

Charakterisierung von Plasmiden aus
einer Gemeinschaft von Bodenbakterien mit dem
Schwerpunkt auf dem genetischen Potential
für konjugativen DNA-Transfer

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Anja Battermann

Dezember 2002

Inhaltsverzeichnis

A. Zusammenfassung	1
B. Einleitung	
B.1 Bakterielle Plasmide	3
B.1.1 Plasmidreplikation	3
B.1.2 Mechanismen zur Stabilisierung von Plasmiden	4
B.1.3 Wirtsbereiche der Plasmide	6
B.1.4 Inkompatibilitätsgruppen	7
B.1.5 Beispiele für die Genfracht von Plasmiden	7
B.1.6 Konjugative und mobilisierbare Plasmide	9
B.1.6.1 Konjugation	9
B.1.6.2 Mobilisierung	11
B.2 Der horizontale Gentransfer	12
B.3 Das Typ IV-Sekretionssystem	13
B.4 Untersuchungen zum Plasmidgehalt und zum Gentransferpotential mikrobieller Gemeinschaften	15
B.4.1 Umwelthabitat Boden	15
B.4.2 Methoden zur Untersuchung des Plasmidgehaltes und des konjugativen Potentials verschiedener Habitate	16
B.4.3 Beispiele bisher durchgeführter Studien zur Ermittlung des Plasmidgehaltes und des konjugativen Gentransferpotentials mikrobieller Gemeinschaften	18
B.5 Analyse von Plasmiden und Ermittlung des Gentransferpotentials in einer mikrobiellen Gemeinschaft von Bodenbakterien	20
B.6 Zielsetzung dieser Arbeit	22
C. Material und Methoden	
C.1 Material	24
C.1.1 Bakterienstämme	24
C.1.2 Plasmide	25
C.1.3 Nährmedien	28
C.1.4 Puffer und Lösungen	30
C.1.4.1 Puffer, allgemein	30
C.1.4.2 Lösungen für die Plasmidisolierung	30
C.1.4.3 Puffer für die Enzymreaktionen	32
C.1.4.3.1 Puffer für Restriktionsenzyme	32
C.1.4.3.2 PCR-Puffer	32
C.1.4.3.3 Puffer und Lösungen für die Nicktranslation	33
C.1.4.4 Lösungen und Puffer für die Southernhybridisierung	33
C.1.5 Bezugsquellen für Chemikalien und Verbrauchsmittel	34
C.1.6 Geräte	35
C.2 Methoden	35
C.2.1 Plasmidisolierungen	35
C.2.1.1 Plasmidisolierung nach Ramos-Gonzales	35
C.2.1.2 Triton-Lyse (für einkopiezahlige Plasmide)	35
C.2.1.2.1 Modifizierungen der Triton-Lyse	36
C.2.1.3 Plasmidisolierung nach Birnboim & Doly 1979	36
C.2.1.4 Plasmidisolierung mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit	37
C.2.1.5 Plasmidisolierung mit dem Qiaprep Miniprep Kit	37

C.2.2	Isolierung von Gesamt-DANN	38
C.2.2.1	Gesamt-DNA-Isolierung mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)	38
C.2.2.2	Isolierung von Gesamt-DNA nach Hopwood	38
C.2.3	Klonanalysen	38
C.2.3.1	Schnell-Lyse (Birnboim & Doly, 1979)	38
C.2.4	Alkoholfällung von DNA	39
C.2.5	Extraktion von Proteinen mit Phenol	39
C.2.6	Anhängen von einzelnen Adenosinen an das 3' Ende von PCR-Produkten	39
C.2.7	Reinigen von PCR-Ansätzen oder Entsalzen von Ligations- ansätzen mit dem Microcon PCR-Kit von Millipore	39
C.2.8	Agarosegelelektrophorese	39
C.2.8.1	Präparative DNA-Fragmentisolierung aus dem Agarosegel	40
C.2.8.1.1	Isolierung mit der DEAE-Membran	40
C.2.8.1.2	Isolierung mit dem Qiagen Kit MinElute	40
C.2.9	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen	41
C.2.10	<i>In vitro</i> Neukombination von DNA (Ligation)	41
C.2.10.1	Klonierung von PCR-Produkten mit dem pGEM Teasy	41
C.2.10.2	Klonierung von PCR-Produkten mit dem Qiagen PCR Cloning Kit	41
C.2.11	DNA-Amplifizierung mittels PCR	41
C.2.11.1	Amplifikation von Sequenzen konjugativer Plasmide mit Hilfe von <i>tra</i> -Primern	42
C.2.11.2	Amplifizierung der 16S-rDNA mit dem Primerpaar 27f und 1385r	43
C.2.11.3	Detektion von Quecksilberresistenzgenen mittels PCR	43
C.2.11.4	PCR zur Bestimmung von Plasmidinkompatibilitätsgruppen	44
C.2.12	Amplified Ribosomal DNA-Restriktion Analysis (ARDRA)	45
C.2.13	Transformation von <i>E. coli</i>	46
C.2.13.1	Herstellung kompetenter Zellen	46
C.2.13.2	Transformation	46
C.2.14	Antibiotikaresistenztest mit den Antibiotikatestplättchen	46
C.2.15	Konjugation und Mobilisierung	46
C.2.16	DNA-DNA-Hybridisierung	47
C.2.16.1	Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin	47
C.2.16.1.1	Nicktranslation	47
C.2.16.1.2	Random Primed DNA-Markierung mit dem DIG DNA Labeling und Detection Kit	47
C.2.16.2	Southernblot	47
C.2.16.2.1	Southernblot mit dem Vakuumblotter: VacuGene Pump	48
C.2.16.2.2	Hybridisierung	48
C.2.16.2.3	Nachweis	48
C.2.17	Sequenzierprimer	48
C.2.17.1	Standard-Sequenzierprimer	48
C.2.17.2	Primer speziell für das I-Ende des Transposons vom Plasmid pAG408	49
C.3	Computersoftware und Datenbanken	49
D	Ergebnisse	
D.1	Isolierung denitrifizierender Bakterien aus Bodenproben	51
D.1.1	Ermittlung des Plasmidgehaltes der Bodenisolate	52
D.1.2	Einordnung der Isolate durch ARDRA	54

