehydrogenase katalysierte Reaktion von D(+)-Glucose zu D-Glucono-1,5-Lactone unter Bildung von NADH aus NAD^+ .

In der Aminosäuresequenz von Gcd aus *P. putida* GJ31 konnte das Motiv einer Beta-Propeller-Faltung (smart00564, Cleton-Jansen *et al.*, 1990) gefunden werden. Diese Strukturen treten in Enzymen mit Pyrroloquinolin-Quinon (PQQ, siehe **Abb. 3.6.1.2**) als Kofaktor auf, wie zum Beispiel Glucose-Dehydrogenasen oder Methanol-Dehydrogenasen (Xia *et al.*, 1996).

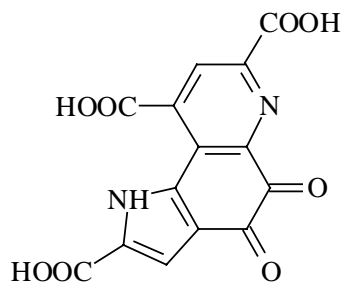


Abb. 3.6.1.2: PQQ: Pyrroloquinolin-Quinon (2,7,9-Tricarboxyl-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-4,5-dione), ein Redox-Kofaktor aus vielen Enzymen.

Die Beta-Propeller-Faltung wurde als Motiv in einer Glucose-Dehydrogenase aus *Acinetobacter calcoaceticus* beschrieben: Das lösliche Monomer der Glucose-Dehydrogenase hat eine Beta-Propeller-Faltung, bestehend aus sechs viersträngigen antiparallelen Beta-Faltblättern, die um eine pseudo 6-fache Symmetrieachse angeordnet sind. Das Enzym bindet drei Calciumionen pro Monomer, wobei zwei an der Dimer-Kopplungsstelle lokalisiert sind. Das dritte bindet an dem putativen aktiven Zentrum, wo es möglicherweise den Kofaktor PQQ bindet und funktionalisiert (Oubrie *et al.*, 1999).

```

Gcd_GJ31 181 GERYSPKQITPANVGNLTEAWRIRTGDMPTDKDPVELTNQN TPLKVNGLYACTAHSKV
Gcd_PA01 GDRYSPLKQITPANVGQLEEAWRIRTGDLPTADDPLELTNEN TPLKVNGLYACTAHSKV
Gcd_KT2440 GDRYSPLRQITPQNAYRLEEAWRIRTGDLPTENDPVELTNQN TPLKVNGLYACTAHSRL
Gcd_PfO-1 GDRYSPLKQITPANVGKLEAWRIQTGDLPTADDPVELTNEN TPLKANGMLYACTAHSKV
Gcd_DC3000 GDRYSPLAQITPQNVNTLQPAWTYRTGDI PGPNDPGETTAEN TPLKVNGLYVCTPHSQV
Gcd_B728a GDRYSPLAQITPENVNKLEPAWTYRTGDI PGPNDPGETTAEN TPLKVNGLYVCTPHSQV
*:***** *. * . * ** :***:* .** * * :*****.*****.***.***:

Gcd_GJ31 LALDPDTGKEIWRFD P Q I Q G P N G N D F R G W A H M T C R G V S Y Y D E A N Y S K S D A I S T P A V L S A A 300
Gcd_PA01 LALDPDTGAEIWRFD P Q I Q S P V G -- F K G F A H M T C R G V S Y Y D E E Q Y A R S D V G A P P A A L S E A
Gcd_KT2440 LALDPDTGAEIWRYP Q V K S P T G T - F K G F A H M T C R G V S Y Y D E N R Y V S R D - G S P A P K I T D A
Gcd_PfO-1 LALDPDTGKELWRFD P Q I K S P E G -- F K G F A H M T C R G V S Y Y D E A A Y A K S E - N A A S T V I S E A
Gcd_DC3000 I A L D P D S G K E I W R F D P K L S T Q N A A N F K G W A H M T C R G V T Y H D D A A Y A A S A P A Q S P A A P A A -
Gcd_B728a I A L D P D S G K E I W R F D P K L S T Q N A A N F K G W A H M T C R G V T Y H D D A A Y A A S A P A Q S P T V P A A D
:*****:* * :***:***:.. . * :*****:***: * ... :

```

Abb. 3.6.1.3: Ausschnitt der Aminosäuresequenzen der Glucose-Dehydrogenase Gcd aus *P. putida* GJ31 und verwandten Proteine. Dargestellt ist das Motiv einer putativen Beta-Propeller-Faltung (smart00564), es ist dunkelgrau hinterlegt und in weißer Schrift gehalten. Erläuterungen: *: Übereinstimmung der Aminosäuren, :: strukturell sehr ähnliche Aminosäuren, .: strukturell ähnliche Aminosäuren Aminosäuresequenzen: Gcd_GJ31 (*P. putida* GJ31, diese Arbeit), Gcd_PA01 (*P. aeruginosa* PA01, NCBI Acc. No. NP_250980.1, Stover *et al.*, 2000), Gcd_KT2440 (*P. putida* KT2440, NCBI Acc. No. AAN67066.1, Nelson *et al.*, 2002), Gcd_PfO-1 (*P. fluorescens* PfO-1, NCBI Acc. No. ZP_00264005.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation), Gcd_DC3000 (*P. syringae* pv. *tomato* DC3000, NCBI Acc. No. AAO57652.1, Buell *et al.*, 2003), Gcd_B728a (*P. syringae* pv. *syringae* B728a, NCBI Acc. No. ZP_00126575.1, NCBI Microbial Genomes Annotation Project – ohne Publikation).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Organisation der Gene des *meta*-Weges auf dem Plasmid pKW1 in *P. putida* GJ31 untersucht. Es wurde geklärt, welche Gene des *meta*-Weges sich auf dem Plasmid pKW1 befinden und in welchem genetischen Umfeld sie angesiedelt sind. Der *meta*-Weg umfasst mehrere enzymatische Reaktionsschritte (siehe Einleitung 1.2.2). In *P. putida* GJ31 konnte die Enzymaktivität jedes Schritts im Rohextrakt gemessen werden (Mars *et al.*, 1997, 1999; Kranz, 2001; Kunze, 2002; Zerlin, 2002, Reifenrath, pers. Mitteilung). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es für jeden Reaktionsschritt mindestens ein Gen in *P. putida* GJ31 gibt, das nach Sequenzvergleichen über die jeweilige putative Aktivität verfügt. Dies konnte für die meisten Gene durch Expression und Enzymtests bestätigt werden. Eine Übersicht aller 47 identifizierten offenen Leserahmen in *P. putida* GJ31 liefert Tabelle 4.

Tab. 4: Übersicht aller 47 identifizierten offenen Leserahmen in *P. putida* GJ31.

Gen	Protein				Höchste Identität			
	Koordination (5'-3'):	G+C Gehalt [%]	AS-Zahl	Molekül- masse [kDa]	Funktion	Id. [%]	Stamm	NCBI Acc. No.
	pKW1 ^{a,b,c}							
<i>traN</i>	203-394	58,3	63	6,48	Transferprotein	58	<i>Salmonella typhimurium</i>	NP_511194.1
<i>traE</i>	391-1113	57,7	240	26,98	DNA-Topoisomerase III	46	<i>Salmonella typhimurium</i>	NP_511195.1
<i>traO</i>	1113-1991	56,0	292	32,53	Transferprotein	46	<i>Salmonella typhimurium</i>	NP_511196.1
<i>traF</i>	1988-3145	59,8	385	41,29	Transferprotein	43	<i>Salmonella typhimurium</i>	NP_511197.1
<i>traG</i>	3157-4188	59,5	343	38,09	Transferprotein	47	<i>Salmonella typhimurium</i>	NP_511198.1
<i>tnpA1</i>	5101-6681	66,0	526	57,98	Transposase	72	<i>P. huttiensis</i>	AF342828
<i>cbzT</i>	7246-7605	58,6	120	12,75	Ferredoxin	100	<i>P. fluorescens</i>	AAP51202.1
<i>cbzE1</i>	7617-8561	55,7	315	34,95	Catechol-2,3-Dioxygenase	97	<i>P. fluorescens</i>	AAP51203.1
<i>cbzX</i>	8642-9106	64,7	155	15,72	unbekannt	100	<i>P. fluorescens</i>	AAP51204.1
<i>cbzG</i>	9144-10604	58,8	486	52,45	Acetaldehyd-Dehydrogenase	100	<i>P. fluorescens</i>	AAP51205.1
GST	10644-11252	55,7	204	22,08	Glutation-S-Transferase	73	<i>P. putida</i>	BAB62052
<i>tnpA2</i>	11556-12833	66,0	425(526)	54,49	Transposase	69	<i>Pseudomonas</i> sp.	CAA54033.1
<i>cbzJ</i>	13085-13879	57,1	264	28,51	2-Oxopent-4-enoat- Hydratase	72	<i>P. huttiensis</i>	AF342828
<i>tnpA3</i>	14595-14753		106		Transposase-Fragment	35	<i>Comamonas testosteroni</i>	AB029044
<i>tnpR</i>	16713-17312	65,4	200	21,88	Resolvase	87	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	NP_946127.1
<i>tnpA4</i>	17296-20325	60,7	1008	115,21	Transposase	98	<i>Pseudomonas</i> sp.	NP_943128.1
ORF1	881-3	54,7	293(427)	32,62	Membranporin, OprD-Familie	58	<i>Azotobacter vinelandii</i>	ZP_00088592
ORF2	2142-926	56,6	403	41,81	Transporterprotein	52	<i>Azotobacter vinelandii</i>	ZP_00088823

Fortsetzung von Tab. 4:								
<i>cbzK</i>	3422-2412	57,4	336	36,16	2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolasen	78	<i>E. coli</i>	NP_414886
<i>cbzQ</i>	4372-3434	56,4	312	32,71	Acetaldehyd-Dehydrogenase	78	<i>P. putida</i>	AAL83664.1
						77	<i>E. coli</i>	NP_414885.1
<i>cbzJ2</i>	5181-4369	71,1	270	28,07	2-Oxopent-4-enoat- Hydratase	67	<i>E. coli</i>	AP002551
<i>cbzF</i>	5940-5194	55,2	248	27,59	2-HMS-Hydrolase	46	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	ZP_00245306
<i>cbzE2</i>	7121-6075	58,1	315	34,53	Catechol-2,3-Dioxygenase	90	<i>P. putida</i>	AAG09232.1
<i>gntR</i>	7358-8023	52,6	221	24,52	Regulator (Repressor)	52	<i>Dechloromonas aromatica</i>	ZP_00348649
ORF3	8935-8018	51,4	305	33,76	<i>meta</i> -Weg Phenolabbau	37	<i>Burkholderia cepacia</i>	ZP_00216971
ORF4	9503-8964	53,3	179	19,30	unbekannt	48	<i>Rhizobium</i> sp.	AAQ87234.1
<i>nahI</i>	1-711	66,9	236(486)	nb	2-HMS-Dehydrogenase	93	<i>P. stutzeri</i>	BAA31265.1
<i>nahN</i>	723-1586	67,4	288	31,90	2-HMS-Hydrolase	96	<i>P. stutzeri</i>	AAD02150.1
<i>nahL</i>	1583-2368	65,4	261	27,90	2-Oxopent-4-enoat- Hydratase	91	<i>Pseudomonas</i> sp.	AAO19118.1
						91	<i>P. stutzeri</i>	AAD002151.1
<i>nahO</i>	2383-3306	65,4	308	33,02	Acetaldehyd-Dehydrogenase	98	<i>P. stutzeri</i>	AF039534
<i>nahM</i>	3318-4358	65,3	347	37,27	2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase	100	<i>P. stutzeri</i>	AAD02153
<i>nahK</i>	4355-5149	62,5	264	28,56	4-Oxalocrotonat-Decarboxylase	97	<i>P. stutzeri</i>	AAD02154.1
<i>nahJ</i>	5198-5389	65,1	63	6,84	4-Oxalocrotonat-Tautomerase	95	<i>P. stutzeri</i>	AAD02155.1
<i>nahX</i>	5420-5860	64,7	147	15,10	unbekannt	61	<i>P. putida</i>	AAD13222.1
ORF5	738-30	48,0	237	26,36	unbekannt	-	-	-
<i>benR</i>	1162-2118	60,2	318	36,42	Regulator	96	<i>P. putida</i>	NP_745303.1
<i>benX</i>	2200-3096	49,9	299	33,07	unbekannt	40	<i>P. putida</i>	NP_745304.1
<i>benA</i>	3251-4429	63,0	318	36,42	Bzt-Dioxygenase-A	99	<i>P. putida</i>	AAN68769.1
<i>benB</i>	4604-5089	60,1	162	19,20	Bzt-Dioxygenase-B	96	<i>P. putida</i>	AAF63449.1
<i>benC</i>	5162-5842	63,9	227(336)	nb	Bzt-Dioxygenase-Ferredoxin-Reduktase	91	<i>P. putida</i>	AAF63450.1
Chromosom ^b								
<i>cbzAa</i>	80-1432	60,2	450	51,04	CBz-Dioxygenase-A	99	<i>P. putida</i>	AAA26005.1
<i>cbzAb</i>	1543-2106	58,5	187	22,02	CBz-Dioxygenase-B	100	<i>P. putida</i>	AAA26006.1
<i>cbzAc</i>	2115-2438	56,8	107	11,89	Ferredoxin	100	<i>P. putida</i>	AAA26007.1
<i>cbzAd</i>	2438-3670	63,7	410	42,91	NADH-Reduktase	99	<i>P. putida</i>	AAA26008.1
<i>cbzB</i>	3667-4494	60,3	275	28,80	CBz-dihydrodiol-Dehydrogenase	99	<i>P. putida</i>	AAA26009.1
<i>cbzE3</i>	4510-5384	58,3	Abbr.	nb	Catechol-2,3-Dioxygenase	95	<i>P. putida</i>	AAA26010.1
ungeklärt ^c								
<i>alda</i>	474-1994	62,5	507	55,15	Chloracetaldehyd-Dehydrogenase	88	<i>P. putida</i>	NP_742708.1

Erläuterungen: a: Mars *et al.* (1999) – NCBI Acc. No. AF109307, b: Kunze (2002) – NCBI Acc. No. AY831461, AY831462, AY831463, c: diese Arbeit – NCBI Acc. No. AY831457, AY831458, AY831459, AY831460. Die Koordination ist bezogen auf das 5'-Ende des jeweiligen sequenzierten Bereichs und gibt Auskunft über die Orientierung der ORFs, AS: Aminosäuren, Abbr.: die Aminosäuresequenz von CbzE3 hat einen Sequenzabbruch (Punktmutation) – das Protein ist nicht funktionsfähig, nb: nicht bestimmbar, Id.: Identität der Aminosäuren im Sequenzvergleich, HMS: Hydroxyumuconsäuresemialdehyd, Bzt: Benzoat, CBz: Chlorbenzol, -: kein Eintrag in Datenbanken. Bei unvollständig sequenzierten offenen Leserahmen ist die Anzahl der kodierenden Aminosäuren auf Grundlage der hier erlangten Sequenzierung angegeben, die Angabe in Klammern gibt zum Vergleich die Gesamtzahl der Aminosäuren des am nächsten verwandten Proteins an.

Die Sequenzdaten lassen zudem Spekulationen über die Evolution von Abbauwegen am Beispiel von *P. putida* GJ31 zu. Mögliche Vorgänge, die zur Generierung der Abkömmlinge *P. putida* GJ31* und *P. putida* QM1 mit veränderten Eigenschaften aus *P. putida* GJ31 führen, wurden untersucht.

4.1 Gencluster in *P. putida* GJ31

Mars *et al.* (1999) und Kunze (2002) isolierten und sequenzierten im Wildstamm *Pseudomonas putida* GJ31 zwei Gencluster: *cbzTEXG*-Cluster und das *meta*-Operon (siehe Einleitung 1.4).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden weitere Gencluster in *P. putida* GJ31 untersucht. Mittels Cluster-Analyse konnte unter Verwendung von PCRs mit genspezifischen heterologen Primern drei Sequenzbereiche isoliert und sequenziert werden. Dies waren der *nahINLOMKJX*-Cluster (Experimente und Ergebnisse 3.2), der *benRXABC*-Cluster (Experimente und Ergebnisse 3.5) und das Gen *aldA* (Experimente und Ergebnisse 3.4). Zusätzlich konnte der Bereich um den *cbz-TEXG*-Cluster sequenziert und der Transposonbereiches Tn5501 identifiziert werden (Experimente und Ergebnisse 3.3).

Auf Grundlage der Sequenzierung der Gencluster des Wildstamms *P. putida* GJ31 wurden dessen Abkömmlinge *P. putida* GJ31* (Experimente und Ergebnisse 3.1.1) und *P. putida* QM1 (Experimente und Ergebnisse 3.1.2) untersucht. Ziel war der Nachweis von Unterschieden in den Nukleotidsequenzen der Abkömmlinge im Vergleich zu den Sequenzen des Wildstamms GJ31. Sequenzierungen, PCR-Experimente und Hybridisierungen wurden durchgeführt. Der *nahINLOMKJX*-Cluster liegt in *P. putida* GJ31* unverändert vor aber nicht in *P. putida* QM1. Dagegen liegt der *benRXABC*-Cluster in *P. putida* QM1 analog zu *P. putida* GJ31 und Stamm GJ31* vor (siehe Experimente und Ergebnisse 3.4.7). Der *benRXABC*-Cluster aus *P. putida* GJ31* zeigt die gleiche Organisation wie der Gencluster in *P. putida* GJ31. Allerdings weist die Nukleotidsequenz von *benR* aus Stamm GJ31* zwei Mutationen im Vergleich zu dem Regulatorgen aus *P. putida* GJ31 auf. Der *cbzTEGX*-Cluster und seine angrenzenden Sequenzbereiche gleichen in *P. putida* GJ31* dem entsprechenden Bereich aus *P. putida* GJ31. Dagegen scheint in *P. putida* QM1 der komplette Bereich *cbzTEXG* zu fehlen. Möglicherweise ist dort eine andere Sequenz von mindestens 4 kbp inseriert (Experimente und Ergebnisse 3.3.5).

4.1.1 Der *nahINLOMKJX*-Cluster in *P. putida* GJ31

Wie unter Experimente und Ergebnisse 3.2.1 beschrieben, wurden rund 5,9 kbp des Gen-Clusters *nahINLOMKJX* in *P. putida* GJ31 sequenziert. Ausgang der Untersuchungen war die Suche nach Genen, die für eine 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und –Tautomerase kodieren. Teile der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase wurden durch eine PCR mit heterologen Primern auf Grundlage der Nukleotidsequenz von *P. putida* PaW1 amplifiziert und nachfolgend sequenziert. Es wurden sieben vollständige offene Leserahmen und ein unvollständiger offener Leserahmen sequenziert. Es handelt sich hier um Gene, die für Enzyme des *meta*-Weges kodieren (siehe **Tab.** 4.1.1). NahX aus *P. putida* GJ31 konnte abweichend zu den anderen Enzymen des *nah*-Clusters keine Funktion zugewiesen werden. Die Aminosäuresequenz von NahX aus *P. putida* GJ31 ist 61% ähnlich zu NahX in *P. putida* Stamm G7, dem ebenfalls keine Funktion zugewiesen werden konnte (Grimm und Harwood, 1999 - NCBI Acc. No. AAD13222.1). Ansonsten ist GJ31-NahX zu NahX aus dem nächsten Verwandten *P. stutzeri* AN10 (Bosch *et al.*, 2000) vollständig identisch. NahX aus *P. stutzeri* AN10 liegt jedoch nicht in Datenbanken vor, der offene Leserahmen konnte aber aus der Sequenz (NCBI Acc. No. AF039534) abgeleitet werden.

Tab. 4.1.1: Die Proteine des *nahINLOMKJX*-Clusters in *P. putida* GJ31

Proteine des <i>nah</i> -Clusters in <i>P. putida</i> GJ31			Identische Aminosäuren der Proteine [%] mit		
Bez.	Funktion	GC-Gehalt des Gens [%]	<i>P. stutzeri</i> AN10	<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. S-47
NahI	2-HMS-Dehydrogenase	66,9	92	92	91
NahN	2-HMS-Hydrolase	67,4	96	88	87
NahL	2-Oxopent-4-enoat-Hydratase	65,4	91	90	91
NahO	Acetaldehyd-Dehydrogenase*	65,4	98	98	98
NahM	2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase	65,3	100	99	99
NahK	4-Oxalocrotonat-Decarboxylase*	62,5	97	96	95
NahJ	4-Oxalocrotonat-Tautomerase	65,1	95	92	85
NahX	unbekannt	64,7	100	-	-

Erläuterungen: Bez.: Bezeichnung, -: es lag kein vergleichbares Protein in diesem Stamm veröffentlicht vor, HMS: Hydroxyumuconsäuresemialdehyd, Proteine, die mit * gekennzeichnete Funktionen aufweisen, wurden auf ihre hier angegebene Enzymaktivität erfolgreich getestet. NahX aus *P. stutzeri* AN10 liegt nicht veröffentlicht in Datenbanken vor, der offene Leserahmen war aber aus der bekannten Sequenz abzuleiten.