D.2	Charakterisierung der Plasmide	57
D.2.1	Restriktionsanalysen ausgewählter Plasmide	57
D.2.2	Gleiche Plasmide - ein Hinweis auf im Boden erfolgten Gentransfer?	58
D.2.2.1	Ist pBI709 ein Deletionsderivat von pBI860 bzw. pBI860 ein Integrationsderivat von pBI709?	60
D.2.2.1.1	Hybridisierungsanalysen	60
D.2.2.1.2	Welche zusätzliche Genfracht tragen die Plasmide pBI860 und pBI1141?	62
D.2.3	Antibiotikaresistenzen und Schwermetallresistenzen	64
D.2.3.1	Antibiotikaresistenztest	64
D.2.3.2	Schwermetallresistenztest	65
D.2.4	Zuordnung der Plasmide zu bekannten Inkompatibilitätsgruppen	68
D.2.5	Bestimmung des Gentransferpotentials	70
D.2.5.1	Mobilisierung von pSunny durch Plasmide aus Bodenisolaten	70
D.2.5.2	Transposonmutagenese zur Markierung der Plasmide	75
D.2.5.3	Konjugation	76
D.2.5.4	Sequenzierung der Transposon-Integrationsstelle von pBI860.105	80
D.3	Sequenzierung von Plasmiden aus Bodenbakterien	84
D.3.1	Die Transferregionen von pBI709 und pBI1063	85
D.3.1.1	Die Transferregion von pBI709 besitzt die gleiche Organisation wie die von pWW0	85
D.3.1.2	Die Transferregion von pBI1063	87
D.3.2	Analyse der putativen Transferproteine von pBI709 und pBI1063	96
D.3.2.1	Der Bereich von pBI1063 zwischen der TraI und TraII Region enthält drei offene Leseraster mit signifikanten Homologien	110
D.3.3	Vermutliche <i>oriT</i> -Regionen der Plasmide pBI709 und pBI1063	111
D.3.4	Beispiele für die Genfracht der Plasmide pBI709 und pBI1063	112
D.3.4.1	Proteine von pBI1063	113
D.3.4.2	Resistenz-, Transpositions-, Replikations- und Partitioninggene von pBI709	115
D.3.4.2.1	Das Plasmid pBI709 trägt Quecksilberresistenzgene	115
D.3.4.2.2	Transpositionsgene	116
D.3.4.2.3	Die mögliche Replikationsregion von pBI709	116
D.3.4.2.4	Die "Partitioning"-Region von pBI709	117
D.3.5	Partielle Sequenzierung des Plasmides pKI173	119
D.3.6	Partielle Sequenzierung des Plasmides pKI239	122
D.3.7	Partielle Sequenzierung des Plasmides pBI113	122
D.3.8	Partielle Sequenzierung des Plasmides pKI202	122
D.3.9	Partielle Sequenzierung des Plasmides pOL1820	123
E	Diskussion	
E.1	Detektion von Plasmiden aus Bodenisolaten durch eine endogene Plasmidisolierung	130
E.2	Der Plasmidgehalt in einer Gemeinschaft von denitrifizierenden Bodenisolaten	131
E.2.1	Der Gesamtplasmidgehalt	131
E.2.2	Plasmidgehalt - ein Hinweis auf die Gentransferaktivität verschiedener Habitate?	133
E.2.3	Plasmidverteilung in den einzelnen Gattungen	133
E.2.4	Plasmidgrößen und Plasmidanzahl in den Isolaten	134
E.3	Die Plasmide aus Bodenisolaten tragen keine Antibiotikaresistenzgene und nur drei Plasmide besitzen Quecksilberresistenzgene	135
E.4	Bei den Plasmiden aus Bodenisolaten handelt es sich um Plasmide unbekannter Inc-Gruppen	136

E.5 Das Gentransferpotential von Plasmiden aus Bodenisolaten	137
E.5.1 Mobilisierung von pSunny durch Bodenisolat	137
E.5.2 Der Selbsttransfer konnte für die Plasmide pBI709, pBI860, pKI173 und pKI202 gezeigt werden	139
E.6 Das Gentransferpotential der untersuchten Bodenisolat	141
E.7 Die Sequenzierung der Transferregionen der Plasmide pBI709 und pBI860 liefert neue Daten über die Transfersysteme von Plasmiden aus Bodenisolaten	142
E.7.1 Ist pBI709 ein pWW0-ähnliches Plasmid und gehört zur IncP-9 Gruppe?	142
E.7.2 Die <i>mpf</i> -Region von pBI709 wird durch zwei <i>nuc</i> -Gene und drei hypothetische Gene von der <i>dtr</i> -Region getrennt	143
E.7.3 Die <i>dtr</i> -Region von pBI709 und pWW0 ist ähnlich der <i>dtr</i> -Region von R388	144
E.7.4 Das konjugative pBI709 kodiert für kein VirB7-homologes Protein	144
E.7.5 Die Genorganisation der TraI Region von pBI1063 ähnelt der TraI Region von RP4 und die TraII Region der vom Octopin Ti-Plasmid	145
E.8 Ist das Plasmid pBI1063 konjugativ?	147
E.9 pOL1820 – Plasmid oder Minichromosom?	148
E.10 Ausblick	149
 F Literatur	 151
 G Abkürzungsverzeichnis	 166
 Anhang I	 1
Anhang II	7
Anhang III	11
Anhang IV	35
Anhang V	55
Anhang VI	57
Anhang VII	72
Anhang VIII	78

A. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit war eingegliedert in das BMBF-Teilprojekt mit dem Titel "Analyse des Gentransferpotentials für Konjugation und Transformation". Von zwei Versuchsflächen, einer gedüngten und einer ungedüngten Parzelle, in der Füsinger Au (Schleswig Holstein) wurden von der Arbeitsgruppe Imhoff (Universität Kiel) innerhalb von zwei Jahren jeweils vier Bodenproben genommen. Von diesen wurden Aufschwemmungen hergestellt und auf Fest-Medien unter Bedingungen bebrütet, die eine Anreicherung von Denitrifikanten erlauben (Arbeitsgruppe Lorenz/Wackernagel, Universität Oldenburg).

Von diesen Platten wurden 3055 Reinkulturen isoliert. Diese wurden mit einer endogenen alkalischen Plasmidisolierungsmethode auf ihren Plasmidgehalt untersucht. Es wurden 99 plasmidhaltige Bodenisolatete detektiert; dies entspricht einem Gesamtplasmidgehalt der isolierten Bakterienpopulation von 3.2 %. Der tatsächliche Plasmidgehalt ist wahrscheinlich höher, da mit der gewählten Isolierungsmethode nicht alle Plasmide erfasst werden. Die Verteilung der Plasmide in den einzelnen Gattungen variierte allerdings zwischen 2 % (*Arthrobacter*) und 100 % (*Paracoccus*).

Die 54 plasmidhaltigen Gram-negativen Bodenisolatete der ersten beiden Bodenprobenentnahmen wurden in dieser Arbeit näher untersucht. Insgesamt wurden in diesen 54 Bodenisolateten 104 Plasmide detektiert, wobei der Großteil der Bodenisolatete (54 %) nur ein Plasmid enthielt. Die größte Gruppe der detektierten Plasmide (47 %) war größer als 70 kb und 24 % von den 104 Plasmiden hatten eine Größe zwischen 30 kb und 70 kb. Der Anteil von Plasmiden mit einer Größe unter 30 kb betrug 29 %.

Das Vorkommen von Plasmiden gleicher Größe in unterschiedlichen Bodenisolateten könnte ein Hinweis auf einen im Boden erfolgten Gentransfer sein. Anhand von vergleichenden Restriktionsspaltungen dieser Plasmide und der 16S-rDNA-Bestimmung der dazugehörigen Bodenisolatete konnten zwar identische Plasmide detektiert werden, die 16S-rDNA-Analysen ergaben aber keinen eindeutigen Hinweis auf einen Gentransfer.

Die Plasmide der Gram-negativen Bodenisolatete scheinen bisher unbekanntes Inkompatibilitätsgruppen (Inc-Gruppen) anzugehören, da keines dieser Plasmide mit Inc-spezifischen PCR-Primern und Inc-spezifischen Hybridisierungssonden einer der bekannten Inc-Gruppen zugeordnet werden konnte.

In den plasmidhaltigen Bodenisolaten wurden keine plasmidkodierte Antibiotika- und Schwermetallresistenzen nachgewiesen. Um den Selbsttransfer der Plasmide untersuchen zu können, wurden von 14 Plasmiden Antibiotika-resistente Transposonmutanten hergestellt. Ein Selbsttransfer konnte in Konjugationsexperimenten für vier dieser Plasmide nachgewiesen werden. Eine Mobilisierung des *broad-host-range* Plasmides pSunny (RSF1010 Derivat) durch die Bodenisolatete konnte für sechs von 20 untersuchten Isolaten gezeigt werden. Insgesamt konnte mit diesen Experimenten für sieben Bodenisolatete ein Gentransferpotential nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Anteil von 32 %. Da der Nachweis eines Gentransfers von vielen verschiedenen Parametern beeinflusst wird, kann ein Gentransferpotential für Bodenisolatete, die in den Konjugations- oder Mobilisierungsexperimenten negativ getestet wurden, nicht ausgeschlossen werden.

Durch partielle Sequenzierungen der Plasmide sollten Transfergene detektiert werden. Die Transferregion des konjugativen Plasmides pBI709 aus *Pseudomonas* sp. wurde komplett sequenziert. Die Genorganisation dieser Transferregion ist bis auf zwei Ausnahmen identisch mit der des konjugativen IncP-9 Plasmides pWW0. Auch auf Nukleotid- und Proteinebene zeigen diese beiden Transfersysteme große Übereinstimmungen, so dass diese beiden Transfersysteme nah verwandt sein könnten.

Durch partielle Sequenzierung des 130 kb großen konjugativen Plasmides pKI202 aus *Pseudomonas* sp. konnte bisher nur ein Gen detektiert werden, dessen Genprodukt am Konjugationsprozess beteiligt sein könnte. Auch für das 105 kb große konjugative Plasmid pKI173 aus *Pseudomonas* sp. konnten nur sechs mögliche Transfergene ermittelt werden.

Für das Plasmid pBI1063 aus *Stenotrophomonas maltophilia* konnte weder durch Konjugation noch durch Mobilisierung von pSunny ein Gentransferpotential nachgewiesen werden. Die Sequenzanalyse eines 26 kb großen Bereiches dieses Plasmides hat aber gezeigt, dass auf diesem Plasmid Transfergene lokalisiert sind. Diese liegen in zwei Genclustern (TraI und TraII) vor. Die Genorganisation der TraI Region von pBI1063 gleicht der TraI Region von RP4 und die der TraII Region zeigt Ähnlichkeiten zu der von Octopin Ti-Plasmiden.

Alle untersuchten Paracoccen-Bodenisolatete enthielten entweder ein 20 kb Plasmid oder ein 14 kb Plasmid. Auf dem 20 kb Plasmid pOL1820 (aus *Paracoccus* sp.) wurden Teile eines *rrn*-Operons (16S-rDNA, 23S-rDNA, t-RNA-Ile und t-RNA-Ala) sequenziert und durch Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass auch auf den 20 kb und 14 kb Plasmiden der anderen Paracoccen-Bodenisolatete diese Gene vorhanden sind.

B. EINLEITUNG

B.1 Bakterielle Plasmide

Gram-negative und Gram-positive Bakterien können neben ihrem Chromosom auch nicht-essentielle extrachromosomale Replikons enthalten. Diese Replikons werden als Plasmide bezeichnet. Die Größe dieser doppelsträngigen DNA-Elemente ist sehr variabel und reicht von ca. 1 kb (z. B. pXF868 1.3 kb aus *Xylella fastidiosa*, Acc.-Nummer NC_002092) bis zu über 2400 kb (z. B. pSymB 1683 kb aus *Sinorhizobium meliloti*, Acc.-Nummer NC_003078) (Kado, 1998). Es gibt Plasmide, die in zirkulärer Form vorliegen, dazu gehören die meisten der bisher bekannten Plasmide (z. B. F, RP4, R388, RSF1010) und solche in Form von linearen Molekülen. Diese linearen Plasmide wurden u. a. in Bakterien der Gattungen *Streptomyces* (Netolitzky *et al.*, 1995) und *Borrelia* (Casjens *et al.*, 1995) entdeckt.

B.1.1 Plasmidreplikation

Die Replikation von Plasmiden erfolgt unabhängig vom Wirtschromosom, wobei die Kontrolle der Plasmidreplikation durch plasmidkodierte Systeme erfolgt (del Solar *et al.*, 1998). Trotz dieser autonomen Replikation wird für die Plasmidreplikation die Replikationsmaschinerie des Wirtsbakteriums benutzt.

Zur essentiellen Replikationsregion der Plasmide gehören neben der für jedes Replikon charakteristischen *oriV*-Region (*origin of replication*) Gene, die eine Rolle bei der Replikationskontrolle spielen, und bei einigen Plasmiden ein Gen, das für ein Replikationsinitiationsprotein kodiert. Die Synthese des "*leading*"-Stranges beginnt am *oriV*, der minimalen in *cis* wirkenden Region, die für eine autonome Replikation essentiell ist. In dieser Region befinden sich auch Bindestellen für plasmid- und chromosomalkodierte Replikationsproteine. Bei *ccc*-Plasmiden sind drei verschiedene Replikationsmechanismen bekannt:

- 1.) Bei der Replikation nach dem Theta-Mechanismus wird der "*leading*"-Strang von 5' nach 3' polymerisiert (kontinuierliche Replikation), an dem anderen Strang ("*lagging*"-Strang) erfolgt die Synthese diskontinuierlich. Plasmide, die nach diesem Mechanismus replizieren sind z. B. RP4, ColE1 und R100.

2.) Der "rolling-circle"-Mechanismus ist unidirektional und im Gegensatz zu dem Theta-Mechanismus sind die DNA-Synthesen des "*leading*"- und des "*lagging*"-Stranges nicht gekoppelt. Die meisten bekannten Plasmide, die nach diesem Mechanismus replizieren sind kleiner als 10 kb, z. B. pGT5 aus *Pyrococcus abyssi* (del Solar *et al.*, 1998; Khan, 2000).

3.) Gut untersuchte Beispiele für die "strand-displacement"-Replikation sind die IncQ-Plasmide wie z. B. RSF1010, deren Replikation unabhängig von den Wirtsproteinen DnaA, DnaB, DnaC und DnaG ist, aber das DNA-Polymerase III-Holoenzym und Ssb benötigt. Die anderen essentiellen Replikationsproteine (RepA: Helikase, RepB: Primase und RepC: Initiatorprotein) sind plasmidkodiert. Die Replikation beginnt bei RSF1010 an zwei benachbarten *oriV*, die auf komplementären Strängen liegen (del Solar *et al.*, 1998). Bei der DNA-Synthese wird der nicht replizierte Strang verdrängt und es bildet sich die charakteristische "D-loop"-Struktur.

B.1.2 Mechanismen zur Stabilisierung von Plasmiden

Plasmide benutzen verschiedene Mechanismen, um sich stabil in einer bakteriellen Population zu etablieren. Zu diesen Mechanismen gehören die Kontrolle der Kopiezahl, "Partitioning"-Systeme, Systeme zur Auflösung von Multimeren und das Absterben von plasmidfreien Bakterienzellen ("*postsegregational killing*").

Um in ihren Wirten stabil koexistieren zu können und um die metabolische "Belastung", die sie für ihren Wirt bedeuten, zu minimieren, muss es eine Kontrolle der Plasmidreplikation geben. Die Kopiezahl eines Plasmides variiert in verschiedenen Wirtsbakterien; für einen bestimmten Wirt und unter bestimmten Wachstumsbedingungen gibt es eine plasmidcharakteristische Kopiezahl (del Solar und Espinosa, 2000). Die Kopiezahl eines Plasmides wird als Verhältnis der Anzahl der Plasmid-Kopien zur Anzahl der bakteriellen Chromosomen definiert. Plasmide mit einer Kopiezahl größer als 15 werden als *high-copy-number* Plasmide, andere als *low-copy-number* Plasmide bezeichnet (Schumann, 1990). Die grundlegenden Kontrollmechanismen der Replikation greifen bei der Initiation der Replikation ein. Bei der Kontrolle durch Antisense-RNA (ctRNA, *countertranscribed-RNA*) bindet die ctRNA nah am 5' Ende des Zieltranskripts. Die Replikation wird durch die RNA-ctRNA Paarung inhibiert (del Solar und Espinosa, 2000). Bei ColE1 verhindert die ctRNA die Prozessierung des für die Replikation essentiellen Primers (del Solar *et al.*, 1998). Eine Inhibierung der Replikation erfolgt bei ColE2 durch Bindung der ctRNA an komplementäre Bereiche der *rep*-mRNA und verhindert so die *rep*-Expression (del Solar und Espinosa, 2000).