Der in *P. putida* GJ31 sequenzierte *nah*-Gencluster hat einen hohen GC-Gehalt von rund 65%. Die hier sequenzierten Gene bzw. teilweise charakterisierten Enzyme haben eine hohe Ähnlichkeit mit den jeweiligen Genen bzw. Proteinen der *nah*-Cluster aus *P. stutzeri* AN10

(Bosch *et al.*, 2000), *P. putida* (Irie *et al.*, 2003) und *Pseudomonas* sp. S-47 (Park *et al.*, 2000)

(siehe **Tab.** 4.1.1 und **Abb.** 4.1.1).

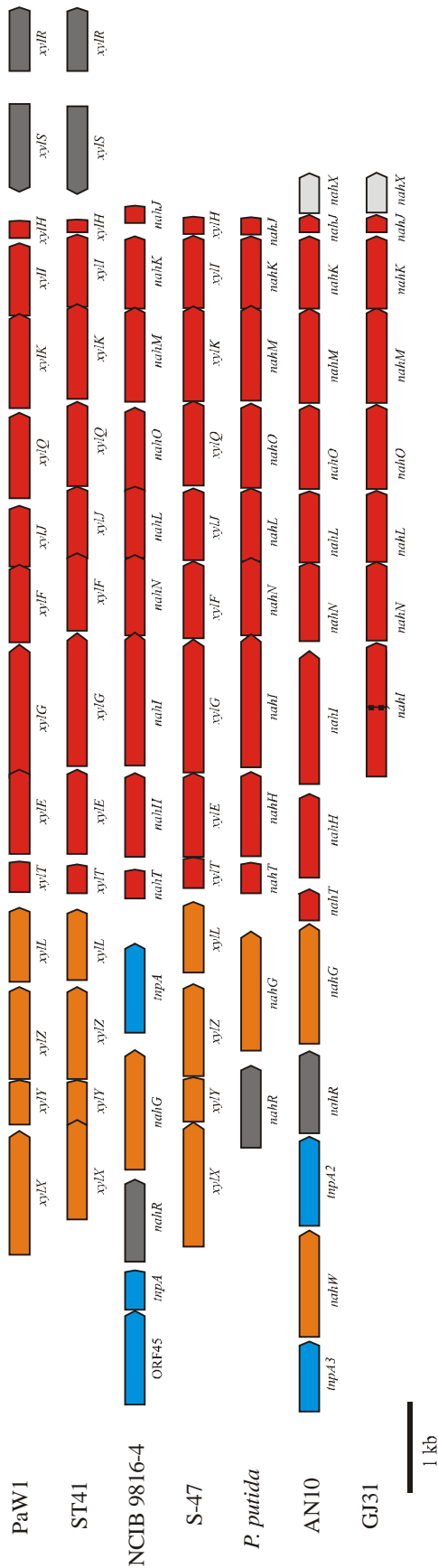


Abb. 4.1.1: Der *nahINLQMKJX*-Cluster aus *P. putida* GJ31 im Vergleich zu verwandten Genclustern aus anderen Bakterienstämmen. Die Cluster sind mit Abnahme ihrer Ähnlichkeit zu Stamm GJ31 aufsteigend angeordnet. Erläuterungen: GJ31: *P. putida* GJ31 (diese Arbeit), AN10: *P. stutzeri* AN10 (AF039534), *P. putida*: *P. putida* (AY294313.1), S-47: *Pseudomonas* sp. S-47 (AF320981.3), NCIB 9816-4: *P. putida* NCIB 9816-4 (AF491307.2), ST41: *Pseudomonas* sp. ST41 (AY599747.1), PaW1: *P. putida* PaW1 (PPU344068).

Rot markierte Gene stehen für Gene, die Enzyme des *meta*-Weges kodieren, orange markierte Gene kodieren für Enzyme des Toluat-, Benzoat- bzw. Salicylat-Abbaus, blau markierte Gene kodieren für Transposasen, dunkelgraue für Regulatoren und hellgraue für Enzyme markierte Gene kodieren für Enzyme unbekannter Funktion. Genbezeichnungen und die zugehörigen Enzymbezeichnungen: *nahR*: Regulator, *nahG*: Salicylat-Hydroxylase, *nahT*: Ferredoxin, *nahH*: Catechol-2,3-Dioxygenase, *nahI*: 2-Hydroxymuonsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, *nahN*: 2-Hydroxymuonsäuresemialdehyd-Hydrolyase, *nahL*: 2-Oxopent-4-enoat-Hydrolyase, *nahO*: Acetaldehyd-Dehydrogenase, *nahM*: 2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase, *nahK*: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, *nahJ*: 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, *nahX*: unbekanntes Gen, *xylX*: Benzoat-Dioxygenase – große Untereinheit, *xylY*: Benzoat-Dioxygenase – kleine Untereinheit, *xylZ*: Benzoat-Dioxygenase-Reduktase, *xylL*: 4-Chlorbenzoat-dihydrodiol-Dehydrogenase, *xylT*: Ferredoxin, *xylE*: Catechol-2,3-Dioxygenase, *xylG*: 2-Hydroxymuonsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, *xylF*: 2-Hydroxymuonsäuresemialdehyd-Hydrolyase, *xylI*: 2-Oxopent-4-enoat-Hydrolyase, *xylK*: 2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase, *xylQ*: Acetaldehyd-Dehydrogenase, *xylJ*: 2-Hydroxymuonsäuresemialdehyd-Hydrolyase, *xylH*: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, *xylR*: Regulator, *xylS*: Regulator, *xylR*: Regulator, *impA*: Transposasen. Die gesamte Abbildung ist maßstabsgetreu.

Der *nahINLOMKJX*-Cluster aus *P. putida* GJ31 zeigt beim Vergleich der genetischen Struktur und der genetischen Umgebung mit denen verwandter Genclustern einige Ähnlichkeiten auf (siehe **Abb.** 4.1.1). So ist die Organisation der Gene in ihrer Abfolge gleich. Weiterhin sind die jeweiligen Gene gleich groß. Außerdem ist der GC-Gehalt der verglichenen Gene sehr ähnlich und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen haben eine Ähnlichkeit von rund 90% oder mehr mit den am nächsten verwandten Proteinen.

Es konnten aber auch Unterschiede zwischen dem *nahINLOMKJX*-Cluster aus *P. putida* GJ31 und verwandten Genclustern festgestellt werden. Der wichtigste Unterschied ist, dass der *nahINLOMKJX*-Gencluster aus *P. putida* GJ31 unvollständig ist und nicht wie die am nächsten verwandten Gencluster über Gene verfügt, die für ein Ferredoxin und eine Catechol-2,3-Dioxygenase kodieren. Dies konnte durch PCR-Experimente (Experimente und Ergebnisse 3.2.1) nachgewiesen werden. Der *nahINLOMKJX*-Gencluster aus *P. putida* GJ31 endet wahrscheinlich direkt stromaufwärts des offenen Leserahmens *nahI*. Der offene Leserahmen *nahI* aus *P. putida* GJ31 liegt im Vergleich zu *nahI* aus *P. stutzeri* AN10 um rund 100 bp näher an dem stromabwärts folgenden Gen *nahN*.

Stromaufwärts der Gene, die für eine Ferredoxin (*nahT*) und eine Catechol-2,3-Dioxygenase (*nahH*) kodieren, liegen in *P. stutzeri* AN10 Gene, die für den Salicylat-Abbau (Salicylat-Hydroxylase, *nahW* und *nahG*), für einen Regulator (*nahR*) und für zwei Transposasen (*tnpA2* und *tnpA3*) kodieren. Diese Gene sind in anderen verwandten Stämmen in ähnlicher Weise stromauf- bzw. stromabwärts der *meta*-Weg-Gene verteilt (siehe **Abb.** 4.1.1). Stromaufwärts von allen Clustern (siehe **Abb.** 4.1.1) liegen Gene des Benzoat- (*Pseudomonas* sp. S-47), Toluat- (*Pseudomonas* sp. ST41, Stallwood *et al.*, 2004 und *P. putida* PaW1, Greated *et al.*, 2002) oder Salicylat-Abbaus (*P. putida*, *P. putida* NCBI 9816-4, Zylstra und Dennis, 2002). Regulatorgene wurden stromaufwärts des Ferredoxin-kodierenden Gens *nahT* bei *P. putida* (*nahR*) und *P. putida* NCBI 9816-4 (*nahR*) nachgewiesen. In *Pseudomonas* sp. ST41 und *P. putida* PaW1 liegen die Regulatorgene *xylS* und *xylR* stromabwärts der *meta*-Weg-Enzym-kodierenden Gene. Stromaufwärts des Ferredoxingens *nahT* wurden in *P. putida* NCBI 9816-4 drei offene Leserahmen nachgewiesen, die für eine putative Transposase- oder Integrasefunktion (*tnpA*, ORF45) kodieren.

Die Beispiele zeigen, dass die Gencluster *nahTHINLOMKJ* und *xylTEGFJQKIH* aus verschiedenen Bakterienstämmen in ihrer Organisation und Zusammenstellung sehr ähnlich sind und ihre Gene gleichfalls für Enzyme des *meta*-Weges kodieren. Die Gencluster

nahTHINLOMKJ und *xy/TEGFJQKIH* zeigten in allen Stämmen eine Kombination mit Genen, die für Enzyme des Abbaus von Benzoat, Toluat bzw. Salicylat kodieren. Außerdem konnten Regulatoren und Transposasen bzw. eine putative Integrase in direkter genetischer Umgebung der Gencluster anchgewiesen werden. Es lässt sich somit feststellen, dass die Gencluster *nahTHINLOMKJ* und *xy/TEGFJQKIH* katalysiert durch die Transposasen bzw. Integrasen eine hohe genetische Mobilität aufweisen können. Dies würde die große Verbreitung der recht konservierten Cluster *nahTHINLOMKJ* bzw. *xy/TEGFJQKIH* erklären.

4.1.2 Der *cbzTEXG*-Cluster aus *P. putida* GJ31 und die angrenzenden Sequenzbereiche *tra*-Operon und Transposonbereich Tn5501

Mars *et al.* (1999) und Kunze (2002) gelang die Sequenzierung des *cbzTEXG*-Clusters bis zu einem Bereich stromabwärts des Transposasefragmentes *tnpA3* (siehe **Abb.** 4.1.2.1 und Einleitung 1.4). Kunze (2002) vermutete einen Transposonbereich stromabwärts im Anschluss an die Transposase *tnpA3*, der dem Transposonbereich Tn5501 aus *P. putida* Stamm H (Lauf *et al.*, 1998) gleicht. Deshalb wurden auf Grundlage der Nukleotidsequenz von Tn5501 aus *P. putida* H (NCBI Acc. No. Y09450) Primer generiert, die eine Amplifikation und Sequenzierung des Transposonbereiches in *P. putida* GJ31 ermöglichten (siehe Experiment und Ergebnisse 3.3.1).

Es konnte ein Inverted Repeat im Transposonbereich Tn5501 nachgewiesen werden. Dabei handelt sich um ein unvollständiges 38/18 Δ -x-IS Element, das im sequenzierten Bereich 94% kompatible Übereinstimmungen der Nukleotide des Δ -x-ISR- und Δ -x-ISL-Bereichs des IR aufweist. Die Sequenz des Δ -x-ISR-Elements ist in *P. putida* GJ31 analog zu *P. putida* H (Lauf *et al.*, 1998, NCBI Acc. No. Y09450) unvollständig. Mit weiteren Vertretern von terminalen IRs der Tn3-Familie weist es jedoch nur geringe Ähnlichkeiten auf (siehe Experimente und Ergebnisse 3.3.3, **Tab.** 3.3.3.2). Dies wurde auch von Lauf *et al.* (1998) für *P. putida* H beschrieben. Lauf *et al.* (1998) stellten zudem fest, dass das konservierte TAAG Motiv am inneren Ende des IR in Tn5501 fehlt. Gleiches gilt für das hier beschriebene IR.

Tn5501 aus *P. putida* GJ31 beinhaltet zudem zwei offene Leserahmen, *tnpR* (Resolvase) und *tnpA4* (Transposase). Nukleotid- und Proteinsequenzanalysen zeigen, dass Tn5501 aus *P. putida* GJ31 nicht, wie von Kunze (2002) postuliert, vollständig mit Tn5501 aus *P. putida* Stamm H identisch, sondern nur zu rund 80-90% ähnlich ist. Der Transposonbereich Tn5501 aus *P. putida* GJ31 ist dem Transposonbereich aus *Pseudomonas* sp. ND6 (Li *et al.*, 2004)

wesentlich ähnlicher als Tn5501 aus *P. putida* H. Die Ähnlichkeit zu Tn5501 aus *Pseudomonas* sp. ND6 liegt bei 87 bis 98% (siehe **Tab. 4.1.2**).

Tab. 4.1.2: Die Proteine des Transposonbereiches Tn5501 in *P. putida* GJ31

Proteine des Bereiches Tn5501 in <i>P. putida</i> GJ31		Identische Aminosäuren der Proteine [%] mit		
Bez.	Funktion	GC-Gehalt des Gens [%]	<i>Pseudomonas</i> sp. ND6	<i>P. putida</i> Stamm H
TnpR	Resolvase	65,4	87	81
TnpA4	Transposase	60,7	98	90

Erläuterungen: Bez.: Bezeichnung.

Der Transposonbereich Tn5501 ist ein mobiles genetisches Element der Tn3-Familie der kryptischen Transposons bzw. ist ein Mitglied der Tn501 Unterfamilie. Neben der Transposase *tnpA4* als Bestandteil von Tn5501 gibt es im Sequenzbereich des rund 21 kbp großen *cbzTEGX*-Clusters noch drei weitere Transposasen: *tnpA1-3*.

Die offenen Leserahmen *tnpA1* und *tnpA2* kodieren für 526 und 425 Aminosäuren und weisen in ihrer Sequenz große Ähnlichkeiten mit Transposasen auf. Dabei stimmen die 425 Aminosäuren von *tnpA2* vollständig mit dem carboxyterminalen Bereich von *tnpA1* überein. Der Nukleotidsequenzvergleich von *tnpA1* und *tnpA2* zeigt, dass dem Transposase-Gen *tnpA2* im Bereich stromaufwärts genau 140 bp fehlen, während die beiden Transposase-Gene allerdings über die restlichen 1441 bp zu 100% identisch sind. Auffallend ist, dass die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz der beiden im Bereich stromabwärts vollkommen identischen Transposasen *tnpA1* und *tnpA2* etwa 195 Nukleotide nach dem Stopcodon abrupt abbricht. Kurz vor dem Abbruch der Sequenzen konnte ein 38-bp-Motiv ausgemacht werden, welches ebenso im Bereich stromabwärts von sequenzähnlichen Transposasen zu beobachten ist. Hinweise darauf, ob durch den verkürzten Leserahmen von *tnpA2* 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 *tnpA2* in der Länge korrespondiert und die ebenfalls einen um 101 Aminosäuren verkürzten aminoterminalen Bereich besitzt. Stromabwärts von *cbzJ* folgt mittelbar ein 106 bp langes Element, welches beim Vergleich der Nukleotidsequenz mit Datenbanken als Bestandteil einer terminalen Sequenzwiederholung des IS-Elementes IS1071 identifiziert wurde. Diesem schließt sich unmittelbar ein zu IS1071 gehörender offener Leserahmen *tnpA3* für die Transposase von IS1071 an, der nach 53 Aminosäuren abrupt unterbrochen wird. Die

Unterbrechung wird durch eine 38 bp lange invertierte Sequenzwiederholung, dem Δ -x-ISR-Bereich des IRs des Transposon Tn5501 verursacht.

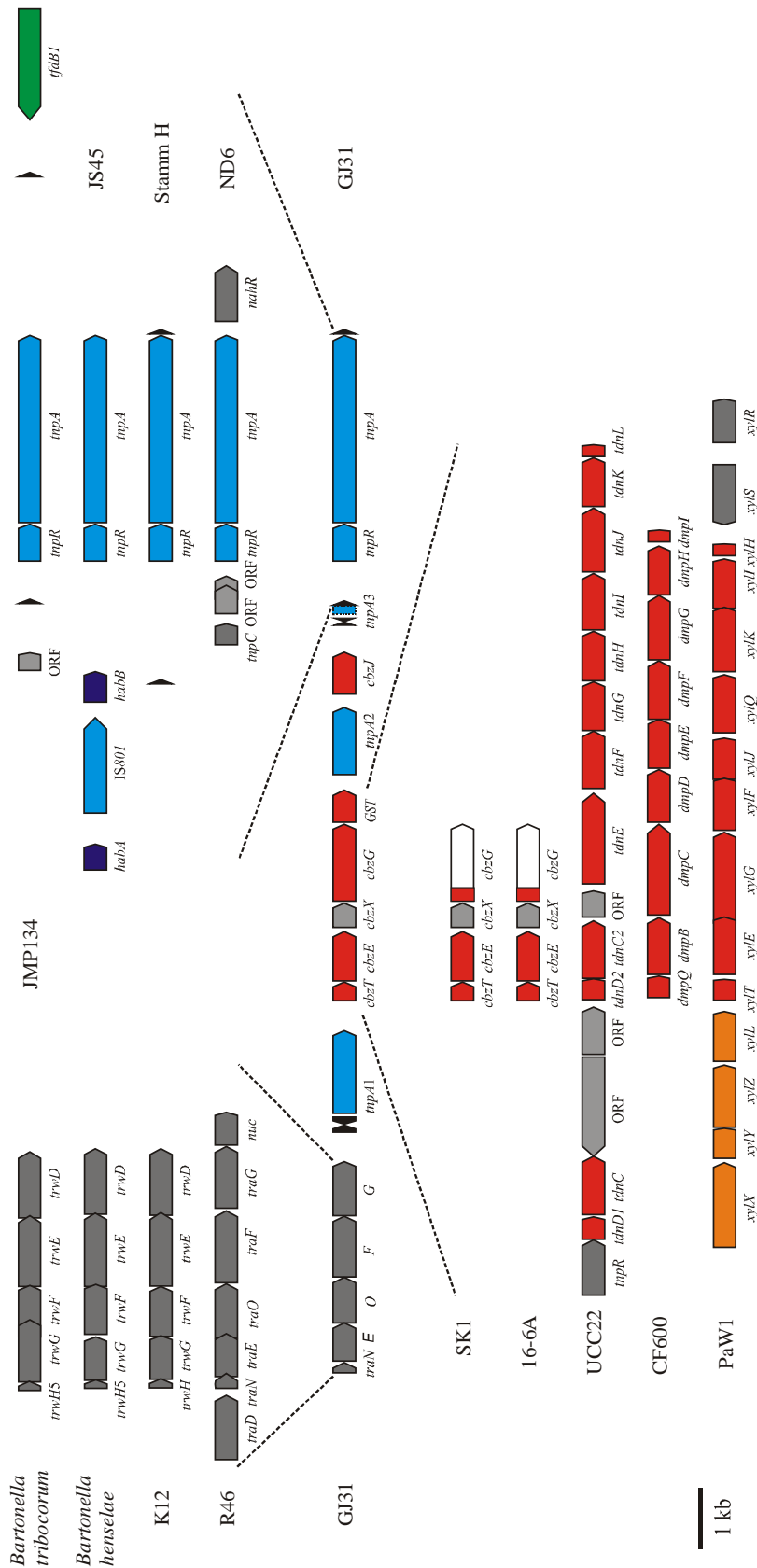


Abb. 4.1.2.1: Der *cbzTEXG*-Cluster aus *P. putida* GJ31 im Vergleich zu verwandten Genclustern aus anderen Bakterienstämmen. Die Cluster sind mit Abnahme ihrer Ähnlichkeit zu Stamm GJ31 in größerem Abstand angeordnet. Erläuterungen: GJ31: *P. putida* GJ31 (diese Arbeit), R46: *Salmonella typhimurium* IncN-Plasmid R46 (NC_003292), K12: *E. coli* K12 (X81123), *Bartonella henselae*: *Bartonella henselae* Stamm Houston-1 (NC_005956.1), *Bartonella tribocorum*: *Bartonella tribocorum* (AJ496288), SK1: *P. fluorescens* SK1 (AY267191), UCC22: *P. putida* UCC22 (D85415), CF600: *Pseudomonas* sp. CF600 (X60835), PaW1: *P. putida* PaW1 (PPU344068), ND6: *Pseudomonas* sp. ND6 (AY208917.1), Stamm H: *P. putida* Stamm H (PPY09450), JS45: *P. pseudoalcaligenes* JS45 (AF028594), JMP134: *Wautersia* od. *Ralstonia eutropha* JMP134 (AY365053). Rot markierte Gene stehen für Gene, die Enzyme des *meta*-Weges kodieren, orange markierte Gene kodieren für Enzyme des Toluat-Abbaus, blau markierte Gene kodieren für Transposasen, dunkelblaue für Hydroxylaminobenzol-Hydratasen, grüne für Enzyme des *ortho*-Weges, dunkelgrau für Regulatoren bzw. Enzyme des Plasmidrücktrans und hellgrau markierte Gene kodieren für Enzyme unbekannter Funktion. Genbezeichnungen und die zugehörigen Enzymbezeichnungen sind den vorangegangenen Abbildungen und den oben angegebenen NCBI Acc. No.'s zu entnehmen. Die gesamte Abbildung ist maßstabsgetreu.