Bei einigen Plasmiden (z. B. pMV158, pIP501) wird die Replikation von ctRNA und

zusätzlich von einem Transkriptionsrepressor inhibiert. Das CopG-Repressorprotein des Plasmides pMV158 verhindert die Transkription seines eigenen Genes und des *repB*-Genes, dessen Genprodukt für die Initiation der Replikation essentiell ist. Eine weitere Regulation erfolgt durch die ctRNA II, die die Translation von *repB* blockiert (del Solar und Espinosa, 2000). Der *oriV* einiger Plasmide (F, R1162, RSF1010, RK2) enthält mehrere ca. 20 bp lange *direct repeats*, die als Iterons bezeichnet werden und Bindestellen für das Rep-Protein (Initiatorprotein) sind (Review: Chatteraj, 2000). Die Rep-Proteine können als Monomer und Dimer vorliegen. In der monomeren Form binden sie an die Iterons und wirken als Initiator der Replikation. Als Dimer sind sie inaktiv in der Iteronbindung, können aber an Operatorsequenzen von *rep*-Genen binden. Mit der Hilfe von Chaperonen können die Rep-Dimere durch eine Konformationsänderung zu Rep-Monomeren umgewandelt werden.

Bei einer geringen Kopiezahl der Plasmide kommt es durch Bindung der Rep-Proteine an die Iterons des *oriV* zur Initiation der Replikation. Wenn die Kopiezahl ansteigt, können Rep-Moleküle, die an Iterons gebunden sind (Rep-Iteron-Komplex) mit anderen Rep-Iteron-Komplexen interagieren und so die Replikation hemmen. Dieser "*handcuffing*"-Mechanismus wirkt als negative Kontrolle. Wie die Initiation durch diesen Mechanismus blockiert wird, ist noch nicht bekannt (Chatteraj, 2000).

Da Plasmide per Definition nicht essentiell für die Bakterienzelle sind, muss es Mechanismen geben, die dafür sorgen, dass die Plasmide stabil in einer Zelllinie vererbt werden. Kleine *high-copy-number* Plasmide können auch allein durch eine zufällige Verteilung bei der Zellteilung effizient vererbt werden, bei *low-copy-number* Plasmiden würde diese zufällige Verteilung bald zur Segregation führen (Williams und Thomas, 1992). Ein aktives "Partitioning"-System sorgt bei der Zellteilung für eine Verteilung der Plasmide auf die Tochterzellen und minimiert so die Anzahl plasmidfreier Zellen. Dieses System wurde u. a. bei den Plasmiden F, RK2 und pTiB6S3 detektiert (Williams und Thomas, 1992). Die bisher bekannten "Partitioning"-Systeme bestehen aus drei Komponenten: eine in *cis* wirkende Centromer-ähnliche DNA-Region und zwei in *trans* wirkende Proteine (Williams und Thomas, 1992; Gerdes *et al.*, 2000). Die Gene dieser beiden Proteine, meist als *parA* und *parB* bezeichnet, sind in einem Operon organisiert, das durch die Par-Proteine autoreguliert wird (Gerdes *et al.*, 2000). Bei den Proteinen der ParA-Familie handelt es sich um ATPasen, die zwei verschiedenen ATPase-Familien angehören, entweder den Aktin-ATPasen (z. B. Aktin, Zuckerkinasen, DnaK) oder den Walker-Typ-ATPasen (Gerdes *et al.*, 2000). Die ParB-Proteine binden an die Centromer-ähnliche DNA-Region und bilden so den "Partitioning"-Komplex (Williams und Thomas, 1992; Surtees und Funnell, 2001). Eine Modellvorstellung

des "Partitioning"-Mechanismus geht davon aus, dass sich die Plasmide zur Zellmitte bewegen und dort replizieren. Nach der Replikation kommt es zur Paarung der Plasmide, die wahrscheinlich über ParB-Centromer-Interaktionen erfolgt. Es kommt zur Trennung der Plasmide, die sich dann zu entgegengesetzten Zellpolen bewegen (Gerdes *et al.*, 2000). Andere Systeme zur Stabilisierung von Plasmiden sind Auflösungssysteme von Multimeren (*mrs*), wie sie bei F, ColE1 und RP4 gefunden wurden. Diese Systeme erhöhen die Anzahl von unabhängig segregierenden DNA-Molekülen bei der Zellteilung (Williams und Thomas, 1992). Bei RP4 kodiert *parA* für eine Resolvase, die zusammen mit der *res*-Region als sequenzspezifisches Rekombinationssystem wirkt (Eberl *et al.*, 1994).

Bei einem anderen Mechanismus zur Plasmiderhaltung werden plasmidfreie Zellen durch plasmidkodierte Proteine abgetötet ("*postsegregational-killing*"-Systeme) (Jensen und Gerdes, 1995; Engelberg-Kulka und Glaser, 1999; Gerdes *et al.*, 1997). Der grundlegende Mechanismus dieser "*postsegregational-killing*"-Systeme basiert auf einem Toxin-Antidot-Prinzip. Die Plasmide kodieren für das stabile Toxin und für das instabile Antidot, welches die Wirkung des Toxins hemmt. Toxin und Antidot können entweder beides Proteine sein, wie z. B. CcdA/CcdB von F oder ParD/ParE von RP4 (Engelberg-Kulka und Glaser, 1999), oder das Antidot ist eine Antisense-RNA (instabil), wie z. B. in dem *hok/sok* System von R1 (Thisted *et al.*, 1994). Die Antisense-RNA bindet an die stabile mRNA des Toxins und verhindert so die Translation dieser RNA. Handelt es sich bei dem Antidot um ein Protein, so interagiert dieses mit dem Toxin und neutralisiert dessen Wirkung (Engelberg-Kulka und Glaser, 1999). Erhält eine Tochterzelle bei der Zellteilung kein Plasmid, so werden dennoch im Cytoplasma der Mutterzelle vorhandene Toxin- und Antidot-Moleküle auf diese Zelle verteilt. Da das Toxin eine längere Halbwertszeit hat als sein Antidot, kommt es zum Zelltod der plasmidfreien Zelle, da in dieser weder das Toxin noch das Antidot neugebildet werden können (Engelberg-Kulka und Glaser, 1999).

B.1.3 Wirtsbereich der Plasmide

Einige Plasmide haben einen engen Wirtsbereich, der oft nur nah verwandte Spezies umfasst. ColE1 repliziert z. B. nur in *Enterobacteriaceen*, nicht aber in Rhizobien oder Pseudomonaden (Schumann, 1990). Im Gegensatz zu solchen *narrow-host-range* Plasmiden, können *broad-host-range* Plasmide wie z. B. RSF1010 oder IncP-Plasmide, auch in Spezies replizieren, die nicht zu der gleichen Proteobakteriengruppe wie das Wirtsbakterium gehören (Thomas und Smith, 1987; Rawlings und Tietze, 2001).

Auch die Expression bestimmter plasmidlokalisierter Gene kann vom Wirtstamm abhängen,

so werden z. B. die katabolischen Gene des TOL-Plasmides aus *Pseudomonas putida* nicht in *E. coli* LE392R exprimiert (Ramos-Gonzales *et al.*, 1991).

B.1.4 Inkompatibilitätsgruppen

Zur Klassifizierung der Plasmide wurden diese in Inkompatibilitätsgruppen (Inc) eingeteilt. Inkompatibilität bedeutet, dass zwei verschiedene Plasmide derselben Inc-Gruppe ohne selektiven Druck nicht in einer Bakterienzelle koexistieren können (Couturier *et al.*, 1988; Sýkora, 1992). So sind Plasmide mit der gleichen Replikationskontrolle und dem gleichen "Partitioning"-System inkompatibel. 1988 waren ca. 30 Inc-Gruppen von Plasmiden aus *Enterobacteriaceen* bekannt. Für 19 Inc-Gruppen konnten Couturier *et al.* (1988) spezifische Hybridisierungs sonden herstellen. Die Sonden enthalten Genbereiche aus der Replikationsregion der verschiedenen Plasmide. Götz *et al.* (1996) entwickelten auf der Basis von Replikon-spezifischen DNA-Regionen PCR-Primer zur Detektion von IncP-, IncN-, IncW- und IncQ-Plasmiden.

Plasmide aus der Gattung *Pseudomonas* wurden unabhängig davon in eigene Inc-Gruppen (P1-P14) eingeteilt (Chakrabaty, 1976; Tschäpe, 1994). Einige der *Pseudomonas* IncP-Gruppen sind identisch mit Inc-Gruppen von *Enterobacteriaceen*, z. B. entspricht *Pseudomonas* IncP3 IncC und IncP4 entspricht IncQ (Tschäpe, 1994).

In den letzten Jahren haben viele Untersuchungen gezeigt, dass mit den vorhandenen Inc-Proben fast keine Plasmide aus Umwelthabitaten bekannten Inc-Gruppen zugeordnet werden können (Dahlberg *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 2001). Dies spricht dafür, dass die bisher bekannten Inc-Gruppen nur einen kleinen Ausschnitt der natürlichen Plasmiddiversität repräsentieren.

B.1.5 Beispiele für die Genfracht von Plasmiden

Neben den Genen für Replikation und denen der Stabilitätsmechanismen können Plasmide auch für Proteine kodieren, die der Wirtszelle einen selektiven Vorteil gegenüber plasmid-freien Zellen bieten. So sind viele Antibiotikaresistenzgene auf Plasmiden lokalisiert. Einige der bekanntesten Plasmide wie z. B. RP4, R388 und R100 gehören zu der Gruppe der Resistenzplasmide (R-Plasmide). Durch die ständig ansteigende Verwendung von Antibiotika in der Medizin und der Landwirtschaft hat die Zahl der Plasmide, die für multiple Antibiotikaresistenzen kodieren, stark zugenommen (Witte, 1998). Neben Resistenzen gegenüber Antibiotika können Plasmide auch Schwermetallresistenzen vermitteln (Diels und Mergeay, 1990, Silver und Phung, 1996). Das bekannteste Beispiel hierfür sind die Quecksilber

resistenzgene (*mer*), die wie die Antibiotikaresistenzgene ebenfalls oft Bestandteile von Transposons sind (Summers, 1986).

Degradative Plasmide ermöglichen ihrer Wirtszelle die Metabolisierung von C-Quellen z. B. aromatischer Verbindungen wie Toluol, Salicylat, Naphtalin und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure. Die TOL-Plasmide (z. B. pWW0) aus *Pseudomonas putida* tragen die Gene für den Abbau von aromatischen Verbindungen wie Toluol (Burlage *et al.*, 1989). Diese Gene sind in zwei Operons ("Upper- und Lower-pathway"-Operon) organisiert und liegen auf zwei ineinander verschachtelten Transposons (Tsuda und Iino, 1988).

Einige Bakterien sind befähigt, mit Pflanzen Symbiosen einzugehen. Bakterien der Gattung *Rhizobium* können in Symbiose mit Leguminosen atmosphärischen Stickstoff fixieren (Schumann, 1990). Viele Gene, die zur Ausbildung dieser Symbiose notwendig sind, sind auf großen Plasmiden (180 kb bis 1600 kb), den sogenannten Sym-Plasmiden, lokalisiert.

Die Ti-Plasmide (Tumor-induzierende Plasmide) wurden in Agrobakterien entdeckt. Über Verletzungen dringen diese Bakterien in pflanzliches Gewebe ein und übertragen einen Teil der Plasmid-DNA, die T-DNA, in das Pflanzengenom. Die übertragene T-DNA kodiert für Proteine zur Produktion von Wachstumshormonen (Auxin und Cytokinin), durch Expression dieser Gene kommt es zur Bildung von Tumoren. Die durch *Agrobacterium tumefaciens* verursachte Krankheit wird als "crown gall tumor disease" bezeichnet. Die Virulenzgene (*vir*) der Ti-Plasmide sind für den Transfer der T-DNA essentiell. Die Transkription der *vir*-Gene wird durch die Regulatorgene *virA* und *virG* und durch pflanzliche Signalmoleküle kontrolliert (Clewell, 1993). Bei der Prozessierung der Ti-Plasmid-DNA durch VirD1 und VirD2 entsteht einzelsträngige T-DNA, die durch eine von *virB*-Genprodukten gebildete Membranpore in die Pflanzenzelle transferiert wird. Der VirB-Transmembrankomplex ist eines der am besten untersuchten DNA-Transfersysteme; die Funktion und Lokalisation seiner Einzelkomponenten wird in Abschnitt D.3.2. ausführlicher beschrieben.

Außer den oben genannten Genen sind auf Plasmiden auch Gene zur Bildung von Cytotoxinen (z. B. bei pH1y152), Enterotoxinen (p307) und Bacteriocinen (z. B. bei ColE1) lokalisiert (Schumann, 1990). Auch Restriktions- und Modifikationsysteme können plasmidkodiert sein. Das Plasmid pMB1 (9 kb) kodiert für das *EcoRI* Restriktions-Modifikationssystem, das aus einer Endonuklease und einer Methylase besteht (Schumann, 1990). Resistenzsysteme gegen UV-bedingte DNA-Schäden wie *mucAB* von pKM101 aus *Enterobacter cloacae* (Woodgate und Sedgwick, 1992) und *rulAB* von pPSR1 aus *Pseudomonas syringae* (Sundin *et al.*, 1996), konnten bei Plasmiden unterschiedlicher Inc-Gruppen detektiert werden (Lodwick und Strike, 1991).

Neben den oben genannten Plasmiden gibt es solche, bei denen keine phänotypischen Eigenschaften erkennbar sind. Diese werden als kryptische Plasmide bezeichnet. Ein Beispiel für ein solches Plasmid ist der F-Faktor.

B.1.6 Konjugative und mobilisierbare Plasmide

Eine Besonderheit einiger Plasmide ist die Fähigkeit zum Selbsttransfer (Konjugation) oder die Fähigkeit, durch andere Plasmide transferiert zu werden (Mobilisierung). Plasmide, die für alle essentiellen DNA-Transfer-Komponenten (*oriT*, *tra*-Gene) kodieren, werden als konjugativ bezeichnet. Konjugative Plasmide wurden sowohl bei Gram-negativen als auch bei Gram-positiven Bakterien gefunden. Zu den bekanntesten und am besten untersuchten konjugativen Plasmiden Gram-negativer Bakterien zählen die IncP-Plasmide RP4 (aus *Pseudomonas aeruginosa*) und R751 (aus *Klebsiella aerogenes*), das IncW-Plasmid R388 (aus *E. coli*) und das IncN-Plasmid pKM101 (aus *Enterobacter cloacae*). Bei all diesen Plasmiden handelt es sich um *broad-host-range* Plasmide, die Antibiotikaresistenzgene tragen.