Die Transposasen gliedern den *cbzTEXG*-Cluster in mehrere Abschnitte, die sich an Hand der unterschiedlichen GC-Gehalte ablesen lassen. Die Transposasen *tnpA1* und *tnpA2* haben einen relativ hohen GC-Gehalt von rund 66%, der Transposonbereich Tn5501 von 60,8%. Der Bereich des *traNEOFG*-Operons (Plasmidrückrat) weist einen GC-Gehalt von 58,2%, der Sequenzbereich mit den Genen *cbzTEXG* (*meta*-Weg-Enzyme) von 59,9% und *cbzJ* (2-Oxopent-4-enoat-Hydratase) von 57,1% auf (siehe **Abb.** 4.1.2.2).

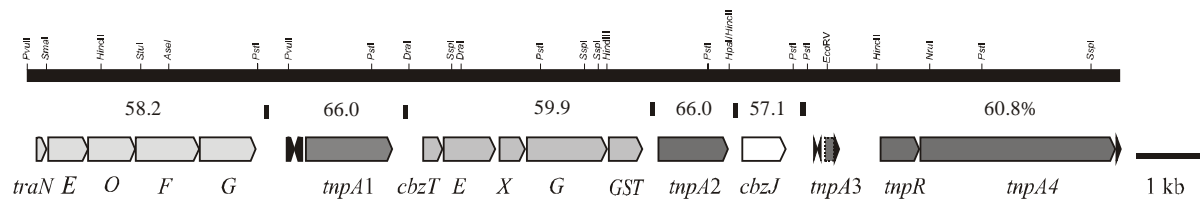


Abb. 4.1.2.2: Übersicht der GC-Gehalte [%] von Abschnitten des *cbzTEXG*-Clusters in *P. putida* GJ31. Die GC-Gehalte sind für die einzelnen Abschnitte, markiert durch die senkrechten schwarzen Balken, angegeben. Genbezeichnungen und die zugehörigen Enzymbezeichnungen können der **Abb.** 1.4 entnommen werden. Die Abbildung ist maßstabsgetreu.

Die einzelnen Abschnitte *traNEOFG*, *cbzTEXG* und Tn5501 wurden mit verwandten Genclustern verglichen (siehe **Abb.** 4.1.2.1).

Der Transposonbereich Tn5501 aus *P. putida* GJ31 weist im Vergleich mit verwandten Transposonbereichen aus anderen Stämmen große Ähnlichkeiten in der Anordnung und Größe der offenen Leserahmen *tnpR* und *tnpA* auf (siehe **Abb.** 4.1.2.1). Die Lage der Inverted Repeats ist dagegen unterschiedlich. In Tn5501 aus *P. putida* Stamm H liegt das 3'-Ende des in der Nukleotidsequenz identischen Inverted Repeats analog zu GJ31-Tn5501 direkt stromabwärts von *tnpA*. Allerdings liegt der 5'-Teil des IR in Stamm H rund 3 kbp stromaufwärts von *tnpR*, in Stamm GJ31 dagegen nur rund 0,7 kbp. Dagegen liegt der 5'-Teil des IR in *Ralstonia eutropha* JMP134 (Trefault *et al.*, 2004) in einem ähnlichen Abstand zu *tnpR* wie in Stamm GJ31. Das 3'-Ende des IR ist in *Ralstonia eutropha* JMP134 dagegen rund 2,7 kbp stromaufwärts vom 3'-Ende des offenen Leserahmens *tnpA*. Weitere Unterschiede zwischen Tn5501 aus *P. putida* GJ31 und den verwandten Transposonbereichen konnten für die genetische Umgebung festgestellt werden. So finden sich in keinem der aufgeführten Beispiele Gene, die für katabolische Enzyme in direkter genetischer Nachbarschaft kodieren, wie dies für *P. putida* GJ31 der Fall ist. Einzig in *Ralstonia eutropha* JMP134 konnte rund 3,5 kbp stromabwärts von *tnpA* ein Gencluster nachgewiesen werden, der für Enzyme des *ortho*-Weges kodiert. In *P. pseudoalcaligenes* JS45 (Davis *et al.*, 2000) befinden sich stromaufwärts von *tnpA* zwei offene Leserahmen (*habA* und *habB*), die für Hydroxylaminobenzol-Hydratasen kodieren. Stromaufwärts von *tnpA* konnte in *Pseudomonas*

sp. ND6 (Li *et al.*, 2004) das Regulatorgen *nahR* nachgewiesen werden, allerdings ohne Hinweis auf weitere Gene eines *nah*-Clusters.

Ein fast 100% identischer Bereich *cbzTEXG* wie in *P. putida* GJ31 konnte in zwei weiteren Stämmen nachgewiesen werden. Dies sind die Stämme *P. fluorescens* SK1 und *P. veronii* 16-6A (beide aus Göbel *et al.*, 2004). Leider ist aus beiden Stämmen wenig über die Sequenzbereiche stromab- und stromaufwärts von *cbzTEXG* bekannt. In der Arbeit von Göbel *et al.* (2004) und der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Gene, die für Ferredoxin (*cbzT*, *tdnD2*, *dmpQ* und *xylT*) und Catechol-2,3-Dioxygenasen (*cbzE*, *tdnC2*, *dmpB* und *xylE*) kodieren, in direkter Abfolge vorliegen. In Stamm SK1, Stamm 16-6A und *P. putida* UCC22 (Fukumori und Saint, 1997) folgt stromabwärts des Catechol-2,3-Dioxygenase-Gens ein offener Leserahmen mit unbekannter Funktion (*cbzX* und ORF). Diese offenen Leserahmen fehlen zum Beispiel in den Clustern aus *Pseudomonas* sp. CF600 (Shingler *et al.*, 1992) und *P. putida* PaW1 (Greated *et al.*, 2002). Beide Stämme weisen einen Gencluster auf, der *meta*-Weg-Enzyme kodiert, in dem aber die Abfolge der *meta*-Gene nicht von offenen Leserahmen unbekannter Funktion unterbrochen wird, wie es zum Beispiel auch für die *nah*- bzw. *xyl*-Genclustern unter Diskussion 4.4.1 beschrieben wurde. In *P. putida* GJ31 scheint der Genabschnitt *cbzTEXG*, wie vermutlich in *P. fluorescens* SK1 und *P. veronii* 16-6A auch, aus einem *meta*-Gencluster heraus separiert vorzuliegen. Möglicherweise könnte es sich bei dem Genabschnitt *cbzTEXG* in *P. putida* GJ31 um einen verkürzten Abkömmling des *tdnD2C2ORFEFGHIJKL*-Genclusters aus *P. putida* UCC22 handeln. Dieser ist der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz des Genabschnitts *cbzTEXG* aus *P. putida* GJ31 zu rund 65% ähnlich.

Die fünf offenen Leserahmen *traN*, *traE*, *traO*, *traF* und *traG* aus *P. putida* GJ31 gehören vermutlich zu einem sogenannten *tra*-Operon, einem Konglomerat von bis zu 25, mindestens aber 11 Genen, welche für eine erfolgreiche Mobilisierung und den interzellulären Transfer von DNA benötigt werden (Pohlmann *et al.*, 1994). Ausschnitte von verwandten *tra*- bzw. *trw*-Operons sind in Abbildung 4.1.2.1 dargestellt. Aus den Aminosäuresequenzvergleichen (Kunze, 2002) ergibt sich, dass in den in Abbildung 4.1.2.1 verglichenen Stämmen (u.a. Alsmark *et al.*, 2004) bezüglich Länge und Aminosäuresequenz ähnliche Proteine vorhanden sind. Des Weiteren liegen die zugehörigen Gene, die für die jeweiligen Proteine kodieren, auch in derselben Abfolge im *tra*-Operon vor.

4.1.3 Der *benRXABC*-Cluster aus *P. putida* GJ31

Ein Ziel dieser Arbeit war, den Gen-Cluster zu finden, der für die Enzyme des Benzoat-Abbaus in *P. putida* GJ31 kodiert. Nach Vergleich verschiedener Nukleotidsequenzen von Benzoat-Dioxygenase-Untereinheiten-A wurden auf Grundlage der Sequenz von *P. putida* (NCBI Acc. No. AAF63448.2) heterologe Primer generiert und das PCR-Produkt sequenziert. Es konnten insgesamt 5 vollständige und ein unvollständiger offener Leserahmen (*benC*) eines Genclusters sequenziert werden, die Enzyme des Benzoat-Abbaus kodieren (siehe **Tab.** 4.1.3).

Tab. 4.1.3: Die Proteine des *benRXABC*-Clusters in *P. putida* GJ31

Proteine des <i>benRXABC</i> -Clusters in <i>P. putida</i> GJ31		Identische Aminosäuren der Proteine [%] mit			
Bez.	Funktion	GC-Gehalt des Gens [%]	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. S-47
ORF1	unbekannt	48,0	-	-	-
BenR	Regulator	60,2	96	95	60
BenX	unbekannt	49,9	40	-	-
BenA	Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-A	63,0	99	99	75
BenB	Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-B	60,1	95	96	77
BenC	Benzoat-Dioxygenase-Ferredoxin-Reduktase	63,9	89	91	74

Erläuterungen: Bez.: Bezeichnung, -: es lag kein vergleichbares Protein in diesem Stamm veröffentlicht vor. Der offene Leserahmen *benC* wurde in *P. putida* GJ31 nur unvollständig sequenziert.

Der *benRXABC*-Cluster aus *P. putida* GJ31 zeigt im Vergleich der genetischen Struktur und genetischen Umgebung mit verwandten Genclustern einige Ähnlichkeiten (siehe **Abb.** 4.1.3). So ist die Organisation der Gene in ihrer Abfolge in den verschiedenen Stämmen gleich. Weiterhin sind die jeweiligen Gene gleich groß. Außerdem ist der GC-Gehalt der verglichenen Gene sehr ähnlich und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen haben eine Ähnlichkeit von rund 90% oder mehr mit den am nächsten verwandten Proteinen. Die einzige Ausnahme bilden ORF1 und *benX* aus *P. putida* GJ31. Ihr GC-Gehalt liegt mit 48,0% bzw. 49,9% über 10 Prozentpunkte unter dem typischen GC-Gehalt der Genabschnitte *benR* und *benABC* (rund 62%).

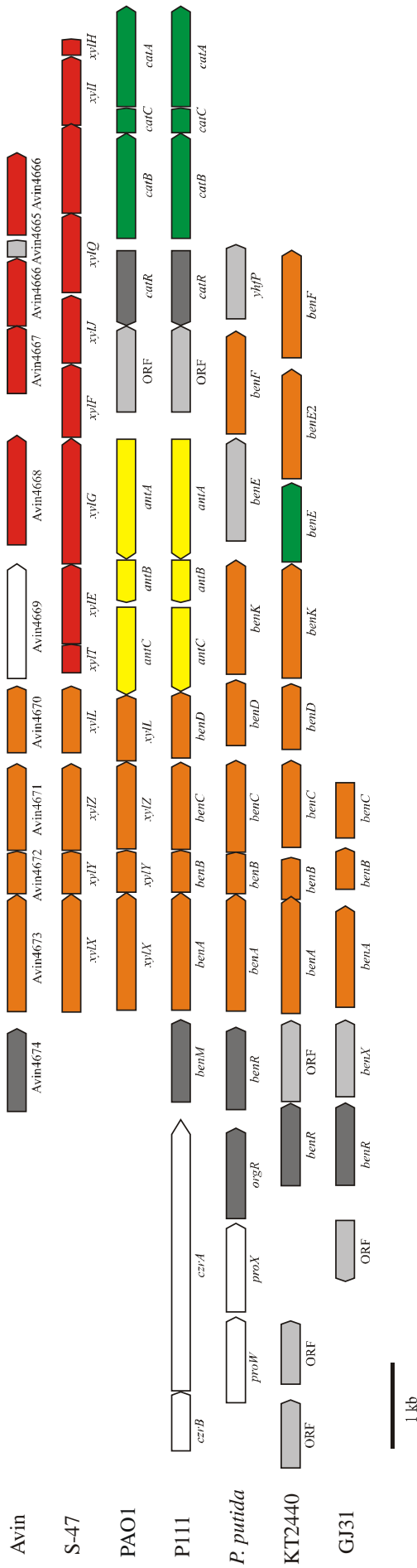


Abb. 4.1.2: Der *benRXABC*-Cluster aus *P. putida* GJ31 im Vergleich zu verwandten Genclustern aus anderen Bakterienstämmen. Die Cluster sind mit Abnahme ihrer Ähnlichkeit zu Stamm GJ31 aufsteigend angeordnet. Erläuterungen: GJ31: *P. putida* GJ31 (diese Arbeit), KT2440 (AE016785.1), *P. putida*: *P. putida* (AF218267), P111: *P. putida* P111 (AY026914.1), PAO1: *P. aeruginosa* PAO1 (AE004678.1), S-47: *Pseudomonas* sp. S-47 (AF320981.3), Avin: *Azotobacter vinelandii* (NZ_AAAU02000001.1).

Rot markierte Gene stehen für Gene, die Enzyme des *meta*-Weges kodieren, orange markierte Gene kodieren für Enzyme des Benzoat-, Toluat- bzw. Phenylpropionat-Abbaus, grün markierte Gene kodieren für *ortho*-Weg-Enzyme, gelbe für Enzyme des Anthranilat-Abbaus, dunkelgraue für Regulatoren und hellgraue markierte Gene kodieren für Enzyme unbekannter Funktion, weiße für sonstige Enzyme.

Genbezeichnungen und die zugehörigen Enzymbezeichnungen: *benR* bzw. *benM*: Regulator, *benX*: unbekannte Funktion, *benA*: Bzt.-Dioxygenase-A, *benB*: Bzt.-Dioxygenase-B, *benC*: Bzt.-Dioxygenase-Ferredoxin-Reduktase, *benD*: *cis*-Dihydrodiol-Dehydrogenase, *benK*: Benzoat-MFS-Transporter, *benE*: Catechol-1,2-Dioxygenase (KT2440) bzw. unbekannt (*P. putida*), *benE2*: Benzoat-Transporterprotein, *benF*: Porin (benzoatspezifisch), *antA*: Anthranilat-Dioxygenase – große Untereinheit, *antB*: Anthranilat-Dioxygenase – kleine Untereinheit, *antC*: Anthranilat-Dioxygenase-Reduktase, *catA*: Catechol-2,3-Dioxygenase, *catB*: Muconat-Cycloisomerase, *catC*: Muconalacton-delta-Isomerase, *catR*: Regulator, *xyI*: Toluat-Dioxygenase- α -Untereinheit, *xyY*: Toluat-Dioxygenase- β -Untereinheit, *xyZ*: Toluat-Dioxygenase-Elektronentransferkomponente, *xyL*: *cis*-1,2-Dihydroxycyclohexa-3,4-dien-carboxylat-Dehydrogenase, *xyT* bis *xyH*: siehe Abb. 4.1.1, Avin4666: 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase, Avin4667: 2-Keto-4-pentenoat-Hydratase, Avin4668: ORF, Avin4669: Permease, Avin4670: Dehydrogenase, Avin4671: 2-Polyprenylphenol-Hydroxylase und Ferredoxin-Oxidoreduktase, Avin4672: Phenylpropionat-Dioxygenase – kleine Untereinheit, Avin4673: Phenylpropionat-Dioxygenase – große Untereinheit, Avin4674: AraC ähnlicher Regulator. Sonstige Enzymbezeichnungen können den NCBI Acc. No.'s entnommen werden. Die gesamte Abbildung ist maßstabsgetreu.

Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen dem *benRXABC*-Clusters aus *P. putida* GJ31 und verwandten Genclustern aus anderen Stämmen wurden untersucht (siehe **Abb.** 4.1.3). Auffällig ist, dass sich zwischen den Genen *benR* und *benA* nur in *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002) und in *P. putida* GJ31 (diese Arbeit) ein offener Leserahmen mit unbekannter Funktion befindet (*benX*). Die beiden resultierenden BenX-Proteine sind in ihrer Aminosäuresequenz nur zu 40% ähnlich, während die anderen Proteine (BenR, BenABC) Ähnlichkeiten von über 90% aufweisen.

Andere Stämme wie *P. putida* (Cowles *et al.*, 2000), *P. putida* P111 (Totevova *et al.*, 2001) und *Azotobacter vinelandii* (keine Publikation, NCBI Acc. No. NZ_AAAU02000001.1), weisen zwischen dem Regulatorgen und dem Gen für die erste Dioxygenase-Untereinheit keinen offenen Leserahmen auf.

Die Strukturgene *benABCD*, *xyWXYZL* bzw. Avin4670-4673 liegen in dieser Abfolge und in ihrer individuellen Größe konserviert und als Einheit in allen bisher untersuchten Stämmen vor. Sie kodieren jeweils für die Benzoat/Toluat/Phenylpropionat-Dioxygenase-Untereinheit-A, die Untereinheit-B, eine Ferredoxin-Reduktase und eine *cis*-Diol-Dehydrogenase. Stromabwärts von diesem Strukturgencluster unterscheiden sich die verglichenen Stämme deutlich. *P. putida* KT2440 und *P. putida* weisen stromabwärts von *benD* Gene auf, die für Transporterproteine kodieren, die für Benzoat spezifisch sind (*benK*, *benE2*, *benF*). In *P. putida* P111 und *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000) liegen stromabwärts der Dioxygenase-Strukturgene Gencluster, die für Enzyme des Anthranilat-Abbaus (*antCBA*) und des *ortho*-Weges (*catRBCA*) kodieren. Stromabwärts des *xyWXYZL*-Clusters aus *Pseudomonas* sp. S-47 (Park *et al.*, 2000) bzw. des Avin4670-4673-Clusters aus *Azotobacter vinelandii* wurden zwei verschiedene *meta*-Weg-Cluster gefunden.

Stromaufwärts des Strukturgenclusters bzw. des zugehörigen Regulators finden sich in allen untersuchten Stämmen deutliche genetische Unterschiede. In *P. putida* KT2440 befinden sich zwei offene Leserahmen (ORF) mit unbekannter Funktion. Zwei Transporter-Systeme (*proW* und *proX*) und ein Regulator (*orgR*) befinden sich stromaufwärts von *benR* in *P. putida*. Stromaufwärts von *benM* finden sich in *P. putida* P111 Gene eines Kationen/Protonen-Antiporters (*czrA*) und eines Kationen-Efflux-Systems (*czrB*).

Es wurde ein Stamm mit ähnlichem Aufbau der Umgebung des *benRXABC*-Clusters gesucht. Auf Grund der großen Ähnlichkeit der Nukleotidsequenzen der offenen Leserahmen und ihrer Organisation in *P. putida* GJ31 mit *P. putida* KT2440, könnte angenommen werden, dass die Organisation der Gene stromabwärts des sequenzierten Bereiches in *P. putida* GJ31 dem in *P.*

putida KT2440 ebenfalls ähnlich ist. Allerdings musste festgestellt werden, dass sich die genetische Organisation stromaufwärts von *benR* deutlich unterscheidet.

4.1.4 Spekulation über die Anpassung von Mikroorganismen an Xenobiotika und die Entstehung von Abbauwegen: Die Stämme *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31*, ein Beispiel für die Anpassung an den Abbau von (Chlor-)Aromaten

Zur Verbesserung der Abbauleistungen von Mikroorganismen gegenüber persistenten Verbindungen gibt es einige Mechanismen, wie sich Mikroorganismen an den Abbau von organischen Verunreinigungen in der Umwelt anpassen. Einige davon konnten auch im Wildstamm *P. putida* GJ31 und am Beispiel seines Abkömmlings *P. putida* GJ31* beobachtet werden:

1. Die einfachste Möglichkeit für Mikroorganismen zum Abbau von organischen Verunreinigungen ist die Induktion der entsprechenden Gene. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Populationsgröße der Organismen, die diese Verbindungen abbauen. Dies konnte auch in Form einer Verstärkung der Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität durch den Induktor Benzoat in Stamm *P. putida* GJ31 beobachtet werden (Experimente und Ergebnisse 3.5.7). Die Aktivität der Catechol-2,3-Dioxygenasen verdoppelte sich bei der Induktion mit Benzoat im Vergleich zu der Induktion mit Acetat. Gleichzeitig konnte mit Zugabe von Benzoat die Aktivität der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktase (DHB-Dehydrogenase, *benD*) induziert werden. Hierdurch wird es dem Wildstamm *P. putida* GJ31 möglich, Benzoat abzubauen. Bei anderen Experimenten konnte durch die Induktion Acetat-angezogener Zellen von *P. putida* GJ31 mit Benzoat eine Zunahme der optischen Dichte, also der Populationsgröße, beobachtet werden (Zerlin, 2002).
2. Die Zellen können durch verschiedene Mutationen, sei es durch Einzelnukleotidveränderungen oder durch eine DNA-Umorganisationen angepasst werden. Diese Veränderungen können zu einer Persistenz bzw. zu einem Abbau der Verbindungen führen. So konnte im Abkömmling *P. putida* GJ31*, der durch 3-Chlorbenzoat-Selektion aus *P. putida* GJ31 erhalten wurde, die Änderung von zwei Nukleotiden im kodierenden Bereich des Regulators *benR* festgestellt werden (Experimente und Ergebnisse 3.5.4.2). Es wurde aber ausgeschlossen, dass es sich bei diesen Einzelnukleotidveränderungen um die Ursache für die Anpassung von *P. putida* GJ31* handelt, auf 3-Chlorbenzoat zu wachsen und dass dabei 3-Chlorbenzoat als Induktor für BenR wirkt (siehe Diskussion 4.3).

3. Die Organismen können sich genetische Informationen entweder von einer phylogenetisch ähnlichen oder weiter entfernten Population durch horizontalen Gentransfer aneignen. Dies soll in diesem Kapitel auch am Beispiel von *P. putida* GJ31 noch weiter diskutiert werden.
4. Der an den Abbau von Verunreinigungen bestangepasste Organismus wird zudem aus den gesamten Mikroorganismen selektiert und nimmt einen größeren Anteil an der Gesamtzahl der Mikroorganismen ein, als vor der Verschmutzung.

Der horizontale Gentransfer gilt als ein natürlicher Mechanismus der bakteriellen Adaption. Eine Annäherung, um Beweise für den Beitrag des Gentransfer an der Adaption von Bakterien an spezifische umweltverschmutzende Verbindungen zu sammeln, liefern die Charakterisierung und der Vergleich von Genen, die in den Abbau von identischen oder ähnlichen Verbindungen beteiligt sind, die in nähere oder größerer Distanz von den Bakterienisolaten zu finden sind. Dabei wurden folgende Hauptmerkmale herausgefunden:

1. Aus evolutionärer Sicht verwandte katabolische Gene und Gencluster wurden in Bakterien gefunden, die örtlich weit von einander entfernt isoliert wurden (Whyte *et al.*, 2002).
2. Wie bei einigen Genen des 2,4-Dichlorphenoxyacetat-Abbauweges gezeigt wurde, stimmt die Phylogenetik der katabolischen Genen nicht mit den 16 sRNA Genen der entsprechenden Stämme überein (McGowan *et al.*, 1998; Vallaeys *et al.*, 1999).
3. Degradative Gene des Abbaus von organischen Verbindungen wurden häufig assoziiert mit mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Transposons oder Integrons gefunden (Top *et al.*, 2002).
4. Evolutionär verwandte katabolische Gene und komplette Genmodule sind in den Abbau von strukturell ähnlichen aber auch verschiedenen chemischen Verbindungen involviert (Horn *et al.*, 1991; van der Meer *et al.*, 1998; Smejkal *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass der horizontale Gentransfer mit mobilen genetischen Elementen eine wichtige Rolle bei der weltweiten Verbreitung von Abbauwegen und der Zusammensetzung neuer Abbauwege spielt. Im folgenden sollen die oben erläuterten vier Punkte auf den in dieser Arbeit untersuchten Wildstamm *P. putida* GJ31 angewandt werden.

1. Die in *P. putida* GJ31 gefundenen Gencluster kodieren unter anderem auch für Enzyme des *meta*-Weges. Verwandte Gencluster, die für Enzyme des *meta*-Weges kodieren, sind bei Mikroorganismen weit verbreitet und in vielen Stämmen beschrieben worden. Der Vergleich dieser Cluster mit denen aus anderen Organismen macht deutlich, dass diese

sich in Bezug auf ihre Genorganisation in zwei Untergruppen einteilen lassen. Der *nah*-Cluster und der Genabschnitt *cbzTEXG* als unvollständiger Teil aus *P. putida* GJ31 können zu einer Untergruppe gezählt werden. Dazu gehören ebenfalls sowohl *xyl*-Operon vom TOL-Plasmid pWW0 (Greated *et al.*, 2002), *dmp*-Operon aus *Pseudomonas* sp. CF600 (Shingler *et al.*, 1992) und das *nah*-Operon aus *Pseudomonas putida* Stamm G7 (Yen und Gunsalus, 1982; Simon *et al.*, 1993) oder *P. stutzeri* AN10 (Bosch *et al.*, 2000). Sie 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 stromabwärts von der 2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolasen die Gene für die 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase an. In eine weitere Gruppe lassen sich neben dem *meta*-Operon aus *P. putida* GJ31 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 (Arai *et al.*, 1999; Perna *et al.*, 2001) einordnen. Diese Gencluster besitzen, wie auch das *meta*-Operon aus Stamm GJ31, nur Gene, welche für eine Metabolisierung über den hydrolytischen Weg erforderlich sind. Darüber hinaus wurde zum Beispiel auch der *cbzTEXG*-Cluster analog zu *P. putida* GJ31 mit größter Ähnlichkeit in zwei weiteren Stämmen, *P. fluorescens* SK1 und *P. veronii* 16-6A gefunden (Göbel *et al.*, 2004).

2. Aus der Gegenüberstellung der Sequenzen der 16S rDNA der Stämme *P. putida* PaW1 und *P. putida* GJ31 (Kunze, 2002) wird ersichtlich, dass sich die Nukleotidsequenzen der beiden Stämme über die 1,5 kbp lange Gesamtsequenz nur in neun Positionen unterscheiden. Dabei liegen in sieben Fällen Unterschiede in der Nukleotidsequenz vor, in zwei Positionen fehlt der 16S rDNA von *P. putida* GJ31 im Vergleich zu der von *P. putida* PaW1 ein Nukleotid. Trotz dieser großen Ähnlichkeit der beiden Stämme auf Ebene der 16S rDNA unterscheidet sich die Stämme wie erwartet in ihren biochemischen Eigenschaften sowie auch in der Zusammensetzung der Abbau-Cluster.
3. Die Assoziation von degradativen Genen des Abbaus von organischen Verbindungen mit mobilen genetischen Elementen lässt sich in dem Wildstamm *P. putida* GJ31 an vielen Beispielen zeigen. Zum einen liegen die meisten bisher in *P. putida* GJ31 sequenzierten Gencluster auf dem Plasmid pKW1 (*cbzTEXG*-Cluster, *meta*-Operon, *nah*-Cluster, *ben*-Cluster). Im Bereich des *cbzTEXG*-Clusters ließen sich allein in einem Sequenzbereich

von rund 21 kbp zwei Transposasen (*tnpA1*, *tnpA2*) ein Transposasefragment (*tnpA3*) sowie der Transposonbereich Tn5501 mit einer Resolvase *tnpR* und der Transposase *tnpA4* finden. Der bisher sequenzierte Bereich des *nahINLOMKJX*-Clusters in *P. putida* GJ31 weist keinen offenen Leserahmen auf, der für eine Transposase kodiert. Allerdings konnte von Bosch *et al.* (2000) in direkter Assoziation zu dem *nah*-Cluster aus *P. stutzeri* AN10 eine Transposase nachgewiesen werden. Der *nah*-Cluster aus *P. stutzeri* AN10 ist mit dem vergleichbaren Gencluster aus *P. putida* GJ31 sehr stark verwandt (über 90% Ähnlichkeit).

4. Dass evolutionär verwandte katabolische Gene und komplette Gencluster in den Abbau von strukturell ähnlichen chemischen Verbindungen (siehe **Abb. 4.1.4**) involviert sind, zeigte der Vergleich der Gencluster aus *P. putida* GJ31 mit den jeweiligen verwandten Clustern aus anderen Stämmen. Unter den verwandten Genclustern des *nahINLOMKJX*-Cluster aus *P. putida* GJ31 sind Genmodule, die in den Abbau von Benzoat, Toluat bzw. Salicylat involviert sind. So kodiert zum Beispiel der Gencluster aus *Pseudomonas* sp. S-47 für Enzyme des Abbaus von Benzoat, aus *Pseudomonas* sp. ST41 und *P. putida* PaW1 für Toluat und aus *P. putida* und *P. putida* NCBI 9816-4 für den Abbau von Salicylat. Die Genmodule der Stämme, verwandt mit dem *benRXABC*-Cluster aus *P. putida* GJ31, kodieren Enzyme für den Abbau von Benzoat, Toluat bzw. Phenylpropionat. Der *ben*-Cluster aus *P. putida* KT2440 kodiert für Enzyme des Benzoat-Abbaus, die *xyl*-Cluster aus *Pseudomonas* sp. S-47 und *P. putida* PaW1 für den Abbau von Toluat und der Cluster aus *Azotobacter vinelandii* für Enzyme des Abbaus von Phenylpropionat.

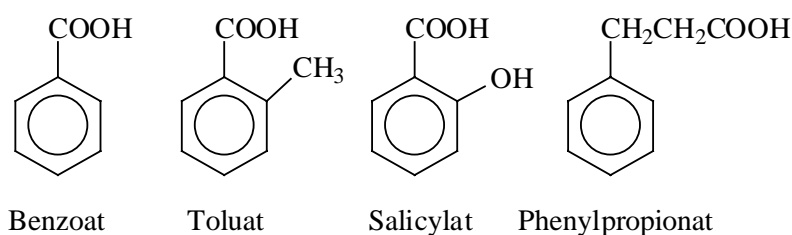


Abb. 4.1.4: Beispiele einkerniger Aromaten.

Die Bildung neuer Abbauewege scheint mit einer Übernahme der katabolischen Gene oder Gensegmente von verschiedenen Organismen in den jeweiligen neuen Wirt verbunden zu sein (Reineke, 1998). Dies wurde bei der Identifikation von Relikten von Vorläufergenen bestätigt. Bei diesen Vorläufergenen handelt es sich um Gene des Abbaueweges von Toluol und flankierende Gencluster des Chlorbenzolabbaus in zwei unabhängig voneinander isolierten Bakterienstämmen (Werlen *et al.*, 1996; Beil *et al.*, 1999).

Weiterhin wurde festgestellt, dass gleiche Gene oder Gencluster Bestandteil von verschiedenen Replikons sein können. Zum Beispiel wurden exakte Kopien des *xyl*-Operons, das für Enzyme des Toluol/Xylol-Abbaus kodiert, auf verschiedenen Plasmiden mit unterschiedlicher Inkompatibilitätsgruppe gefunden (Sentchilo *et al.*, 2000). Außerdem wurden sehr ähnliche Genmodule, die für Enzyme des Chlorocatecholabbaus kodieren, auf Plasmiden und konjugativen integrativen Elementen gefunden (Ogawa and Miyashita, 1999; van der Meer *et al.*, 2001). Dies lässt vermuten, dass es eine unabhängige Bewegung und Akquirierung von solchen Operons gibt, die sich in einigen Fällen durch die Tatsache erklären lässt, dass die Gene von Transposons eingeschlossen sind. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass katabolische Gene und gesamte Gencluster zwischen verschiedene Replikons eingefügt werden. Dadurch wird ihre Verbreitung unter den Mikroorganismen erleichtert. Als Konsequenz daraus kann gefolgert werden, dass der *in situ* Zusammenbau von Abbauwegen auch unabhängig von der Zusammenstellung gleicher Vorläufergene oder Genmodule funktioniert (Beil *et al.*, 1999).

Die Abbauwege sind Mosaik-ähnlich organisiert. Dies lässt zusätzlich eine Übertragung der Gene durch horizontalen Gentransfer vermuten. Wie in diesem Kapitel schon erläutert wurde, liegen Gene geclustert vor, die für Enzyme des *meta*-Weges kodieren, der ein möglicher Abbauwege für methylierte oder chlorierte Aromaten ist. Dieses konnte auch in *P. putida* GJ31 beobachtet werden. Wie dargestellt, finden sich in *P. putida* GJ31 *meta*-Weg-Cluster zweier Untergruppen. Dies sind zum einen die Cluster, die neben dem durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase gebildeten hydrolytischen Abbauzweig auch den dehydrogenolytischen Zweig besitzen. Dies ist der *cbz*TEXG-Cluster, eine verkürzte Version des *tdnD2C2ORFEFGIJKL*-Clusters aus *P. putida* UCC22, und der *nah*INLOMKJX-Cluster, eine ebenfalls gekürzte Version des *nah*THINLOMKJ-Clusters aus *P. stutzeri* AN10. Zu dieser Gruppe gehören sowohl das *xyl*-Operon von dem TOL-Plasmid pWW0 (Greated *et al.*, 2002), das *dmp*-Operon aus *Pseudomonas* sp. CF600 (Shingler *et al.*, 1992) und das *nah*-Operon aus *Pseudomonas putida* Stamm G7 (Yen und Gunsalus, 1982; Simon *et al.*, 1993) oder *P. stutzeri* AN10 (Bosch *et al.*, 2000). Zum anderen sind dies Cluster, wie auch das *meta*-Operon aus Stamm GJ31, die nur Gene besitzen, welche für eine Metabolisierung über den hydrolytischen Weg erforderlich sind. Das gilt auch für 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 (Arai *et al.*, 1999; Perna *et al.*, 2001).

Der *ortho*-Weg ist ein gleichfalls besonders wichtiger Abbauweg bei der katalytischen Degradation von Organochlorverbindungen. Er dient zur Mineralisierung von Chloraromaten.

Diese erfolgt über die Umwandlung von Chlorcatecol zu Intermediaten des zentralen Metabolismus. Die Gene des modifizierten *ortho*-Weges sind in ähnlich strukturierten Operons (*clcABCE*, *tfdCDEF*, *tcbCDEF*) organisiert. In vielen Fällen liegt der modifizierte *ortho*-Weg auf einem katabolischen Plasmid kodiert (Chatterjee *et al.*, 1981; Don and Pemberton, 1981; van der Meer *et al.*, 1991a; Mäe *et al.*, 1993; Bhat *et al.*, 1994; Ogawa and Miyashita, 1995; Poh *et al.*, 2002).

Eine große Ähnlichkeit wurde bei Genen und Genprodukten nachgewiesen, die für die Katalyseschritte des oberen Abbauweges benötigt werden, bei dem Chlorcatechole entstehen. In *P. putida* GJ31 konnten bisher zwei Gencluster sequenziert und untersucht werden. Dies ist zum einen der obere Abbauweg mit Genen, die für Enzyme des Abbaus von Chlorbenzol (*cbzAaAbAcAdB*-Cluster) kodieren, der auf dem Chromosom lokalisiert ist. Zum anderen ist dies der *benRXABC*-Cluster auf Plasmid pKW1, der für Enzyme des Abbaus von Benzoaten kodiert. Beide Cluster weisen große Ähnlichkeiten in ihrer genetischen Organisation und Struktur auf. Vergleiche der Gencluster der beiden oberen Abbauwege aus *P. putida* GJ31 mit verwandten Clustern aus anderen Stämmen verstärken den Hinweis auf eine Clusterbildung. Es wurden einige Gencluster beschrieben, die für (Chlor-)Benzol-Dioxygenasen und (Chlor-)Benzol-*cis*-dihydrodiol-Dehydrogenasen kodieren. Homologievergleiche implizieren, dass die *tcbAaAbAcAdB* Gene aus dem Stamm *Pseudomonas* sp. P51, der 1,2,4-Trichlorbenzol als Substrat verwenden kann, eng verwandt sind mit Genen für den Toluol-Abbau (*todC1C2BAD* aus *P. putida* F1) und den Benzol-Abbau (*bedDC1C2BA* aus *P. putida* ML2 und *bnzABCD* aus *P. putida* 136-R3). Der *tcbAaAbAcAdB* Gen-Cluster aus Stamm P51 ist nicht kombiniert mit Genen des *meta*-Weges, ist aber durch zwei Insertionselemente (*IS1066* und *IS1067*) ausgeschnitten und an eine neue Position in der Nähe von Genen des Chlorcatechol-Weges (*tcbCDEF*) gesetzt worden. Die Organisation des Chlorbenzol-Dioxygenase Genclusters *tecA1A2A3A4* aus *Burkholderia* sp. PS12, der 1,2,4-Trichlor- und 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol als Substrat nutzen kann, war den äquivalenten Clustern der *tcb* und *tod* Gene in seiner Organisation und Anordnung der Gene gleich (Beil *et al.*, 1997).

4.2 Der *cbzTEXG*-Cluster in *P. putida* GJ31 und in dem Abkömmling QM1

Wie unter Diskussion 4.1.2 beschrieben, kann der *cbzTEGX*-Cluster aus *P. putida* GJ31 in mehrere Abschnitte untergliedert werden, die jeweils durch Transposasen abgegrenzt sind (siehe **Abb.** 4.1.2.1). Dies sind das *traNEOFG*-Operon, der *cbzTEXG*-Cluster und der Transposonbereich *Tn5501*. Es kann vermutet werden, dass nach horizontalem Gentransfer

der *cbzTEXG*-Cluster und der offene Leserahmen *cbzJ* in das Plasmid pKW1 inseriert worden sind.

Nach längerem Wachstum von *P. putida* GJ31 auf Benzoat konnte die Mutante *P. putida* QM1 isoliert werden (Experiment und Ergebnisse 3.1.2). Stamm QM1 hat die Fähigkeit verloren, auf Chlorbenzol zu wachsen. Außerdem konnte Kunze (2002) das Fehlen von *cbzE*, dem Gen, das für die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase kodiert, in *P. putida* QM1 durch PCR- und Hybridisierungsexperimente zeigen. Weitergehende PCR-Experimente in dieser Arbeit haben gezeigt, dass ein weiter Bereich von rund 9 kbp des ursprünglichen *cbzTEXG*-Clusters in *P. putida* QM1 fehlt (Experimente und Ergebnisse 3.3.5). Dazu gehören auch die Gene der Transposasen (*tnpA1* und *tnpA2*). Erklärbar ist dieser Vorgang über eine Excision des kompletten betroffenen Nukleotidbereiches. Allerdings zeigten die PCR-Experimente in dieser Arbeit, dass eine Insertion zwischen *tra*-Operon und *Tn5501* in *P. putida* QM1 wahrscheinlich ist (Experimente und Ergebnisse 3.3.5).

Excisionsvorgänge, wie sie bei Wachstum von *P. putida* GJ31 auf Benzoat vermutet werden, konnten auch bei den TOL-Plasmid tragenden Organismen *Pseudomonas putida* PaW1 (Williams und Murray, 1974), *Pseudomonas putida* MT15 (Keil *et al.*, 1985), *Pseudomonas putida* MT20 (Worsey und Williams, 1977) und dem zu PaW1 sehr ähnlichen Stamm HS1 beobachtet werden (Kunz und Chapman, 1981).

Wurde *Pseudomonas putida* PaW1 auf Benzoat kultiviert, so verlor sein TOL-Plasmid pWW0 relativ schnell ein 39 kbp-Fragment, das bei allen isolierten Mutanten exakt an der gleichen Stelle in pWW0 fehlte. Zurück blieb ein kleineres Plasmid mit etwa 78 kbp (Williams und Murray, 1974).

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

Die Excision des Genbereiches *tnpA1cbzTEXGtnpA2cbzJ* bei der Entstehung von *P. putida* QM1 lässt sich allerdings nicht über eine Paarung und Rekombination der beiden Transposasen *tnpA1* und *tnpA2* erklären. Wie schon von Kunze (2002) beschrieben, finden sich flankierend zum *cbzTEXG*-Cluster aus *P. putida* GJ31 auf pKW1 die beiden gleichläufig orientierten Transposase-Gene *tnpA1* und *tnpA2*. Bei unspezifischem Wachstum auf Benzoat könnte es dann zu einer Überlagerung der beiden Transposase-Gene kommen und somit zu einer Excision der durch die Transposasen eingeschlossenen Region führen. Dieses Modell der beiden sich überlappenden Transposase-Gene *tnpA1* und *tnpA2* muss allerdings für die Mutante *P. putida* QM1 verworfen werden, da diese Gene in ihrer näheren Umgebung weder

direkte noch invertierte Sequenzwiederholungen besitzen, wie sie für aktive IS-Elemente gefordert werden. Außerdem ergaben die PCR-Experimente, dass auch Bereiche, sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts des durch die Transposase-Gene flankierten Bereiches, in der Mutante QM1 fehlen. Bei dem oben beschriebenen Modell würde eine Transposase in der ursprünglichen Sequenz zurück bleiben. Auch dies konnte in *P. putida* QM1 durch PCR-Experimente nicht belegt werden.

Es scheint, als ob es bei der Entstehung von *P. putida* QM1 nicht nur zu einer Excision gekommen ist, sondern auch die Insertion eines neuen Genabschnitts stattgefunden hat. Dieser Abschnitt konnte bisher nicht isoliert werden.