Die Transferregionen einiger konjugativer Plasmide wurden sequenziert und analysiert. Im Detail wurden die Konjugationssysteme der sechs Inc-Gruppen IncF, IncI, IncP, IncN, IncW und IncX untersucht (Zechner *et al.*, 2000). Dabei zeigte sich, dass die Konjugationssysteme von verschiedenen Plasmiden einer Inc-Gruppe deutliche Gemeinsamkeiten in der genetischen Organisation, der Morphologie der Pili, der Phagenspezifität und der Transferproteine aufweisen. Die Transfersysteme von Plasmiden verschiedener Inc-Gruppen sind einander nicht so ähnlich wie die der gleichen Inc-Gruppe; dennoch zeigen die jeweiligen Transferprodukte eine phylogenetische Verwandtschaft (Christie und Vogel, 2000; Cao und Saier, 2001). Zudem sind grundlegende Gemeinsamkeiten im Konjugationsmechanismus erkennbar, die im Folgenden erläutert werden.

B.1.6.1 Konjugation

Voraussetzung für einen DNA-Transfer durch Konjugation ist ein Zellkontakt zwischen der Donorzelle und der Rezipientenzelle. Bei Gram-negativen Bakterien erfolgt der initiale Kontakt der Konjugationspartner über Pili, die morphologisch variabel sein können [flexible Pili (bei IncF), dicke starre Pili (IncW und IncN) oder dicke flexible Pili (IncX)].

In allen bisher untersuchten Konjugationssystemen Gram-negativer Bakterien wird einzelsträngige Plasmid-DNA transferiert und die Prozessierung der Plasmid-DNA erfolgt durch plasmidkodierte Enzyme (Lanka und Wilkins, 1995). Essentiell für den Transfer von

Plasmiden ist die in *cis* wirkende *oriT*-Region (*origin of transfer*). In dieser Region befindet sich die "*nic-site*", an der durch Relaxasen ein Einzelstrangbruch eingeführt wird. Die Relaxasen bilden zusammen mit anderen plasmidkodierten Proteinen und/oder Wirtsproteinen am *oriT* das Relaxosom. Die Gene, die für Proteine des DNA-Prozessierungsapparates kodieren, werden als *dtr* (*DNA transfer and replication*) bezeichnet. Die Relaxase bleibt kovalent mit dem 5' Ende der DNA verbunden. Der Transfer des Einzelstranges in die Rezipientenzelle erfolgt durch eine von Donor gebildete Membranpore (*mating-pair-formation*-Komplex, Mpf-Komplex), die die Cytoplasmamembran, das Periplasma und die äußere Membran durchspannt. Die *coupling*-Proteine (auch TraG-ähnliche Proteine genannt) stellen die Verbindung zwischen dem Relaxosom und dem Mpf-Komplex her (Cabezón *et al.*, 1997). Die Interaktion von Komponenten des Relaxosoms mit *coupling*-Proteinen konnte für einige Konjugationssysteme nachgewiesen werden (Disqué-Kochem und Dreiseikelmann, 1997; Schröder *et al.*, 2002). Die Proteine des Mpf-Komplexes verschiedener konjugativer Plasmide zeigen Ähnlichkeiten zu den VirB-Proteinen des Ti-Plasmides (Review: Cao und Saier, 2001). In den Transfersystemen von IncN- und IncW-Plasmiden gibt es zu jedem *virB*-Gen ein homologes Gen. Diese Gene sind außerdem kolinear angeordnet (Kado, 1994; Pohlman *et al.*, 1994).

Hinsichtlich ihrer Lokalisation und möglichen Funktion in dem Membranporenkomplex sind die VirB-Proteine des Ti-Plasmides am besten untersucht (Beijersbergen *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1996; Baron *et al.*, 1997b; Das und Xie, 1998; Das und Xie, 2000). Wie dieser VirB-Membranporenkomplex aussehen könnte und welche möglichen Funktionen die einzelnen Mpf-Komponenten im DNA-Transferprozess ausüben, wird in den Abschnitten D.3.1 und D.3.2 erläutert.

Für die Wirtszelle eines konjugativen Plasmides bedeutet der Konjugationsprozess (Prozessierung der Plasmid-DNA und Aufbau der Membranpore) eine energetische Belastung. Um diese so gering wie möglich zu halten, sind die Transfersysteme reguliert. Die komplexen Regulationsmechanismen des F-Plasmides, der IncP-Plasmide RP4 und R751 und des Ti-Plasmides sind näher untersucht worden (Zatyka und Thomas, 1998). Bei der Regulation von IncP-Transfergenen reprimieren die Proteine KorB und TrbA direkt die Expression der Transfergene, während andere Proteine wie z. B. KorA eine regulatorische Wirkung auf die Expression der Regulatorgene haben (Zatyka *et al.*, 1994 und 1997).

Wie bei der Replikation spricht man auch bei konjugativen Plasmiden mit einem weiten Transferbereich von *broad-host-range* Plasmiden und von *narrow-host-range* Plasmiden mit einem engen Transferbereich. Für IncP-Plasmide konnte gezeigt werden, dass ihr Wirts

bereich des Transfers größer ist als der ihrer Replikation (Guiney *et al.*, 1984; Shoemaker *et al.*, 1986). Die Effizienz eines Konjugations- oder Mobilisierungsereignisses (Frequenz eines Ereignisses pro Zeitspanne oder Donor-/Rezipientenzelle) variiert je nach verwendetem Rezipienten. In Konjugationsexperimenten mit dem konjugativen IncP-Plasmid RK2 konnten Transferraten von 10^{-1} mit *E. coli* als Rezipienten und Transferraten von 10^{-5} bis 10^{-7} mit *Saccharomyces cerevisiae* als Rezipienten ermittelt werden (Waters, 1999). Auch die Einflüsse von abiotischen und biotischen Faktoren auf die Transferraten konnten gezeigt werden (siehe Abschnitt B.4.3.). Transfersysteme wie z. B. das *tra*-System von pTi sind reguliert und müssen für eine optimale Transferrate dereprimiert werden. Bei dem *tra*-System von pTi erfolgt diese Dereprimierung durch Opine (Zatyka und Thomas, 1998).

B.1.6.2 Mobilisierung

Der durch konjugative Plasmide vermittelte Transfer nicht-konjugativer Plasmide in andere Zellen wird als Mobilisierung bezeichnet. Dazu müssen das zu mobilisierende und ein konjugatives Plasmid zusammen in einer Zelle vorliegen. Es gibt zwei Mobilisierungsmechanismen. Der Transfer eines nicht-konjugativen Plasmides kann über eine Kointegratbildung zwischen dem konjugativen und dem zu mobilisierenden Plasmid erfolgen. Die Kointegratbildung erfolgt im Donor-Bakterium über Rekombination oder Transposition, im Rezipienten kann dann dieses Kointegrat aufgelöst werden (Reimann und Haas, 1993).