4.3 Die katalytischen Schritte des *meta*-Weges in *P. putida* GJ31 zum Abbau von 3-Chlor- und 4-Chlorcatechol

Wie in Diskussion 4.1.4 beschrieben, sind die Gene, die für Enzyme der Abbauwege kodieren, in relativ konservierten und genetisch mobilen Genclustern angeordnet, wie zum Beispiel die Gene des *meta*-Weges. Allerdings befinden sich nicht alle Gene der für den Abbau von 3-Chlorcatechol durch *P. putida* GJ31 notwendigen Enzyme in einem Gencluster. Der Abbau von 3-Chlorcatechol würde allein mit Enzymen des *meta*-Operons hauptsächlich daran scheitern, dass die Catechol-2,3-Dioxygenase CbzE2 kein 3-Chlorcatechol umsetzt (Kunze, 2002). Wie bereits für andere Stämmen beschrieben, ist auch in *P. putida* GJ31 der komplette enzymatische Abbauwege aus den Produkten mehrerer Gencluster mosaikartig zusammengesetzt. Zwei unterschiedliche Beispiele seien an dieser Stelle genannt:

1. Gencluster des oberen-Abbauweges und zentraler Stoffwechselwege liegen auf Plasmid pP51 aus *Pseudomonas* sp. P51 separiert (Werlen *et al.*, 1996).
2. Weiterhin konnte eine Separation von Clustern beobachtet werden, wobei ein Teil (der modifizierte *ortho*-Weg) auf dem Plasmid pAC27 und der andere Teil (Abbauweg für 3-Chlorbenzoat) auf dem Chromosom von *Pseudomonas putida* AC858 lag (Chatterjee *et al.*, 1981).

In *P. putida* GJ31 wurden bisher 18 offene Leserahmen identifiziert, die für Enzyme des *meta*-Weges zum Abbau von Chlorcatecholen kodieren. Der *meta*-Weg umfasst mehrere enzymatische Reaktionsschritte (siehe Einleitung 1.2.2). In *P. putida* GJ31 konnte die Enzymaktivität jedes Schritts im Rohextrakt gemessen (Mars *et al.*, 1997, 1999; Kranz, 2001; Kunze, 2002; Zerlin, 2002, Reifenrath, pers. Mitteilung) und für jeden Reaktionsschritt

mindestens ein Gen in *P. putida* GJ31 beschreiben werden, das nach Sequenzvergleichen über die jeweilige putative Aktivität verfügt (Mars *et al.*, 1999; Kunze, 2002; diese Arbeit).

Vielfach gibt es in *P. putida* GJ31 mehrere Isoenzyme für eine Enzymaktivität. In *P. putida* GJ31 konnten zum Beispiel drei offene Leserahmen (*cbzE*, *cbzE2* und *cbzE3*) gefunden werden, die Catechol-2,3-Dioxygenasen kodieren. Außerdem wurden insgesamt drei offene Leserahmen gefunden, für deren Genprodukte nach Expression und Enzymtests eine Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Eine Übersicht aller bisher sequenzierter Gene des *meta*-Weges in *P. putida* GJ31 ist in Tabelle 4.3 gegeben.

Tab. 4.3: Übersicht über die Enzyme des *meta*-Weges in *P. putida* GJ31, basierend auf bisher sequenzierten Genen.

Enzymfunktion	Enzyme in GJ31	Höchste Identität der Proteinsequenz, Stamm (NCBI Accession No.)	Lage der Gene
Ferredoxin	CbzT ^a	100% <i>P. fluorescens</i> (AAP51202.1)	<i>cbzTEGX</i> -Cluster
Catechol 2,3-Dioxygenase	CbzE ^a	97% <i>P. fluorescens</i> (AAP51203.1)	<i>cbzTEXG</i> -Cluster
	CbzE2 ^b	95% <i>P. putida</i> (AF176355)	<i>meta</i> -operon
	CbzE3 ^b	99% <i>P. putida</i> (J04996)	Chromosom
2-HMS-Dehydrogenase	CbzG ^b	100% <i>P. fluorescens</i> (AAP51205.1)	<i>cbzTEXG</i> -Cluster
	NahI	93% <i>P. stutzeri</i> (BAA31265.1)	<i>cbzTEXG</i> -Cluster
2-HMS-Hydrolase	NahN	96% <i>P. stutzeri</i> (AAD02150.1)	<i>nah</i> -Cluster
	cbzF ^b	46% <i>Rubrivivax gelatinosus</i> (ZP_00245306)	<i>meta</i> -Operon
4-Oxalocrotonat-Tautomerase	NahJ	95% <i>P. stutzeri</i> (AAD02155.1)	<i>nah</i> -Cluster
4-Oxalocrotonat-Decarboxylase	NahK	97% <i>P. stutzeri</i> (AAD02154.1)	<i>nah</i> -Cluster
2-Oxopent-4-enoat-Hydratase	CbzJ ^b	35% <i>C. testosteroni</i> (AB029044)	<i>cbzTEXG</i> -Cluster
	CbzJ2 ^b	67% <i>E. coli</i> (AP002551)	<i>meta</i> -Operon
	NahL	91% <i>Pseudomonas</i> sp. (AAO19118.1)	<i>nah</i> -Cluster
2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase	CbzK ^b	84% <i>E. coli</i> (AE000142)	<i>meta</i> -Operon
	NahM	100% <i>P. stutzeri</i> (AAD02153)	<i>nah</i> -Cluster
Acetaldehyd-Dehydrogenase	CbzQ ^b	82% <i>P. putida</i> (M94186)	<i>meta</i> -Operon
	NahO	98% <i>Pseudomonas</i> sp. (AF320981)	<i>nah</i> -Cluster
Chloracetaldehyd-Dehydrogenase	AldA	88% <i>P. putida</i> (NP_742708.1)	<i>aldA</i>

Erläuterungen a: Mars *et al.* (1999), b: Kunze (2002).

Bei dem 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 Car

bonsäure entfällt (siehe **Abb. 4.3.1**). Dennoch konnten Mars *et al.* (1997) eine hohe Aktivität dieser beiden Folgeenzyme im Rohextrakt von *P. putida* 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.

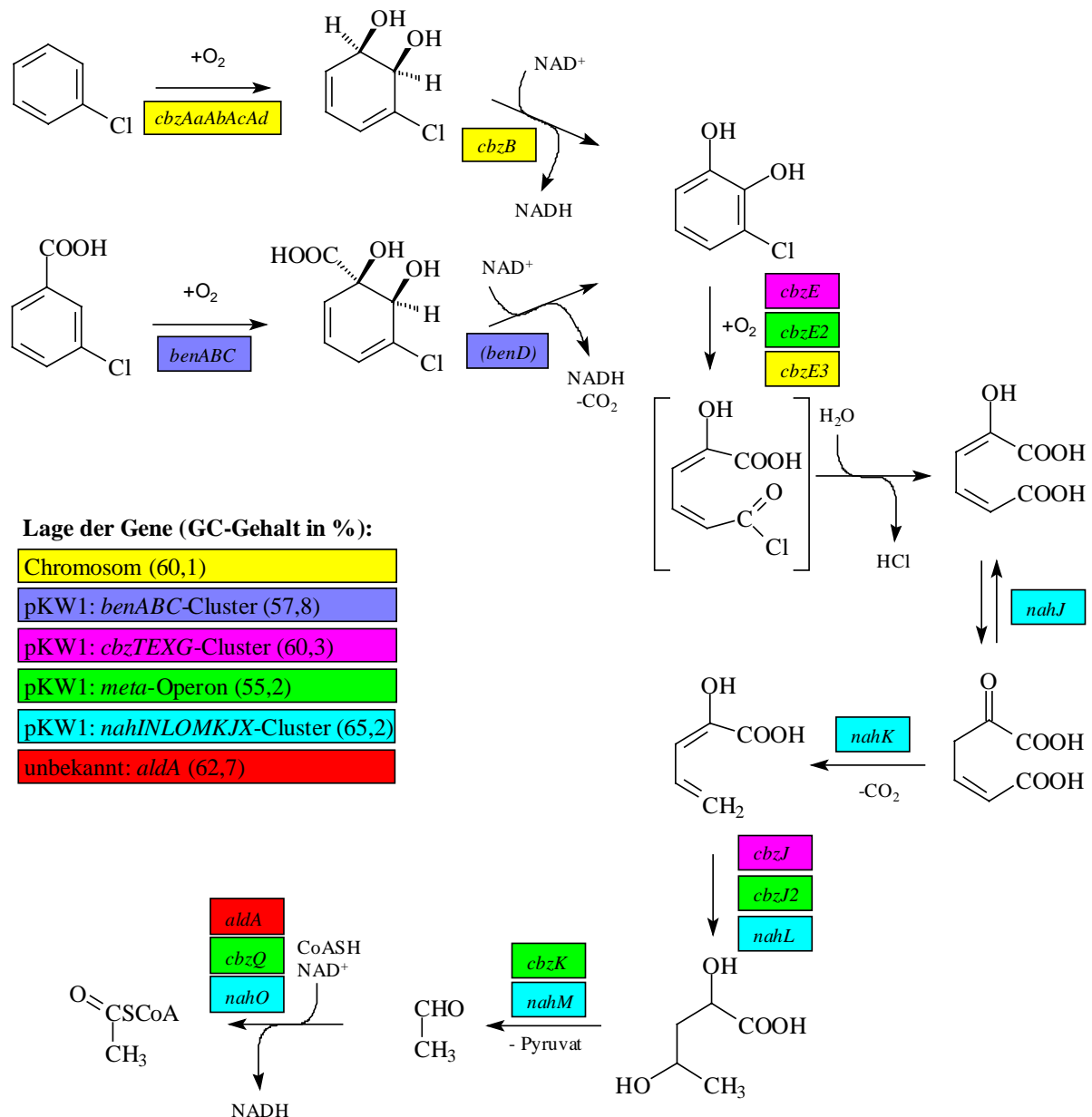


Abb. 4.3.1: Abbau von Chlorbenzol bzw. 3-Chlorbenzoat über den *meta*-Weg in *P. putida* GJ31. Die Enzymbezeichnungen der angegebenen Gene sind wie folgt: *cbzAaAbAcAd*: Chlorbenzol-Dioxygenase-Untereinheit-A, Untereinheit-B, Ferredoxin, NADH-Reduktase, *cbzB*: Chlorbenzol-dihydrodiol-Dehydrogenase, *benABC*: Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-A, Untereinheit-B, Benzoat-Dioxygenase-Ferredoxin-Reduktase, *benD*: *cis*-Dihydrodiol-Dehydrogenase, *cbzE*: Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase, *cbzE2*, *cbzE3*: Catechol-2,3-Dioxygenase, *nahJ*: 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, *nahK*: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, *cbzJ*, *cbzJ2*, *nahL*: 2-Oxopent-4-enoat-Hydratase, *cbzK*, *nahM*: 2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase, *aldA*: Chloracetaldehyd-Dehydrogenase, *cbzQ*, *nahO*: Acetaldehyd-Dehydrogenase. Den farbigen Markierungen ist zu entnehmen, welchem Cluster die jeweiligen Gene der (Iso-)Enzyme angehören. (*benD*) bedeutet, dass dieses Gen bisher nicht in *P. putida* GJ31 sequenziert wurde, die zugehörige Enzymaktivität aber auf Grund von Enzymtests bewiesen ist.

Entweder werden diese Enzyme konstitutiv exprimiert oder sie liegen organisiert in einem *meta*-Operon vor und werden auf Grund der Bildung eines Polycistrons exprimiert. Da beim Umsatz von 3-Chlorcatechol durch eine Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase ein instabiles Säurechlorid entsteht, das mit Wasser spontan zu 2-Hydroxymuconat hydrolysiert, werden bei diesem Abbau nur die Enzyme des dehydrogenolytischen Zweiges des *meta*-Weges benötigt. Dies sind die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase und -Decarboxylase. Für beide Enzyme konnten in dieser Arbeit die zugehörigen Gene sequenziert werden (*nahJ* bzw. *nahK*). Eine 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase wird wegen der automatischen Hydrolyse des Säurechlorids nicht benötigt (siehe **Abb. 4.3.1**).

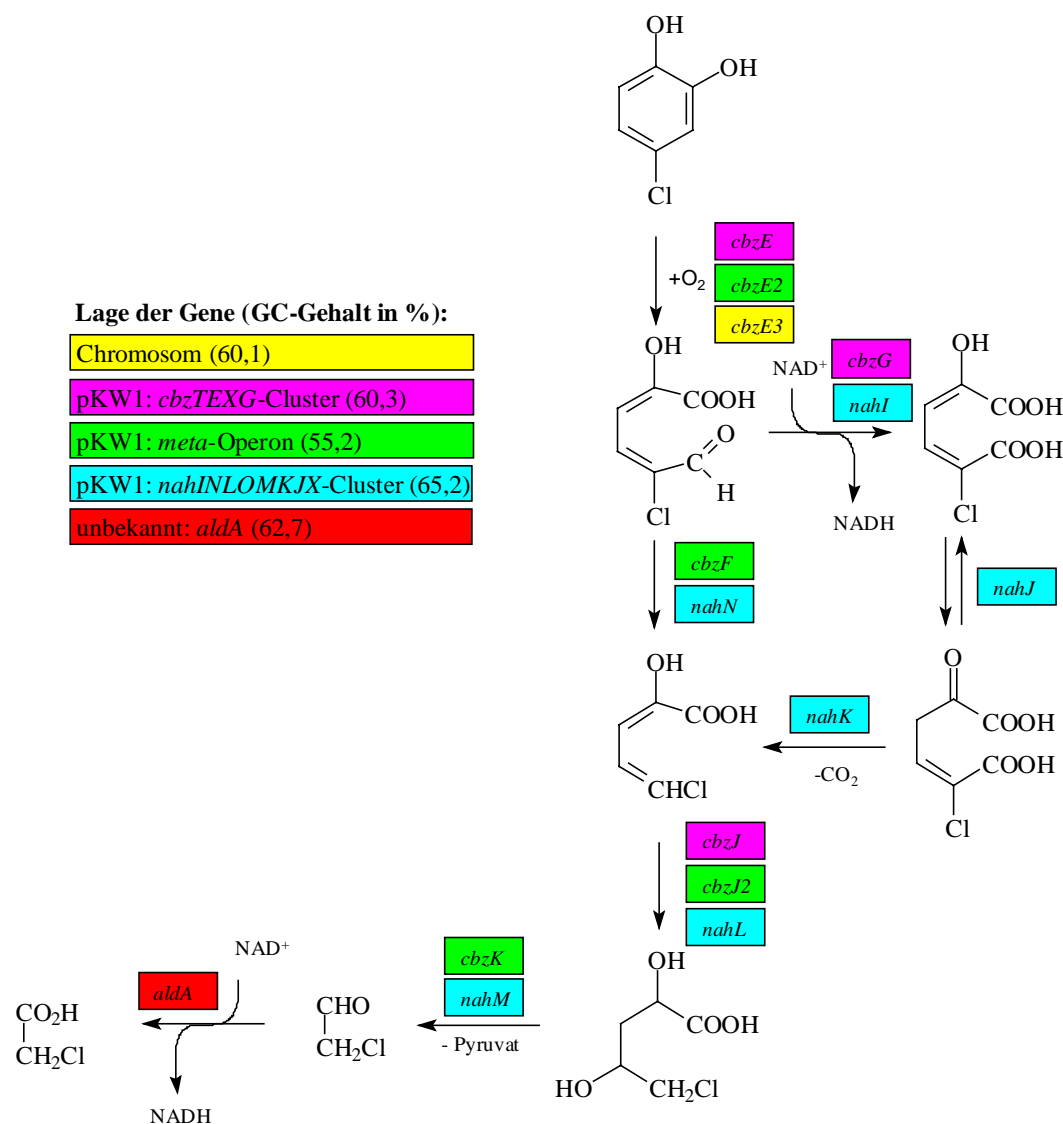


Abb. 4.3.2: Abbau von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg in *P. putida* GJ31. Die Enzymebezeichnungen der angegebenen Gene sind wie folgt: *cbzE*: Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase, *cbzE2*, *cbzE3*: Catechol-2,3-Dioxygenase, *cbzF*, *nahN*: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, *nahI*: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, *nahJ*: 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, *nahK*: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, *cbzJ*, *cbzJ2*, *nahL*: 2-Oxopent-4-enoat-Hydratase, *cbzK*, *nahM*: 2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase, *aldA*: Chloracetaldehyd-Dehydrogenase. Den farbigen Markierungen ist zu entnehmen, welchem Cluster die jeweiligen Gene der (Iso-)Enzyme angehören.

Es konnten für alle Enzymschritte des *meta*-Abbauweges von 4-Chlorcatechol die jeweiligen Gene in *P. putida* GJ31 entdeckt werden (siehe **Abb.** 4.3.2). Es gelang, für alle enzymatischen Schritte des Abbaus von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg im Rohextrakt von *P. putida* GJ31 die jeweilige Aktivität nachzuweisen (Reifenrath, pers. Mitteilung).

Bei einem Abbau von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg in *P. putida* GJ31 konnte festgestellt werden, dass es eine Aktivität für den Umsatz von 5-Chlor-2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd mittels Hydrolase im Rohextrakt von *P. putida* GJ31 gab. Für diese Aktivität kann allerdings nicht das Enzym CbzF verantwortlich sein, da CbzF aus *P. putida* GJ31 kein chloriertes Substrat umsetzt (Kunze, 2002; Reifenrath, pers. Mitteilung). Es wurde vermutet, dass somit ein weiteres Isoenzym existiert. Mit der Sequenzierung des offenen Leserahmens *nahN* wurde ein Gen entdeckt, das nach Sequenzvergleichen als putative 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase eingeordnet werden kann (Experimente und Ergebnisse 3.2.4.2). Ein experimenteller Beweis der Enzymaktivität, insbesondere für chlorierte Substrate, steht allerdings aus.

Mit dem offenen Leserahmen *nahI*, der bisher noch nicht vollständig sequenziert wurde, konnte ein putatives Gen für eine 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase in *P. putida* GJ31 gefunden werden (Experimente und Ergebnisse 3.2.4.1).

Die putativen Acetaldehyd-Dehydrogenasen NahO (diese Arbeit) und CbzQ (Kunze, 2002) wurden auf eine Aktivität zum Umsatz von Chloracetaldehyd getestet. Beide Enzyme waren dazu nicht in der Lage und konnten nur das unchlorierte Substrat unter Verbrauch von NADH CoA-abhängig umsetzen (Experimente und Ergebnisse 3.2.4.4). Mit der Sequenzierung von *aldA* aus *P. putida* GJ31 und der Expression des Genprodukts AldA in *E.coli* Dh5 α (Experimente und Ergebnisse 3.4.3) gelang es, eine starke auch CoA-unabhängige Dehydrogenase-Aktivität sowohl für das unchlorierte als auch das chlorierte Acetaldehyd nachzuweisen. AldA aus *P. putida* GJ31 kann somit als Chloracetaldehyd-Dehydrogenase bezeichnet werden. Bei Aminosäuresequenzvergleichen mit weiteren Chloracetaldehyd-Dehydrogenasen konnte allerdings nur eine Ähnlichkeit von rund 65-67% ermittelt werden (Experimente und Ergebnisse 3.4.3, **Tab.** 3.4.3.1). Ähnlicher war die Aminosäuresequenz von GJ31-AldA mit den Sequenzen von Acetaldehyd-Dehydrogenasen aus *P. putida* KT2440 (88 bzw. 86% Ähnlichkeit).

4.4 Die Entstehung von *P. putida* GJ31* aus *P. putida* GJ31: Erklärungsmodelle für die Unterschiede in der Regulation der Benzoat-Dioxygenase-Aktivität

P. putida GJ31 wächst nicht auf 3-Chlorbenzoat. *P. putida* GJ31* wurde durch 3-Chlorbenzoat-Selektion aus *P. putida* GJ31 erhalten (siehe Experimente und Ergebnisse 3.3.1) und nutzt dieses Substrat als Kohlenstoff- und Energiequelle. Mit ganzen Zellen von *P. putida* GJ31, angezogen auf Benzoat, war festgestellt worden, dass Benzoat und 3-Chlorbenzoat ebenso wie in *P. putida* GJ31* umgesetzt wird (Zerlin, 2002 und Experimente und Ergebnisse 3.5.5). Es wurde vermutet, dass eine Veränderung in der Nukleotidsequenz des Benzoat-Dioxygenase-Clusters die Ursache für die Fähigkeit von *P. putida* GJ31* zum Wachstum auf 3-Chlorbenzoat sein könnte. In beiden Stämmen wurde der Gencluster *benRXABC* sequenziert, der für Enzyme des Benzoat-Abbaus kodiert (Experimente und Ergebnisse 3.5). Im Regulatorgen *benR* konnte im Vergleich von GJ31-*benR* und GJ31*-*benR* eine Mutation von zwei Nukleotiden festgestellt werden. Um festzustellen, ob die somit bedingte Veränderung der Aminosäuresequenz von BenR in Stamm GJ31* eine unterschiedliche Induktion durch verschiedene Benzoate bewirkt, wurden die Induktion nach Cowles *et al.* (2000) getestet (Experimente und Ergebnisse 3.5.4.2). In beiden Stämmen konnte mit dem Induktor 3-Chlorbenzoat keine erhöhte β -Galactosidaseaktivität im Vergleich zu der Kontrolle, angezogen auf Succinat ohne Induktor, festgestellt werden. Dagegen wurde für *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* mit Benzoat eine mindestens doppelt erhöhte Aktivität im Vergleich zu der Kontrolle ohne Induktor beobachtet. Es konnte somit festgestellt werden, dass es zwischen *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* keinen Unterschied bei der Induktion mittels *benR* mit Benzoat bzw. Nichtinduktion mit 3-Chlorbenzoat gibt. Zur Überprüfung des Einflusses von Benzoat und 3-Chlorbenzoat auf die Induktion des Abbaus von Benzoat wurden die *cis*-Dihydrodiolbenzoat-Dehydrogenase-Enzymaktivitäten (DHB-Dehydrogenase, BenD) in Abhängigkeit von den Induktoren getestet (siehe Experimente und Ergebnisse 3.5.7). In *P. putida* GJ31* konnte eine Induktion der DHB-Dehydrogenase durch 3-Chlorbenzoat beobachtet werden, was in *P. putida* GJ31 nicht möglich war. In *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* ist Benzoat im Vergleich zu 3-Chlorbenzoat der bessere Induktor für die DHB-Dehydrogenaseaktivität. Die Ergebnisse lassen mehrere Spekulationen über die Veränderung der Induktion des Benzoat-Abbaus bei der Generierung von *P. putida* GJ31* und den Widerspruch zwischen den Ergebnissen über die Nichtinduktion von *benR* und die Induktion von *benD* durch 3-Chlorbenzoat zu.

1. Die durch 3-Chlorbenzoat in *P. putida* GJ31 induzierte DHB-Dehydrogenase-Aktivität könnte nicht auf BenD sondern auf einem Isoenzym beruhen, dass nicht der Regulation

des in dieser Arbeit sequenzierten *benRXABC*-Clusters unterworfen ist. Hybridisierungsexperimente (Experimente und Ergebnisse 3.5.2) haben gezeigt, dass es in *P. putida* GJ31 durchaus weitere *benA*-ähnliche Benzoat-Dioxygenase-Untereinheiten-A gibt. Die Betrachtung am Beispiel der anderen Gencluster in *P. putida* GJ31 hat gezeigt, dass es für eine Enzymaktivität durchaus mehrere Isoenzyme in verschiedenen Genclustern geben kann (Diskussion 4.3 und 4.1.4).

2. Clark *et al.* (2004) haben am Beispiel des Benzoat-Dioxygenase-Regulators BenM gezeigt, dass neben Benzoat vor allem *cis,cis*-Muconat als Aktivator des Benzoat-Abbaus durch den *benABCD*-Cluster in *Acinetobacter* sp. ADP1 bei Wachstum auf Benzoat dient. Allerdings baut Stamm ADP1 den Metaboliten Catechol, aus dem das Muconat durch eine Catechol-1,2-Dioxygenase gebildet wird, über den *ortho*- und nicht den *meta*-Weg ab. BenM bildet nur mit Benzoat und Muconat zusammen eine veränderte Konformation des BenM-Tetramers, die zu einem Kontakt mit der RNA-Polymerase und so zu einer Transkription von *benA* führt. Dieses Modell könnte aber trotzdem auf den Regulator BenR in *P. putida* GJ31 übertragen werden, da BenR zu BenM zwar nur rund 26% ähnlich aber zu 46% strukturell ähnlich ist. Beim Abbau von Catechol bzw. 3-Chlorcatechol über den *meta*-Weg entsteht unter anderem das Zwischenprodukt 2-Hydroxymuconsäure. 2-Hydroxymuconsäure könnte eventuell ähnlich wie Muconsäure bei BenM einen erheblichen Einfluss auf die Regulation im Zusammenspiel von BenR und Benzoaten ausüben. Untersuchungen des Abbaus von 3-Chlorbenzoat durch *P. putida* GJ31* haben gezeigt, dass der Abbau von 3-Chlorbenzoat durch Acetat-angezogene Zellen zwar direkt nach Zugabe des Substrats beginnt, sich aber nach rund 1 Stunde erheblich verstärkt (Zerlin, 2002). 2-Hydroxymuconsäure entsteht in *P. putida* GJ31* spontan bei der Hydrolyse des Säurechlorids 6-Chlor-2-hydroxymuconsäure. Sollte 2-Hydroxymuconsäure ein verstärkend wirkender Induktor sein, würde das die oben dargestellte Beobachtung eines verzögerten verstärkten Abbaus erklären.
3. An der Regulation von Abbauwegen sind häufig mehrere Regulatoren und Induktoren in einem komplizierten Zusammenspiel der Substrate und Metabolite beteiligt. Ramos *et al.* (1997) haben die Regulation des oberen Abbauweges und des *meta*-Weges auf dem TOL-Plasmid pWW0 aus *P. putida* PaW1 unter der Beteiligung der Regulatoren XylS und XylR untersucht (Worsey *et al.*, 1978; Abril *et al.*, 1989; Gallegos *et al.*, 1996). Bisher wurden mehrere regulatorähnliche Gene in *P. putida* GJ31 nachgewiesen. Bei der Sequenzierung des *meta*-Operons in *P. putida* GJ31 (Kunze, 2002) wurde ein Regulator-Gen (*gntR*) sequenziert. Es handelt sich bei dem Genprodukt um einen negativen

Regulator. Des Weiteren konnten zwei weitere offene Leserahmen (ORF3 und ORF4) sequenziert werden. ORF4 könnte ein Induktor sein. Außerdem könnte es sich bei ORF3 um ein Signalprotein handeln. Die Übereinstimmungen mit Sequenzen aus Datenbanken sind allerdings so gering, dass eine eindeutige Zuordnung nicht möglich ist (Kunze, 2002). ORF3 muss als Protein unbekannter Funktion eingeordnet werden. Außerdem wurde von Kunze (2002) ein oberer Abbauweg (Benzol-Dioxygenase) sequenziert. Die Sequenz ist mit dem *tod*-Operon aus *P. putida* F1 (NCBI Acc. No. J04996) sehr stark verwandt. Im Bereich stromabwärts von *todE* finden sich weitere Enzyme des *meta*-Weges mit zwei Regulatoren. Vermutlich könnte dies auch der Fall in *P. putida* GJ31 stromabwärts von *cbzE3* sein. Möglicherweise spielen einige dieser Regulatoren auch für den Benzoat-Abbau eine Rolle und sind bei der Entstehung von *P. putida* GJ31* verändert worden.

4. Reams und Neidle (2004) beschrieben die Möglichkeit, dass ein Operon durch Tandem-Duplikation unter einen neuen regulatorischen Kontext fallen kann. Auch diese Theorie wäre auf die Entstehung der Mutante *P. putida* GJ31* anwendbar. Ein putativer zweiter oder dritter bisher nicht untersuchter Gencluster neben *benABC*, der für Enzyme des Benzoat-Abbaus in *P. putida* GJ31 kodiert, könnte durch die Tandem-Duplikation unter den Einfluss eines anderen Regulators fallen, der zusammen mit 3-Chlorbenzoat die Strukturgene induziert.

4.5 Ausblick

Gene und Enzyme des *meta*-Weges in *P. putida* GJ31 konnten durch diese Arbeit gefunden und charakterisiert werden. Insgesamt sind nun 47 offene Leserahmen in *P. putida* GJ31 untersucht. Der Abbauweg für Chlorbenzol, der Abbauweg von 3-Chlorbenzoat und der *meta*-Weg umfassen mehrere enzymatische Reaktionsschritte. In *P. putida* GJ31 konnte die Enzymaktivität jedes Schritts im Rohextrakt gemessen (Mars *et al.*, 1997, 1999; Kranz, 2001; Kunze, 2002; Zerlin, 2002, Reifenrath, pers. Mitteilung) und für jeden Reaktionsschritt mindestens ein Gen in *P. putida* GJ31 beschrieben werden, das nach Sequenzvergleichen über die jeweilige putative Aktivität verfügt (Mars *et al.*, 1999; Kunze, 2002; diese Arbeit).

Auch für den Abbau von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg sind nun alle Gene sequenziert, die für die zugehörigen enzymatischen Schritte kodieren. Einige Enzyme wurden auf ihre spezifische Aktivität getestet. Allerdings müssen noch einige Enzyme untersucht werden. Insbesondere die Enzyme der jeweiligen Gene des *nahINLOMKJX*-Cluster, vor allem die 2-

Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase NahI und die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase NahN, sollten charakterisiert werden.

Auch über die genaue Funktion vieler postulierter und putativer Regulatoren ist noch wenig bekannt. Aus Experimenten mit ganzen Zellen und aus Induktionsversuchen konnten aber erste Hinweise auf die Eigenschaften des Regulatorgens *benR* gewonnen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Enzyme des *cbzTEXG*-Clusters und *meta*-Operons konstitutiv sind.

Insbesondere in Bezug auf die Entstehung von *P. putida* GJ31*, konnten bisher einige Hinweise für die oben erläuterten Theorien zur regulativen Veränderung von *P. putida* GJ31 gesammelt werden, die es der Mutante GJ31* ermöglichen, 3-Chlorbenzoat zu metabolisieren. Hier könnte vor allem die Induktion des Regulators *benR* nach Cowles *et al.* (2000) mit 2-Hydroxymuconsäure und Muconsäure nach den Ergebnissen von Clark *et al.* (2004) überprüft werden. Zur Klärung regulativer Effekte durch verschiedene Induktoren kann vor allem die Methode der RT-PCR (RT = Reverse Transkriptase) eingesetzt werden.

Mit den Sequenzierungen der Gencluster, sowie den PCR-Experimenten und Hybridisierungen in *P. putida* GJ31, *P. putida* GJ31* und *P. putida* QM1 konnte ein Einblick in die Entstehung der Abkömmlinge von *P. putida* GJ31 erzielt werden. Auf Grundlage von nun rund 33 kbp Nukleotidsequenz von pKW1 aus *P. putida* GJ31 können gezielte Untersuchungen an den Plasmiden der Abkömmlinge mittels PCR-Strategien und Hybridisierungsexperimenten durchgeführt werden, die weiteren Aufschluss über die Veränderungen von pKW2 und pZSG1 im Vergleich zu pKW1 geben. Eventuell könnte eine komplette Sequenzierung von pKW1 diese Arbeiten erleichtern. Insbesondere die Bereiche des Plasmidrückrats von pKW1, mit Ausnahme des *tra*-Operons, sind noch weitestgehend unbekannt. Ebenfalls ungeklärt ist die Inkompatibilitätsgruppe von pKW1, auch wenn die IncP-Gruppe ausgeschlossen werden konnte.

Diese Arbeit hat gezeigt, wie erfolgreich die gezielte Suche nach Genen, die für postulierte Enzyme von nachgewiesenen Abbauwegen kodieren, mittels PCR sein kann. Es wurden in den Arbeiten von Mars *et al.* (1999), Kunze (2002) und dieser Arbeit fünf Gencluster isoliert und sequenziert. Diese kodieren für Enzyme des Chlorbenzol-, des Benzoat-Abbaus und drei Cluster mit zwei Untergruppen, die für Enzyme des *meta*-Weges kodieren. Diese Methodik ermöglicht in Kombination mit der Methode des Genom Walks eine schnelle Sequenzierung der Gene von Abbauwegen. Trotzdem kann eine komplette Sequenzierung trotz des höherem Aufwands natürlich eine bessere und vollständigere Übersicht aller Gene geben, die es in einem Organismus oder auf einem Plasmid gibt.

Diese Arbeit hat zudem gezeigt, dass nur biochemische Tests, wie zum Beispiel Enzymtests, die Analyse von Abbauwegen und ihrer einzelnen Schritte vervollständigen und eindeutig klären können.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Organisation der Gene des *meta*-Weges und des Benzoat-Abbaus in *P. putida* GJ31 untersucht. Insbesondere wurde das Plasmid pKW1 durch Cluster-Analyse näher untersucht, um seine Organisation und Struktur weiter aufzuklären. Hierbei war es hilfreich, Abkömmlinge von *P. putida* GJ31 mit veränderten Eigenschaften in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Dies waren *P. putida* GJ31* und *P. putida* QM1.

- Aus *P. putida* GJ31 und seinen Abkömmlingen *P. putida* GJ31 und *P. putida* QM1 wurden die Plasmide pKW1, pKW2 und pZSG1 isoliert und ihre Größe (189 kbp, 180 kbp und 181 kbp) nach Restriktionen festgestellt.
- Für das Plasmid pKW1 konnte mit PCR-Experimenten nach Götz *et al.* (1996) gezeigt werden, dass es nicht zu den Inkompatibilitätsgruppen IncP, IncW, IncQ und IncN zählt.
- Es konnte in *P. putida* GJ31 neben dem *cbz*TEXG-Cluster und dem *meta*-Operon in dieser Arbeit ein dritter Gencluster auf pKW1 mit Genen kodierend für Enzyme des *meta*-Weges sequenziert werden (*nah*INLOMKJX-Cluster). Dabei wurden auf rund 5,9 kbp Sequenz sieben vollständige offene Leserahmen und ein unvollständiger offener Leserahmen gefunden. Den offenen Leserahmen konnten durch Sequenzvergleiche folgende enzymatische Funktionen zugewiesen werden: *nahI* (unvollständig): 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, *nahN*: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, *nahL*: 2-Oxopent-4-enoat-Hydratase, *nahO*: Acetaldehyd-Dehydrogenase, *nahM*: 2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase, *nahK*: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, *nahJ*: 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, *nahX*: unbekannte Funktion.
- Die Gene *nahO* (Acetaldehyd-Dehydrogenase) und *nahK* (4-Oxalocrotonat-Decarboxylase) konnten erfolgreich exprimiert und somit die ihnen auf Grund von Sequenzvergleichen zugewiesene Funktion durch enzymatische Untersuchungen bestätigt werden.
- Es konnte in *P. putida* GJ31 stromabwärts des *cbz*TEXG-Clusters auf pKW1 eine rund 5,5 kbp große Nukleotidsequenz isoliert werden, die als Transposonbereich Tn5501 identifiziert wurde. Den zwei offenen Leserahmen dieser Sequenz wurde nach Sequenzvergleichen folgende enzymatische Funktion zugewiesen: *tnpR*: Resolvase, *tnpA4*: Transposase. Außerdem konnten zwei Inverted repeats an den Rändern des Transposonbereiches identifiziert werden.

- In *P. putida* GJ31 konnte eine rund 2,1 kbp große Nukleotidsequenz mit einem offenen Leserahmen isoliert werden. Dem offenen Leserahmen dieser Sequenz wurde nach Sequenzvergleichen folgende enzymatische Funktion zugewiesen: *aldA*: Chloracetaldehyd-Dehydrogenase. Nach erfolgreicher Expression in *E. coli* konnte die enzymatische Funktion von AldA nachgewiesen werden. AldA aus *P. putida* GJ31 ist eine NADH-abhängige und CoA-unabhängige Chloracetaldehyd-Dehydrogenase.
- Es konnte in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* der Gencluster *benRXABC* auf pKW1 bzw. pKW2 sequenziert werden. Dabei wurden in *P. putida* GJ31 auf rund 5,9 kbp Nukleotidsequenz fünf vollständige und ein unvollständiger offener Leserahmen und in *P. putida* GJ31* auf rund 5,1 kbp Nukleotidsequenz vier vollständige und ein unvollständiger Leserahmen sequenziert und identifiziert. Den offenen Leserahmen konnten durch Sequenzvergleiche folgende enzymatische Funktionen zugewiesen werden: GJ31-ORF: unbekannte Funktion, *benR*: Regulator, *benX*: unbekannte Funktion, *benA*: Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-A, *benB*: Benzoat-Dioxygenase-Untereinheit-B, *benC* (unvollständig): Benzoat-Dioxygenase-Ferredoxin-Reduktase.
- Es wurde festgestellt, dass sich die Nukleotidsequenzen von *benR* aus *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* in zwei Positionen unterscheiden.
- Auf Grund der Mutation der Nukleotidsequenz von *benR* in Stamm GJ31 zu seinem Abkömmling Stamm GJ31*, ist die Aminosäuresequenz der Regulatoren gleichermaßen in zwei Positionen verändert. Die Induktion von *benR* in *P. putida* GJ31 und Stamm GJ31* mit Benzoat und 3-Chlorbenzoat wurde nach Cowles *et al.* (2000) untersucht. Das Experiment erbrachte keine Unterschiede in der Induktion von BenR in *P. putida* GJ31 und *P. putida* GJ31* mit Benzoat oder 3-Chlorbenzoat als Induktor.
- Durch Messung von Umsatzraten mit verschiedenen Benzoaten konnte die Benzoat-Dioxygenase-Aktivität in *P. putida* GJ31 und in Stamm GJ31* verglichen werden. Die Umsatzraten für die verschiedenen Benzoate waren in beiden Stämmen gleich.
- Durch Messung von Enzymtests wurde die Induktion der DHB-Dehydrogenase und der Catechol-2,3-Dioxygenase durch Benzoat und 3-Chlorbenzoat in *P. putida* GJ31 und Stamm GJ31* untersucht. 3-Chlorbenzoat führt in Stamm GJ31* im Gegensatz zum Wildstamm GJ31 zur Induktion der DHB-Dehydrogenase.
- In Stamm QM1 wurde nachgewiesen, dass fast 9 kbp der Nukleotidsequenz des *cbzTEXG*-Clusters ausgeschnitten und vermutlich ersetzt worden sind. *P. putida* QM1 verfügt nicht über den *nahINLOMKJX*- aber wie *P. putida* GJ31 und Stamm GJ31* auch über den *benRXABC*-Cluster.

6 Literatur

Abril, M.-A.; Michan, C.; Timmis, K. N. und Ramos, J. L. **1989**. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *Journal of Bacteriology*, 171, 6782-6790.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. und Lipman, D. J. **1990**. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.

Alsmark, C. M.; Frank, A. C.; Karlberg, E. O.; Legault, B. A.; Ardell, D. H.; Canback, B.; Eriksson, A. S.; Naslund, A. K.; Handley, S. A.; Huvet, M.; La Scola, B.; Holmberg, M. und Andersson, S. G. E. **2004**. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Unveröffentlicht*.

Arai, H.; Yamamoto, T.; Ohishi, T.; Shimizu, T.; Nakata, T. und Kudo, T. **1999**. Genetic organization and characteristics of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid degradation pathway of *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiology*, 145, 2813-2820.

Arakawa, Y.; Murakami, M.; Suzuki, K.; Ito, H.; Wacharotayankun, R.; Ohsuka, S.; Kato, N. und Ohata, M. **1995**. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1612-1615.

Arensdorf, J. J. und Focht, D. D. **1994**. Formation of chlorocatechol *meta* cleavage products by a pseudomonad during metabolism of monochlorobiphenyls. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2884-2889.

Assinder, S. J. und Williams, P. A. **1990**. The TOL plasmids: Determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Advanced Microbial Physiology*, 31, 1-69.

Austin, S. und Nordström, K. **1990**. Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell*, 60, 351-354.

Baker, T. A. und Luo, L. **1994**. Identification of residues in the Mu transposase essential for catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 6654-6658.

Barbe, V.; Vallenet, D.; Fonknechten, N.; Kreimeyer, A.; Oztas, S.; Labarre, L.; Cruveiller, S.; Robert, C.; Duprat, S.; Wincker, P.; Ornston, L. N.; Weissenbach, J.; Marliere, P.; Cohen, G. N. und Medigue, C. **2004**. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Research*, im Druck.

Bartels, I., Knackmuss, H.-J und Reineke, W. **1984**. Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 500-505.

Beil, S.; Happe, B.; Timmis, K. N. und Pieper, D. H. **1997**. Genetic and biochemical characterization of the broad spectrum chlorobenzene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain PS12. Dechlorination of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene. *European Journal of Biochemistry*, 247, 190-199.

Beil, S.; Timmis, K. und Pieper, D. H. **1999**. Genetic and biochemical analysis of the *tec* operon suggests a route for evolution of chlorobenzene degradation genes. *Journal of Bacteriology*, 181, 341-346.

Berg, D. und Howe, M. **1989**. Mobile DNA. *American Society for Microbiology*, Washington, DC.

Bergeron, H.; Labbe, D.; Turmel, C. und Lau, P. C. **1998**. Cloning, sequencing and expression of a linear plasmid-based and a chromosomal homolog of chloroacetaldehyde dehydrogenase-encoding genes in *Xanthobacter autrophicus* GJ10. *Gene*, 207, 9-18.

Bhat, M. A.; Tsuda, M.; Horiike, K.; Nozaki, M.; Vaidyanathan, C.S. und Nakazawa, T. **1994**. Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 307-312.

Bradford, M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Bosch, R.; Garcia-Valdes, E. und Moore, E. R. **2000**. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 245, 65-74.