In anderen Fällen benutzen mobilisierbare Plasmide wie z. B. RSF1010 den Mpf-Apparat konjugativer Plasmide. Die mobilisierbaren Plasmide selbst kodieren für Mobilisierungsproteine (Mob-Proteine), die essentiell für die Bildung des Relaxosoms und das Einfügen des Einzelstrangbruches an der *nic-site* im *oriT* des mobilisierbaren Plasmides sind. Zum Transfer des mobilisierbaren Plasmides erfolgt die Interaktion seines Relaxosoms mit dem *coupling*-Protein des konjugativen Plasmides (Cabezón *et al.*, 1997). Der Einzelstrang wird dann über die vom konjugativen Plasmid gebildete Membranpore in den Rezipienten transferiert. Einige andere mobilisierbare Plasmide wie z. B. CloDF13 kodieren zusätzlich zu den Proteinen des Relaxosoms für ein eigenes *coupling*-Protein (Cabezón *et al.*, 1994). Die Mobilisierungsraten mobilisierbarer Plasmide variieren in Abhängigkeit des Konjugationssystems, durch das der Transfer erfolgen soll (Cabezón *et al.*, 1997). Die Experimente von Cabezón *et al.* (1994 und 1997) und Hamilton *et al.* (2000) haben gezeigt, dass die Mobilisierungsrate entweder von der Interaktion des *coupling*-Proteines des konjugativen Plasmides mit dem Relaxosom des mobilisierbaren Plasmides oder bei Plasmiden wie CloDF13 von der Interaktion ihres *coupling*-Proteines mit dem Mpf-Komplex des konjugativen Plasmides abhängig ist.

B.2 Der horizontale Gentransfer

Unter horizontalem Gentransfer (HGT) wird die Übertragung genetischen Materials in eine Zelle verstanden. Dieser wird unter vielen Aspekten untersucht. Neben der molekularbiologischen Analyse der Mechanismen des HGT gibt es Untersuchungen unter ökologischen und evolutionsbiologischen Aspekten. In vielen biologischen Anwendungen wie z. B. dem Pflanzenschutz, der Insektenbekämpfung, der symbiotischen Stickstofffixierung und der Sanierung Xenobiotika-haltiger Böden/Gewässer wird der Einsatz von gentechnisch veränderten Mikroorganismen zur Problemlösung in Betracht gezogen. Teilweise ist hier der Gentransfer erwünscht, um z. B. die degradativen Funktionen ("*remediative potential*") vom Inokulat auf die endogene Flora zu übertragen ("*in situ cloning*") (Dejonghe *et al.*, 2000).

Die Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen hat aber auch eine rege Diskussion über die Gefahren des horizontalen Gentransfers (HGT) ausgelöst. Zunehmend wird heute die Frage nach der Bedeutung des HGT für die Diversität der Bakterien und ihre Adaptionfähigkeit an veränderte Umweltbedingungen untersucht. Die Anpassung von Mikroorganismen an veränderte Umweltbedingungen oder die Besiedlung neuer ökologischer Nischen kann nicht allein durch Mutationen erklärt werden. Eine Analyse der kompletten Sequenz des *E. coli*-Chromosoms hat gezeigt, dass 755 (17.6%) der 4288 offenen Leseraster durch HGT erworben sind (Lawrence und Ochman, 1998). Der HGT scheint in der Evolution der Bakterien und ihrer Diversität eine größere Rolle zu spielen als bisher angenommen. Eine genaue Kenntnis über die Art und Weise wie der DNA-Austausch von Bakterien abläuft und in welchem Umfang der HGT in natürlichen Umwelthabitaten stattfindet, ist für viele biologische Fragestellungen von immenser Bedeutung.

Der HGT ist nicht nur auf Bakterien beschränkt, sondern konnte auch zwischen Archaeobakterien und Bakterien (Nelson *et al.*, 1999) sowie Bakterien und Eukaryoten (Doolittle, 1998; Wolf *et al.*, 1999) beobachtet werden.

Zu den Mechanismen des HGT zählen die Transduktion, die Transformation und die Konjugation (Reviews: Mazodier und Davies, 1991; Dreiseikelmann, 1994; Dröge *et al.*, 1999; Davison, 1999).

Bei der Transduktion wird genetisches Material von Bakteriophagen auf Bakterien übertragen. Es wird dabei zwischen genereller und spezieller Transduktion unterschieden. Bei der generellen Form der Transduktion können beliebige bakterielle Gene transferiert werden, wohingegen bei der speziellen Transduktion nur Gene übertragen werden, die sich in der Nähe der Prophagenintegrationsstelle befinden (Davison, 1999). Die Transduktion konnte in

aquatischen (Ripp und Miller, 1995; Jiang und Paul, 1998) und terrestrischen Habitaten (Zeph *et al.*, 1988) nachgewiesen werden (Miller, 2001).

Die Aufnahme exogener DNA direkt aus der Umwelt durch Bakterien und die Integration dieser DNA ins bakterielle Chromosom wird als Transformation bezeichnet. Die Fähigkeit zur natürlichen Transformation ist für über 44 Bakterienspezies bekannt (Lorenz und Wackernagel, 1994). Einige Bakterien sind nur in einem bestimmten Wachstumsstadium zur Transformation befähigt, während andere Spezies immer kompetent sind. Transformation konnte in verschiedenen Umwelthabitaten, z. B. in aquatischen (Süß- und Salzwasser) Bereichen und im Boden nachgewiesen werden (Davison, 1999).

Bei der Konjugation (siehe Abschnitt B.1.6.1) erfolgt der DNA-Transfer über einen Zell-Zell Kontakt zwischen Donor und Rezipient (Clewell, 1993). Die Konjugation wird durch Plasmide vermittelt, auf denen die zum Transfer notwendigen Gene (*tra*-Gene) lokalisiert sind. Neben dem Selbsttransfer von konjugativen Plasmiden konnte auch der Transfer von chromosomalen Markern durch konjugative Plasmide nachgewiesen werden (Mergeay *et al.*, 1987; Szpirer *et al.*, 1999).

Bakterielle Konjugationssysteme zeigen nicht nur wie im Abschnitt B.1.6.1 beschrieben untereinander Ähnlichkeiten, sondern auch zu Sekretionssystemen von Pathogenen der Pflanzen oder Säugetiere (Christie, 2001) und bilden zusammen mit diesen die Gruppe der Typ IV-Sekretionssysteme.

B.3 Das Typ IV-Sekretionssystem

In Bakterien sind verschiedene Transportsysteme für Makromoleküle bekannt (Linton und Higgins, 1998; Sandkvist, 2001; Plano *et al.*, 2001; Jacob-Dubuisson, 2001).

Die Sekretionssysteme, die evolutionär mit bakteriellen Konjugationssystemen verwandt sind, werden als Typ IV-Sekretionssysteme bezeichnet (Christie und Vogel, 2000; Christie, 2001).

Zu den Typ-IV-Sekretionssystemen gehören u. a. das Vir-System von *Agrobacterium tumefaciens*, das die T-DNA und Effektorproteine (VirD2, VirE2 und VirF) in Pflanzenzellen transferiert, das Ptl-System von *Bordetella pertussis*, welches das Pertussis-Toxin durch die äußere Membran transportiert, das Cag-System von *Helicobacter pylori*, das das CagA Protein in humane Epithelzellen transferiert und das Dot/Icm-System von *Legionella pneumophila*, das noch unbekannte Effektormoleküle durch die äußere Membran transportiert. Konjugative Systeme können sowohl DNA-Protein-Komplexe als auch unabhängig davon nur Proteine in die Rezipienten transferieren. Ein Transport der Primasen TraC von

RP4 (IncP) und Sog von Collb-P9 (IncI1) konnte ebenso gezeigt werden wie der Transfer des chromosomalkodierten Proteins RecA von *E. coli* durch Inc-P Plasmide (Rees und Wilkins, 1990; Heinemann, 1999; Wilkins und Thomas, 2000).