Buell, R.; Joardar, V.; Lindeberg, M.; Selengut, J.; Paulsen, I. T.; Gwinn, M. L.; Dodson, R. J.; Deboy, R. T.; Durkin, A. S.; Kolonay, J. F.; Madupu, R.; Daugherty, S.; Brinkac, L.; Beanan, M. J.; Haft, D. H.; Nelson, W. C.; Davidsen, T.; Zafar, D.; Zhou, L.; Liu, J.; Yuan, Q.; Khouri, H.; Fedorova, N.; Tran, B.; Russel, D.; Berry, K.; Utterback, T.; Van Aken, S. E.; Feldblyum, T. V.; D'Ascenzo, M.; Deng, W. L.; Ramos, A. R.; Alfano, J. R.; Cartinhour, S.; Chatterjee, A. K.; Delaney, T. P.; Lazarowitz, S. G.; Martin, G. B.; Schneider, D. J.; Tang, X.; Bender, C. L.; White, O.; Fraser, C. und Collmer, A. **2003**. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100, 10181-10186.

Burke, K. A. und Wilcox, G. **1987**. The *araC* gene of *Citrobacter freundii*. *Gene*, 61, 243-252.

Butler, C. S. und Mason, J. R. **1997**. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Advanced Microbial Physiology*, 38, 47-84.

Catelani, D.; Sorlini, C. und Treccani, V. **1971**. The metabolism of biphenyl by *Pseudomonas putida*. *Experientia*, 27, 1173-1174.

Chakrabarty, A. M. **1972**. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, 112, 815-823.

Chakrabarty, A. M.; Chou, G. und Gunsalus, I. C. **1973**. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70, 1137-1140.

Chatterjee, D. K.; Kellogg, S. T.; Hamada, S. und Chakrabarty, A. M. **1981**. Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified *ortho* pathway. *Journal of Bacteriology*, 146, 639-646.

Clark, T. J.; Phillips, R. S.; Bundy, B. M.; Momany, C. und Neidle, E. L. **2004**. Benzoate decreases the binding of *cis,cis*-Muconate to the BenM regulator despite the synergistic effect of both compounds on transcriptional activation. *Journal of Bacteriology*, 186, 1200-1204.

Cleton-Jansen, A.-M.; Goosen, N.; Fayet, O. und van de Putte, P. **1990**. Cloning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 172, 6308-6315.

Collier, L. S.; Gaines III, G. L. und Neidle, E. L. **1998**. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, LysR-type transcriptional activator. *Journal of Bacteriology*, 180, 2493-2501.

Collis, C. M.; Grammaticopoulos, G.; Briton, J.; Stokes, H. W. und Hall, R. M. **1993**. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Molecular Microbiology*, 9, 41-52.

Collis, C. M.; Recchia, G. D.; Kim, M.-J.; Stokes, H. W. und Hall, R. M. **2001**. Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1. *Journal of Bacteriology*, 183, 2535-2542.

Collis, C. M.; Kim, M.-J.; Partridge, S. R.; Stokes, H. W. und Hall, R. M. **2002**. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *Journal of Bacteriology*, 184, 3017-3026.

Cowles, Charles E.; Nichols, N. N. und Harwood, C. S. **2000**. BenR, a XylS homologue, regulates the aromatic acids degradation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 182, 6339-6346.

Davis, J. K.; Paoli, G. C.; He, Z.; Nadeau, L. J.; Somerville, C. C. und Spain, J. C. **2000**. Sequence analysis and initial characterization of two isozymes of hydroxylaminobenzene mutase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2965-2971.

Don, R. H. und Pemberton, J. M. **1981**. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 145, 681–686.

Dorn, E.; Hellwig, M.; Reineke, W. und Knackmuss, H.-J. **1974**. Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. *Archives of Microbiology*, 99, 61-70.

Dorn, E. und Knackmuss, H.-J. **1978a**. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad. *Biochemical Journal*, 174, 73-84.

Dorn, E. und Knackmuss, H.-J. **1978b**. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. *Biochemical Journal*, 174, 85-94.

Draper, G. C. und Gober, J. W. **2002**. Bacterial chromosome segregation. *Annual Review of Microbiology*, 56, 567-597.

Dröge, M.; Pühler, A und Selbitschka, W. **2000**. Phenotypic and molecular characterization of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge. *Molecular and General Genetic*, 263, 471-482.

Dunn, N. W. und Gunsalus, I. C. **1973**. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 114, 974-979.

Ellis, L. B. M., Hershberger, C. D.; Bryan, E. M. und Wackett, L. P. **2001**. The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: Emphasizing Enzymes. *Nucleic Acids Research*, 29, 340-343.

- Eltis, L. D. und Bolin, J. T. **1996**. Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, 178, 5930-5937.
- Evans, W. C. und Gaunt, J. K. **1971**. Metabolism of 4-chloro-2-methylphenoxyacetate by a soil pseudomonad. Preliminary evidence for the metabolic pathway. *Biochemical Journal*, 122, 519-526.
- Faelen, M. und Toussaint, A. **1980**. Chromosomal rearrangements induced by temperate bacteriophage D108. *Journal of Bacteriology*, 143, 1029-1030.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. **1983**. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 132, 6-13.
- Fennewald, M. A.; Gerrard, S. P.; Chou, J.; Casadaban, M. J. und Cozzarelli, N. R. **1981**. Purification of the Tn3 transposase and analysis of its binding to DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 4687-4690.
- Fong, P. Y.; Goh, C.; Tan, G. und Tan, H. M. **1997**. Identification and genetic analysis of Tn5542, a transposable element carrying the *bedD* and *bedC1C2BA* genes in *Pseudomonas putida* ML2. Aus: *Abstracts of the sixth international congress on Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, Madrid, Spanien, 53.
- Fukumori, F. und Saint, C. P. **1997**. Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1). *Journal of Bacteriology*, 179, 399-408.
- Galas, D. J. und Chandler, M. **1989**. Bacterial insertion sequences. In: *Mobile DNA*. Berg, D. E. und Howe, M. M. (Hersg.) Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 109-162.
- Gallegos, M.-T.; Michán, C. und Ramos, J. L. **1993**. The XylS/AraC family of regulators. *Nucleic Acids Research*, 21, 807-810.

Gallegos, M.-T.; Marqués, S. und Ramos, J. L. **1996**. Expression of the TOL plasmid *xylS* gene in *Pseudomonas putida* occurs from a σ^{70} -dependent promoter or from σ^{70} - and σ^{54} -dependent tandem promoter according to the compound used for growth. *Journal of Bacteriology*, 178, 2356-2361.

Gallegos, M.-T.; Williams, P. A. und Ramos, J. L. **1997**. Transcriptional control of the multiple catabolic pathways encoded on the TOL Plasmid pWW53 of *Pseudomonas putida* MT53. *Journal of Bacteriology*, 179, 5024-5029.

Gallegos, M.-T.; Schleif, R.; Bairoch, A.; Hoffmann, K. und Ramos, J. L. **1997**. AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 393-410.

Geary, P. J.; Saboowalla, F.; Patil, D. und Cammack, R. **1984**. An investigation of the iron-sulphur proteins of benzene dioxygenase from *Pseudomonas putida* by electron-spin-resonance spectroscopy. *Biochemical Journal*, 217, 667-673.

Gibson, D. T. **1984**. Microbial degradation of organic compounds. *Marcel Dekker, Inc.* New York und Basel.

Gill, R.; Heffron, F.; Dougan, G. und Falkow, S. **1978**. Analysis of sequences transposed by complementation of two classes of transposition-deficient mutants of Tn3. *Journal of Bacteriology*, 136, 742-756.

Gill, G. S.; Hull, R. C. und Curtiss, R. 3rd. **1981**. Mutator bacteriophage D108 and its DNA; an electron microscopic characterisation. *Journal of Virology*, 37, 420-430.

Göbel, M.; Kassel-Cati, K.; Schmidt, E. und Reinike, W. **2002**. Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13, characterization, and analysis of sequences encoding 3-oxoadipate-succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase. *Journal of Bacteriology*, 184 (1), 216-223.

Göbel, M. **2003**. Mikrobieller Abbau von Chloraromaten: Gene des *ortho*- und *meta*-Weges. *Inaugural Dissertation*, Wuppertal.

- Göbel, M.; Kranz, O. H.; Kaschabek, S. R.; Schmidt, E.; Pieper, D. H. und Reineke W. **2004**. Microorganisms degrading chlorobenzene via a *meta*-cleavage pathway harbor highly similar chlorocatechol 2,3-dioxygenase-encoding gene clusters. *Archives of Microbiology*, 182, 147-156.
- Götz, A; Pukall, R.; Smit, E.; Tietze, E.; Prager, R.; Tschäpe, H.; Van Elsas, J. D. und Smalla, K. **1996**. Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2621-2628.
- Gordon, G. S. und Wright, A. **2000**. DNA Segregation in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 681-708.
- Grant, S. G. N.; Jessee, J.; Bloom, F. R. und Hanahan, D. **1990**. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87, 4645-4649.
- Greated, A.; Lambertsen, L.; Williams, P. A. und Thomas, C. M. **2002**. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 4, 856-887.
- Grimm, A. C. und Harwood, C. S. **1999**. NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *Journal of Bacteriology*, 181, 3310-3316.
- Grindley, N. D. und Reed, R. R. **1985**. Transpositional recombination in prokaryotes. *Annual Reviews of Microbiology*, 54, 863-896.
- Hacker, J. und Carniel, E. **2001**. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. *Journal of the European Molecular Biology Organization, Reports* 2, 376-381.
- Haigler, B. E. und Spain, J. C. **1989**. Degradation of *p*-chlorotoluene by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain JS6. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 372-379.

Hall, R. M.; Brookes, D. E. und Stokes, H. W. **1991**. Site specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination crossover point. *Molecular Microbiology*, 5, 1941-1959.

Hall, R. M.; Brown, H. J.; Brookes, D. E. und Stokes, H. W. **1994**. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *Journal of Bacteriology*, 176, 6286-6294.

Hanahan, D. **1983**. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580.

Harwood, C. S. und Parales, R. E. **1996**. The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Annual Reviews of Microbiology*, 50, 553-90.

Harayama, S. und 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. *Molecular and General Genetics*, 239 (1-2), 81-89.

Harayama, S. M.; Rekik, M.; Ngai, K.-L. und Ornston, L. N. **1989**. Physically associated enzymes produce and metabolize 2-hydroxy-2,4-dienoate, a chemically unstable intermediate formed in catechol metabolism via *meta* cleavage in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 171, 6251-6258.

Higgins, D. G.; Bleasby, A. J. und Fuchs, R. **1991**. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Computational Applied Bioscience*, 8, 189-191.

Higson, F. K. und Focht, D. D. **1992**. Degradation of 2-methylbenzoic acid by *Pseudomonas cepacia* MB2. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 194-200.

Hollender, J.; Dott, W. und Hopp, J. **1994**. Regulation of chloro- and methylphenol degradation in *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2330-2338.

Holmes, A. J.; Gillings, M. R.; Nield, B. S.; Mabbutt, B. C.; Nevalainen, K. M. H. und Stokes, H. W. **2003**. The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environmental Microbiology*, 5, 383-394.

Horak, R. und Kivisaar, M. **1998**. Expression of the transposase gene *tnpA* of Tn4652 is positively affected by integration host factor. *Journal of Bacteriology*, 180, 2822-2829.

Horn, J M.; Harayama, S. und Timmis, K. N. **1991**. DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWWO) *xylGFJ* genes of *Pseudomonas putida*: implication for the evolution of aromatic catabolism. *Journal of Molecular Microbiology*, 5, 2459-2474.

Hull, R. A.; Gill, G. S. und Curtiss, R. 3rd. **1978**. Genetic characterization of Mu-like bacteriophage D108. *Journal of Virology*, 27, 513-518.

Inouye, S.; Nakazawa, A. und Nakazawa, T. **1985**. Determination of the transcription initiation site and identification of the protein product of the regulatory gene *xylR* for *xyl* operons on the TOL plasmid. *Journal of Bacteriology*, 163, 863-869.

Irie, H.; Kagawa, Y.; Imabayashi, Y.; Nishi, A.; Hamada, T.; Goto, M. und Furukawa, K. **2003**. The conjugative *bph-sal* element is widely distributed among various biphenyl-utilizing bacteria. *Unveröffentlicht*.

Ischikawa, H. und Ohtsubo, E. **1990**. *In vitro* transposition of transposon Tn3. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 18829-18832.

Johnson, G. R.; Jain, R. K und Spain, J. C. **2002**. Origins of the 2,4-dinitrotoluene pathway. *Journal of Bacteriology*, 184, 4219-4232.

Kahn, K. und Schaefer, M. R. **1995**. Characterization of transposon Tn5469 from the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *Journal of Bacteriology*, 177, 7026-7032.

Kallastu, A.; Horak, R. und Kivisaar, M. **1998**. Identification and characterization of IS1411, a new insertion sequence which causes transcriptional activation of the phenol degradation genes in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 180, 5306-5312.

Kasberg, T.; Daubaras, D. L.; Chakrabarty, A. M.; Kinzelt, D. und Reineke, W. **1995**. Evidence that operons *tcb*, *tfd*, and *clc* encode maleylacetate reductase, the fourth enzyme of the modified *ortho* pathway. *Journal of Bacteriology*, 177, 3885-3889.

Kaschabek, S. R.; Kasberg, T.; Müller, D.; Mars, A. E.; Janssen, D. B. und Reineke, W. **1998**. Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. *Journal of Bacteriology*, 180, 296-302.

Kaschabek, S. R. und Reineke, W. **1992**. Maleylacetate reductase of *Pseudomonas* sp. strain B13: dechlorination of chloromaleylacetates, metabolites in the degradation of chloroaromatic compounds. *Archives of Microbiology*, 158, 412-417.

Kaschabek, S. R. und W. Reineke. **1995**. Maleylacetate reductase of *Pseudomonas* sp. strain B13: specificity of substrate conversion and halide elimination. *Journal of Bacteriology*, 177, 320-325.

Keil, H.; Lebens, M. R. und Williams, P. A. **1985**. TOL plasmid pWW15 contains two nonhomologous, independently regulated catechol 2,3-oxygenase genes. *Journal of Bacteriology*, 163, 248-255.

Kimbara, K.; Hashimoto, T.; Fukuda, M.; Koana, T.; Takagi, M.; Oishi, M. und Yano, K. **1989**. Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *Journal of Bacteriology*, 171, 2740-2747.

Kitagawa, W.; Suzuki, A.; Hoaki, T.; Masai, E. und Fukuda, M. **2001a**. Multiplicity of aromatic ring hydroxylation dioxygenase genes in a strong PCB degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 demonstrated by denaturing gel electrophoresis. *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65, 1907-1911.

Kitagawa, W.; Miyauchi, K.; Masal, E. und Fukuda, M. **2001b**. Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *Journal of Bacteriology*, 183, 6598-6606.

Klecka, G. M. und Gibson, D. T. **1981**. Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 1159-1165.

Kleckner, N.; Chan, R. K.; Tye, B. K. und Botstein, D. **1975**. Mutagenesis by insertion of a drug-resistance element carrying an inverted repetition. *Journal of Molecular Biology*, 97, 561-575.

Knackmuss, H.-J. **1981**. Degradation of halogenated and sulfonated hydrocarbons. In: Leisinger, T. A. M. Cook, R. Hütter, J. Nüetsch (Herg.). Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. *Academic Press, London*, 189-212.

Knackmuss, H.-J.; Hellwig, M.; Lackner, H. und Otting, W. **1976**. 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. *European Journal of Applied Microbiology*, 2, 267-276.

Kovalevskaya, N. P. **2002**. Mobile gene cassettes and integrons. *Molecular Biology*, 36, 196-201.

Kranz, O. **2001**. Vergleich zwischen den Stämmen *Pseudomonas putida* GJ31* und *Pseudomonas veronii* 16-6A sowie deren Catechol-2,3-Dioxygenasen. *Diplomarbeit*, Wuppertal.

Kunz, D. A. und Chapman, P. J. **1981**. Isolation and characterization of spontaneously occurring TOL plasmid mutants of *Pseudomonas putida* HS1. *Journal of Bacteriology*, 146, 952-964.

Kunze, M. **2002**. Abbau von Chlorbenzol in *Pseudomonas putida* GJ31: das Plasmid pKW1. *Inaugural Dissertation*, Wuppertal.

LaFemina, R. L.; Schneider, C. L.; Robbins, H. L.; Callahan, P. L.; LeGrow, K.; Roth, E.; Schleif, W. A. und Emini, E. A. **1992**. Requirement of active human immunodeficiency virus type 1 integrase enzyme for productive infection of human T-lymphoid cells. *Journal of Virology*, 66, 7414-7419.

Lauf, U.; Müller, C. und Hermann, H. **1998**. The transposable elements resident on the plasmids of *Pseudomonas putida* strain H, Tn5501 and Tn5502, are cryptic transposons of the Tn3 family. *Molecular and General Genetic*, 259, 674-678.

Laurie, A. D. und Lloyd-Jones, G. **1999**. Conserved and hybrid *meta*-cleavage operons from PAH-degrading *Burkholderia* RP007. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262, 308-314.

Li, W.; Shi, J.; Wang, X.; Han, Y.; Tong, W.; Ma, L.; Liu, B. und Cai, B. **2004**. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Gene*, 336 (2), 231-240.

Mäe, A. A.; Marits, R. O.; Ausmess, N. R.; Koiv, V. M. und Heinaru, A. L. **1993**. Characterization of a new 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading plasmid pEST4011: physical map and localization of catabolic genes. *Journal of General Microbiology*, 139, 3165–3170.

Maeda, K.; Nojiri, H.; Shintani, M.; Yoshida T.; Habe, H. und Omori, T. **2003**. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *Journal of Molecular Biology*, 326, 21-33.

Mandt, C. **2004**. Metabolite des *meta*-Weges: Synthese und biologische Eigenschaften von Chlorcatecholen. *Diplomarbeit* BU Wuppertal.

Mars, A. E.; Kasberg, T.; Kaschabek, S. R.; van Agteren, M. H.; Janssen, D. B. und Reineke, W. **1997**. Microbial degradation of chloroaromatics: Use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *Journal of Bacteriology*, 179, 4530-4537.

Mars, A. E.; Kingma, J.; Kaschabek, S. R.; Reineke, W. und D. B. Janssen. **1999**. Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31. *Journal of Bacteriology*, 181, 1309-1318.

Martinez, E und de la Cruz, F. **1990**. Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for dissemination of antibiotic resistance genes. *The EMBO Journal*, 9, 1275-1281.

Martinez, B.; Tomkins, J. Wackett, L. P.; Wing, R. und Sadowsky, M. J. **2001**. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology*, 183, 5684-5697.

McGowan, C.; Fulthorpe, R. R.; Wright, A. und Tiedje, J. M. **1998**. Evidence for interspecies gene transfer in the evolution of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degraders. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4089-4092.

Miller, S. H. **1972**. Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*.

Mindlin, S.; Petrova, M.; Kholodii, G.; Minakhina, S.; Gorlenko, Z. und Nikiforov, V. **1998**. Present-day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds since the upper pleistocene. *Unveröffentlicht*.

Mise, K. **1971**. Isolation and characterization of a new generalized transducing bacteriophage different from P1 in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 7, 168-75.

Müller, D.; Schlömann, M. und Reineke, W. **1996**. Maleylacetate reductases in chloroaromatic-degrading bacteria using the modified *ortho* pathway: comparison of catalytic properties. *Journal of Bacteriology*, 178, 298-300.

Murata, T.; Ohnishi, M.; Ara, T.; Kaneko, J.; Han, C.-G.; Li, Y. F.; Takashima, K.; Nojima, H.; Nakayama, K.; Kaji, A.; Kamio, Y.; Miki, T.; Mori, H.; Ohtsubo, E.; Terawaki, Y. und Hayashi, T. **2002**. Complete nucleotide sequence of plasmid Rts1: implications for evolution of large plasmid genomes. *Journal of Bacteriology*, 184, 3194-3202.

Murray, K.; Duggleby, C. J.; Sala-Trepat, J. M. und P. A. Williams. **1972**. The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the *meta*-cleavage pathway by *Pseudomonas arvilla* mt-2. *European Journal of Biochemistry*, 28, 301-310.

Nakatsu, C.; Ng, J.; Singh, R.; Straug, N. und Wyndham, C. **1991**. Chlorobenzoate catabolic transposon Tn5271 is a composite class I element with flanking class II insertion sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 8312-8316.

Nelson, K.; Paulsen, I.; Weinel, C.; Dodson, R.; Hilbert, H.; Fouts, D.; Gill, S.; Pop, M.; Martins Dos Santos, V.; Holmes, M.; Brinkac, L.; Beanan, M.; DeBoy, R.; Daugherty, S.; Kolonay, J.; Madupu, R.; Nelson, W.; White, O.; Peterson, J.; Khouri, H.; Hance, I.; Lee, P.; Holtzapple, E.; Scanlan, D.; Tran, K.; Moazzez, A.; Utterback, T.; Rizzo, M.; Lee, K.; Kosack, D.; Moestl, D.; Wedler, H.; Lauber, J.; Hoheisel, J.; Straetz, M.; Heim, S.; Kiewitz, C.; Eisen, J.; Timmis, K.; Duesterhoft, A.; Tumbler, B. und Fraser, C. **2002**. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4, 799-808.

Nield, B. S.; Holmes, A. J.; Gillings, M. R.; Recchia, G. D.; Mabutt, B. C.; Nevalainen, K. M. H. und Stokes, H. W. **2001**. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 195, 59-65.

Nishi, A.; Tominaga, K. und Furukuwa, K. **1998**. Horizontal transfer of the chromosomal gene clusters coding for biphenyl and salicylate metabolism in *Pseudomonas putida* KF715. Aus: *Abstracts of the first international conference of the federation of Asia-Pacific Microbiology Society*, Singapore.

Nozaki, M. **1970**. Metapyrocatechase (*Pseudomonas*). *Methods in Enzymology*, 17A, 522-525.

Ogawa, N. und Miyashita, K. **1995**. Recombination of a 3-chlorobenzoate catabolic plasmid from *Alcaligenes eutrophus* NH9 mediated by direct repeat elements. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3788-3795.

Ogawa, N. und Miyashita, K. **1999**. The chlorocatechol-catabolic transposon Tn5707 of *Alcaligenes eutrophus* NH9, carrying a gene cluster highly homologous to that in the 1,2,4-trichlorobenzene-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. strain P51, confers the ability to grow on 3-chlorobenzoate. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 724-731.

Ohler, U.; Harbeck, S.; Niemann, H.; Noth, E. und Reese, M. G. 1999. Interpolated markov chains for eukaryotic promoter recognition. *Bioinformatics*, 15, 362-369.

Ohtsubo, F. und Sekine, Y. **1996**. Bacterial insertion sequences. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 204, 1-26.

Oldenhuis, R.; Kuijk, L.; Lammers, A.; Janssen, D. B. und Witholt, B. **1989**. Degradation of chlorinated and nonchlorinated aromatic solvents in soil suspensions by pure bacterial cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 211-217.

Oubrie A.; Rozeboom, H. J.; Kalk, K. H.; Duine, J. A. und Dijkstra, B. W. **1999**. The 1.7 Å crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* reveals a novel internal conserved sequence repeat. *Journal of Molecular Biology*, 289, 319-33. Erratum in: *Journal of Molecular Biology*, 292, 191.

Park, D.-W.; Kim, Y.; Lee, S.-M.; Ka, J.-O. und Kim, C.-K. **2000**. Cloning and sequence analysis of the *xylL* gene responsible for 4CBA-dihydrodiol dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. S-47. *Journal of Microbiology*, 38, 275-280.

Pearson, W. R. und Lipman, D. J. **1988**. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85, 2444-2448.

Perna, N. T.; Plunkett, G. 3rd; Burland, V.; Mau, B.; Glasner, J. D.; Rose, D. J.; Mayhew, G. F.; Evans, P. S.; Gregor, J.; Kirkpatrick, H. A.; Posfai, G.; Hackett, J.; Klink, S.; Boutin, A.; Shao, Y.; Miller, L.; Grotbeck, E.J.; Davis, N. W.; Lim, A.; Dimalanta, E. T.; Potamosis, K. D.; Apodaca, J.; Anantharaman, T. S.; Lin, J.; Yen, G.; Schwartz, D. C.; Welch, R. A. und Blattner, F. R. **2001**. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 409, 529-533.

Pettigrew, C.A.; Haigler, B. E. und Spain, J. C. **1991**. Simultaneous biodegradation of chlorobenzene and toluene by a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 157-162.

Pfennig, N. und Lippert, K. D. **1966**. Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Archive für Mikrobiologie*, 57, 157-162.

Poh, R. P.-C.; Smith, A. R. W. und Bruce, I. J. **2002**. Complete characterization of Tn5530 from *Burkholderia cepacia* strain 2a(pIJB1) and studies of 2,4-dichlorophenoxyacetate uptake by the organism. *Plasmid*, 48, 1–12.

Pohlman, R. F.; Genetti, H. D. und Winans, S. C. **1994**. Entry exclusion of the IncN plasmid pKM101 is mediated by a single hydrophilic protein containing a lipid attachment motif. *Plasmid*, 31, 158-165.

Rådström, P.; Sköld, O.; Swedberg, G.; Flensburg, J.; Roy, P. H. und Sundström, L. **1994**. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu and the retroelements. *Journal of Bacteriology*, 176, 3257-3268.

Ramos, J. L.; Rojo, F.; Zhou, L. und Timmis, K. N. **1990**. A family of positive regulators related to the *Pseudomonas putida* TOL plasmid XylS and the *Escherichia coli* AraC activators. *Nucleic Acids Research*, 18, 2149-2152.

Ramos, J. L.; Marqués, S. und Timmis, K. N. **1997**. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annual Reviews of Microbiology*, 51, 341-373.

Ravatn, R.; Zehnder, A. J. B. und van der Meer, J. R. **1998a**. Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosm. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2126-2132.

Ravatn, R.; Studer, S.; Springael, D.; Zehnder, A. J. B. und van der Meer, J. R. **1998b**. Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. strain B13. *Journal of Bacteriology*, 180, 4360-4369.

Reams, A. B. und Neidle, E. L. **2004**. Selection for gene clustering by tandem duplication. *Annual Reviews of Microbiology*, 58, 119-142.

Reineke, W. **1998**. Development of hybrid strains for the mineralisation of chloroaromatics by patchwork assembly. *Annual Reviews of Microbiology*, 52, 287-331.

Reineke, W. **2000**. Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms. In: *The Handbook of Environmental Chemistry* (Hrsg.: O. Hutzinger): The Natural Environment and Biogeochemical Cycles (B. Beek). Springer Verlag, Berlin, Vol. 2 K, 1-161.

Reineke, W. und Knackmuss, H.-J. **1984**. Microbial metabolism of haloaromatics: Isolation and properties of a chlorobenzene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 395-402.

Reiner, A. M. **1972**. Metabolism of aromatic compounds in bacteria: Purification and properties of the catechol-forming enzyme, 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-2-carboxylic acid (NAD⁺) oxidoreductase (decarboxylating). *Journal of Biological Chemistry*, 247, 4960-4965.

Rheinwald, J. G.; Chakrabarty, A. M. und Gunsalus, I. C. **1973**. A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70, 885.

Rojo, F.; Pieper, D. H.; Engesser, K.-H.; Knackmuss, H.-J. und Timmis, K. N. **1987**. Assemblage of *ortho* cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science*, 238, 1395-1398.

Romine, M. F.; Stillwell, L. C.; Wong, K.-K.; Thurston, S. J.; Sisk, E. C.; Sensen, C.; Gaasterland, T.; Fredrickson, J. K. und Saffer, J. D. **1999**. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *Journal of Bacteriology*, 181 (5), 1585-1602.

Rossello, R.; García-Valdés, E.; Lalucat, J. und Ursing, J. **1991**. Genotypic and phenotypic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *Systematic and Applied Microbiology*, 14, 150-157.

Sala-Trepat, J. M., W. C. Evans. **1971**. The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species (4-oxalocrotonate pathway). *European Journal of Biochemistry*, 20, 400-413.

Schmidt, E. und Knackmuss, H.-J. **1980**. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid. *Biochemical Journal*, 192, 339-347.

Schneider, A. und Marahiel, M. A. **1998**. Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology*, 169, 404-410.

Schlüter, A.; Heuer, H.; Szczepanowski, R.; Forney, L. J.; Thomas, C. M.; Pühler, A. und Top, E. M. **2003**. The 64508 bp IncP-1 β antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 β group. *Microbiology*, 149, 3139-3153.

Schwien, U.; Schmidt, E.; Knackmuss, H.-J. und Reineke W. **1988**. Degradation of chlorosubstituted aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. strain B13 - fate of 3,5-dichlorocatechol. *Archives of Microbiology*, 150, 78-84.

Sentchilo, V. S.; Perebituk, A. N.; Zehnder, A. J. B. und van der Meer, J. R. **2000**. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strains isolated from different contaminated sites in Belarus. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2842-2852.

Sentchilo, V. S.; Ravatn, R.; Werlen, C.; Zehnder, A. J. B. und van der Meer, J. R. **2003**. Unusual integrase gene expression on the *clc* genomic island in *Pseudomonas* sp. strain B13. *Journal of Bacteriology*, 185, 4530-4538.

da Silva, A. C. R.; Ferro, J. A.; Reinach, F. C.; Farah, C. S.; Furlan, L. R.; Quaggio, R. B.; Monteiro-Vitorello, C. B.; Van Sluys, M. A.; Almeida Jr., N. F.; Alves, L. M. C.; do Amaral, A. M.; Bertolini, M. C.; Camargo, L. E. A.; Camarotte, G.; Cannavan, F.; Cardozo, J.; Chambergo, F.; Ciapina, L. P.; Cicarelli, R. M. B.; Coutinho, L. L.; Cursino-Santos, J. R.; El-Dorry, H.; Faria, J. B.; Ferreira, A. J. S.; Ferreira, R. C. C.; Ferro, M. I. T.; Formighieri, E. F.; Franco, M. C.; Greggio, C. C.; Gruber, A.; Katsuyama, A. M.; Kishi, L. T.; Leite Jr., R. P.; Lemos, E. G. M.; Lemos, M. V. F.; Locali, E. C.; Machado, M. A.; Madeira, A. M. B. N.; Martinez-Rossi, N. M.; Martins, E. C.; Meidanis, J.; Menck, C. F. M.; Miyaki, C. Y.; Moon, D. H.; Moreira, L. M.; Novo, M. T. M.; Okura, V. K.; Oliveira, M. C.; Oliveira, V. R.; Pereira Jr., H. A.; Rossi, A.; Sena, J. A. D.; Silva, C.; de Souza, R. F.; Spinola, L. A. F.; Takita, M. A.; Tamura, R. E.; Teixeira, E. C.; Tezza, R. I. D.; Trindade dos Santos, M.; Truffi, D.; Tsai, S. M.; White, F. F.; Setubal, J. C. und Kitajima, J. P. **2002**. Comparism of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with different host specificities. *Nature*, 417, 459-463.

Shapiro, J. A. **1983**. Mobile Genetic Elements. *Academic Press*, New York.

She, Q.; Singh, R. K.; Confalonieri, F.; Zivanovic, Y.; Allard, G.; Awayez, M. J.; Chan-Weiher, C. C.; Clausen, I. G.; Curtis, B. A.; De Moors, A.; Erauso, G.; Fletcher, C.; Gordon, P. M.; Heikamp-de Jong, I.; Jeffries, A. C.; Kozera, C. J.; Medina, N.; Peng, X.; Thi-Ngoc, H. P.; Redder, P.; Schenk, M. E.; Theriault, C.; Tolstrup, N.; Charlebois, R. L.; Doolittle, W. F.; Duguet, M.; Gaasterland, T.; Garrett, R. A.; Ragan, M. A.; Sensen, C. W. und Van der Oost, J. **2001**. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 7835-7840.

Shingler, V.; Powlowski, J. und Marklund, U. **1992**. Nucleotid sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *Journal of Bacteriology*, 174, 711-724.

- Simon, M. J.; Osslund, T. D.; Saunders, R.; Ensley, B. D.; Suggs, S.; Harcourt, A.; Suen, W. C.; Cruden, D. L.; Gibson, D. T. und Zylstra, G. J. **1993**. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, 127, 31-37.
- Smejkal, C. W.; Vallaeys, T., Seymour, F. A.; Burton, S. K. und Lappin-Scott, H. M. **2001**. Characterization of (R/S)-mecoprop (2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid)-degrading *Alcaligenes* sp. CS1 and *Ralstonia* sp. CS2 isolated from agricultural soils. *Environmental Microbiology*, 3, 288-293.
- Sota, M.; Kawasaki, H. und Tsuda, M. **2003**. Structure of haloacetate-catabolic IncP-1 β plasmid pUO1 and genetic mobility of its haloacetate-catabolic transposon. *Journal of Bacteriology*, 185, 6741-6745.
- Southern, E. M. **1975**. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98, 503-517.
- Springael, D.; Kreps, S. und Mergeay, M. **1993**. Identification of a catabolic transposon, Tn4371, carrying biphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5. *Journal of Bacteriology*, 175, 1674-1681.
- Stallwood, B.; Hughes, K. A.; Williams, P. A. und Shears, J. **2004**. Cloning and characterization of the *meta*-pathway from the Antarctic, psychrotolerant bacterium, *Pseudomonas* sp. ST41. *Unveröffentlicht*.
- Stokes, H. W. und Hall, R. M. **1989**. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 26, 1669-1683.
- Stokes, H. W.; O’Gorman, D. B.; Recchia, G. D.; Parsekhian, M. und Hall, R. M. **1997**. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Molecular Microbiology*, 26, 731-745.

Stokes, H. W.; Holmes, A. J.; Nield, B. S.; Holley, M. P.; Nevalainen, K. M. H.; Mabbutt, B. C. und Gillings, M. R. **2001**. Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5240-5246.

Stover, C. K.; Pham, X.-Q. T.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warrenner, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S. L.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R. M.; Smith, K. A.; Spencer, D. H.; Wong, G. K.-S.; Wu, Z. und Paulsen, I. T. **2000**. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406, 956-964.

Studier, F. W. und Moffatt, B. A. **1986**. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189, 113-130.

Sundström, L.; Roy, P. H. und Sköld, O. **1991**. Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. *Journal of Bacteriology*, 173, 3025-3128.

Taylor, A. L. **1963**. Bacteriophage-induced mutation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 50, 1043-1051.

Taylor, A. B.; Czerwinski, R. M.; Johnson W. H.; Whitman, C. P. und Hackert, M. L. **1998**. Crystal structure of 4-oxalocrotonate tautomerase inactivated by 2-oxo-3-pentynoate at 2.4 Å resolution: analysis and implications for the mechanism of inactivation and catalysis. *Biochemistry*, 37, 14692-14700.

Tietze, E.; Brevet, J. und Tschäpe, H. **1987**. Relationships among the streptothricin resistance transposon Tn7. *Plasmid*, 18, 246-249.

Top, E. M.; Springael, D. und Boon, N. **2002**. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and water. *FEMS Microbiology Ecology*. 42, 199-208.

Top, E. M. und Springael, D. **2003**. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 262-269.

Totevova, S.; Armengaud, J.; Cajithaml, T.; Demnerova, K.; Brenner, V. und Pieper, D. H. **2001**. Cloning, isolation and expression of benzoate 1,2-dioxygenase originated from the strain *Pseudomonas putida* P111. *Unveröffentlicht*.

Trefault, N.; De la Iglesia, R.; Molina, A. M.; Manzano, M.; Ledger, T.; Pérez-Pantoja, D.; Sánchez, M. A.; Stuardo, M. und González, B. **2004**. Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaption to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environmental Microbiology*, 6, 655-668.

Tsuda, M.; Minegishi, K. und Iino, T. **1989**. Toluene transposons Tn4651 and Tn4653 are class II transposons. *Journal of Bacteriology*, 171, 1386-1393.

Tsuda, M. und Iino, T. **1987**. Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on a TOL-plasmid pWWO. *Molecular and General Genetic*, 210, 270-276.

Tsuda, M. und Iino, T. **1988**. Identification and characterization of Tn4653, a transposon converting the toluene transposon Tn4651 on TOL-plasmid pWWO. *Molecular and General Genetic*, 213, 72-77.

Tsuda, M. und Iino, T. **1990**. Naphtalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon. *Molecular and General Genetic*, 223, 33-39.

Vallaey, T.; Courde, L.; McGowan, C., Wright, A. D. und Fulthorpe, R. R. **1999**. Phylogenetic analyses indicate independent recruitment of diverse gene cassettes during assemblage of the 2,4-D catabolic pathway. *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 373-382.

van der Meer, J. R.; Neerven, A. R. W.; de Vries, E. J.; de Vos, W. M. und Zehnder, A. J. B. **1991a**. 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. *Journal of Bacteriology*, 173, 6-15.

van der Meer, J. R.; Zehnder, A. J. und De Vos, W. M. **1991b**. Identification of a novel composite transposable element, Tn5280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas* sp. strain P51. *Journal of Bacteriology*, 173, 7077-7083.

van der Meer, J. R.; Werlen, C.; Nishino, S. F. und Spain, J. C. **1998**. Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4185-4193.

van der Meer, J. R.; Ravatn, R. und Sentchilo, V. **2001**. The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Archives of Microbiology*, 175, 79-85.

van der Meer, J. R. **2003**. Genomic islands and horizontal gene transfer among bacteria. *Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz news*, 56, 6-8.

van der Ploeg, J.; Willemsen, M.; Van Hall, G. und Janssen, D. B. **1995**. Adaption of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 to bromoacetate due to activation and mobilization of the haloacetate dehalogenase gene by insertion element IS1247. *Journal of Bacteriology*, 177, 1348-1356.

Volff, J. N.; Eichenseer, C.; Viell, P.; Piendl, W. und Altenbuchner, J. **1996**. Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. *Molecular Microbiology*, 21, 1037-1047.

Vollmer, M. D. und Schlömann, M. **1995**. Conversion of 2-chloro-*cis,cis*-muconate and its metabolites 2-chloro- and 5-chloromuconolactone by chloromuconate cycloisomerases of pJP4 and pAC27. *Journal of Bacteriology*, 177, 2938-2941.

Werlen, C.; Kohler, H.-P. E. und van der Meer, J. R. **1996**. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and *cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 4009-4016.

Wessler, H. G.; Hares, D. R.; Poulter, M. D.; Voss, J. A.; Khedairy, H. S.; Baker, R. F.; Azadpour, E. E.; Luo, X. und Benjamin, R. C. **1999**. Sequence of the lower (*meta*-cleavage) *xyl* operon of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid pDK1. *Unveröffentlicht*.

Wheatcroft, R. und Williams, P. A. **1981**. Rapid methods for the study of both stable and unstable plasmids in *Pseudomonas*. *Journal of General Microbiology*, 124, 433-437.

Whitman, C. P.; Chen, L. H.; Kenyon, G. L.; Curtin, F.; Harayama, S.; Bembenek, M. E. und Hajipour, G. **1992**. 4-Oxalocrotonate tautomerase, an enzyme composed of 62 amino acid residues per monomer. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 17716-17721.

Whyte, L. G.; Smits, T. H. M.; Labbe, D.; Witholt, B.; Greer, C. W. und van Beilen, J. B. **2002**. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5933-5942.

Williams, P. A.; Assinder, S. J.; Marco, P.; O'Donnell, K. J.; Poh, C. L.; Shaw, L. E. und Winson, M. K. **1992**. Catabolic gene duplications in TOL plasmids. Aus: E. Galli, S. Silver und B. Witholt (Editor). *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Williams, P. A. und Murray, K. **1974**. Metabolism of benzoate and methylbenzoate by *Pseudomonas arvilla* mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *Journal of Bacteriology*, 120, 416-423.

Worsey, M. J.; Franklin, F. C. H. und Williams, P.A. **1978**. Regulation of the degradative pathway enzymes coded for by the TOL plasmid (pWW0) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Journal of Bacteriology*, 134, 757-764.

Worsey, M. J. und Williams, P. A. **1977**. Characterization of a spontaneously occurring mutant of the TOL20 plasmid in *Pseudomonas putida* MT20: possible regulatory implications. *Journal of Bacteriology*, 130, 1149-1158.

Xia, Z.; Dai, W.; Zhang, Y.; White, S. A.; Boyd, G. D. und Mathews, F. S. **1996**. Determination of the gene sequence and the three-dimensional structure at 2.4 Angstroms resolution of methanol dehydrogenase from *Methylophilus* W3A1. *Journal of Molecular Biology*, 259, 480-501.

Yang, W. und Steitz, T. A. **1995**. Crystal structure of the site-specific recombinase gamma delta resolvase complex with a 34 bp cleavage site. *Cell*, 82, 193-207.

Yen, K. M. und Gunsalus, I. C. **1982**. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 79, 874-878.

Yurieva, O. und Nikiforov, V. **1996**. Catalytic center quest: comparison of transposases belonging to the Tn3 family reveals an invariant triad of acidic amino residues. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 38, 15-20.

Xu, Y.; Chen, M.; Zhang, W. und Lin, M. **2003**, Genetic organization of genes encoding phenol hydroxylase, benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit and its regulatory proteins in *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2. *Current Microbiology*, 43, 235-240.

Zerlin, K. F. T. **2002**. Abbau von 3-Chlorbenzoat über den *meta*-Weg: Vergleich der Stämme *Pseudomonas putida* GJ31* und *Pseudomonas putida* WR301. *Diplomarbeit* BU Wuppertal.

Zylstra, G.J. und Dennis, J. J. **2002**. Complete nucleotide sequence of the NAH plasmid pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *Unveröffentlicht*.