Zu den Substraten, die diese Typ IV-Transportsysteme transferieren können, zählen somit drei Arten von Makromolekülen: DNA-Protein-Komplexe (z. B. T-DNA-Komplex), Proteine (z. B. *Helicobacter pylori* CagA, *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 und VirF) und komplexe Toxine (Pertussis-Toxin PT) (Covacci und Rappuoli, 1993; Vergunst *et al.*, 2000; Christie und Vogel, 2000). Das gemeinsame Merkmal aller Mitglieder des Typ IV-Sekretionssystems ist die Fähigkeit, intrazellulär Proteine zu transportieren. Bei Konjugationssystemen handelt es sich um eine Untergruppe des Typ IV-Sekretionssystems, die zusätzlich die Fähigkeit zum Transport von DNA-Protein Komplexen erworben hat (Christie, 2001).

Vogel *et al.* (1998) konnten eine Mobilisierung von RSF1010 (IncQ) durch das Dot/Icm-Sekretionssystem (*defective for organelle trafficking, intracellular multiplication*) von *L. pneumophila* in einen anderen Legionellen-Stamm und in *E. coli*-Stämme zeigen. Die Art der Effektormoleküle, die von diesem System normalerweise exportiert werden, ist zwar noch nicht bekannt; da sie aber *L. pneumophila* ermöglichen, intrazellulär zu replizieren, scheint es sich nicht um DNA-Moleküle zu handeln. Dies ist das erste Beispiel eines natürlichen Protein-Sekretionssystems, das auch zum konjugativen DNA-Transfer benutzt werden kann.

Weitere Analysen von Konjugationssystemen verschiedener Plasmide und die Analyse von Typ IV-Sekretionssystemen pathogener Bakterienstämme könnten weitere Hinweise zur Verwandtschaft und somit auch zur Evolution dieser Systeme liefern.

Die Analyse von Plasmiden aus Bodenbakterien oder marinen Habitaten hat gezeigt, dass die meisten dieser Plasmide nicht mit Hilfe der Inc-Sonden von Couturier *et al.* (1988) oder den von Götz *et al.* (1996) entwickelten Inc-spezifischen PCR-Primern einer der bekannten Inc-Gruppen zugeordnet werden können (Dahlberg *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 2001; Drønen *et al.*, 1999). Die konjugativen Plasmide einer Inc-Gruppe zeigen Ähnlichkeiten in ihren DNA-Transfersystemen (Zechner *et al.*, 2000). Ob und inwieweit aber diese Konjugationssysteme von Plasmiden aus Umwelthabitaten, die zu bisher unbekanntem Inc-Gruppen gehören, Ähnlichkeiten zu den schon bekannten DNA-Transportsystemen aufweisen, ist kaum untersucht. Eine andere interessante Frage ist, in welchem Ausmaß Konjugationsereignisse in verschiedenen natürlichen Habitaten auftreten.

B.4 Untersuchungen zum Plasmidgehalt und zum Gentransferpotential mikrobieller Gemeinschaften

Eine erste Voraussetzung, um den Genfluss in bakteriellen Gemeinschaften verstehen zu können, sind Informationen über die Abundanz, die Verteilung und die Diversität der Plasmide in den jeweiligen Habitaten. Untersuchungen zum Plasmidgehalt oder zum konjugativen Potential wurden in der Literatur u. a. für marine Habitats, den Boden, der Rhizosphäre und der Phytosphäre beschrieben. Einige Beispiele dafür werden im Abschnitt B.4.3. aufgeführt, doch zunächst wird das Umwelthabitat Boden näher erläutert.

B.4.1 Umwelthabitat Boden

Da es sich bei diesem Umwelthabitat um ein kleinräumig sehr heterogenes dynamisches System handelt, sind die Ergebnisse, die mit spezifischen Bodenproben erzielt wurden, nicht auf alle Bodentypen anwendbar. Viele Parameter beeinflussen die Beschaffenheit des Bodens und somit auch die mikrobiellen Gemeinschaften des Bodens. Hinsichtlich der Bodennutzung werden u. a. Ackerland, Grünland, Wald und Ödland (Heide, Moor) unterschieden. Der Boden wird nach einheitlichen Bodenmerkmalen (z. B. Mineralbestand, Körnung, Humusgehalt) in verschiedene parallel zur Bodenoberfläche verlaufende Horizonte unterteilt. Einige der wichtigsten sind die organischen Horizonte (H, O, L), wobei der H-Horizont (H = Humus) aus organischer Substanz (Torf) besteht. Der L-Horizont (L = litter/Streu) besteht aus einer Ansammlung von nicht oder wenig zersetzter Pflanzensubstanz an der Bodenoberfläche. Der Organische Horizont (O-Horizont) setzt sich aus Humusansammlungen und mehr als 10 Volumenprozenten Feinsubstanz zusammen. Außer der Unterteilung in verschiedene Horizonte erfolgt bei Böden auch eine Einteilung in Bodenarten. Eine Bodenart kennzeichnet die Korngrößenzusammensetzung des mineralischen Bodenmaterials. Man unterscheidet Feinböden (z. B. Sand) und Grobböden (z. B. Grus).

Ein wichtiger Parameter für das Überleben von Mikroorganismen ist die Feldkapazität von Böden, d.h. die Wassermenge, die ein Boden gegen die Schwerkraft zurückhalten kann. In diesem Wasser können Stoffe (z. B. Nitrat) gelöst sein, die der Boden nicht adsorptiv festhalten kann. Ein weiterer Parameter ist die Luftkapazität des Bodens. Darunter versteht man den Porenraum, der bei Feldkapazität mit Luft gefüllt ist.

Böden mit charakteristischen Horizontfolgen und bestimmten Eigenschaften dieser Horizonte werden in Bodentypen zusammengefasst. Bei terrestrischen Böden gibt es z. B. die Klassen der Rohböden (Syrosem, Lockersyrosem), die der Ah-C Böden (Ranker, Regosol, Rendzina)

und die der Braunerden. Außer diesen beschriebenen Unterscheidungsmerkmalen von Böden gibt es noch weitere, die hier nicht aufgeführt wurden. Die Variabilität von Böden ist sehr groß und selbst innerhalb eines bestimmten Bodenhorizontes gibt es große Varianzen. Für Mikroorganismen, die kleinste ökologische Nischen besiedeln, können innerhalb eines Horizontes von einem Kubikzentimeter zum nächsten völlig andere Umweltbedingungen herrschen. Pflanzenwurzeln, die Verteilung der organischen Substanz, pH-Werte, Wassergehalt und Sauerstoffgehalt sind Beispiele für Parameter, die im gleichen Horizont das Überleben von Mikroorganismen und somit auch die Rate von DNA-Transferereignissen beeinflussen. In Laborexperimenten konnten Richaume *et al.* (1989) zeigen, dass in sterilem Boden der Plasmid-Transfer durch den Tongehalt des Bodens, den Anteil organischen Materials, den Wassergehalt, die Temperatur und den pH-Wert des Bodens beeinflusst wird. Aufgrund dieser Heterogenität von Böden sind Ergebnisse über die Zusammensetzung der Mikroflora und die Häufigkeit von konjugativen DNA-Transferereignissen nicht generell auf alle Bodenhabitats anwendbar.

B.4.2 Methoden zur Untersuchung des Plasmidgehaltes und des konjugativen Potentials verschiedener Habitats

Studien über das Ausmaß von HGT in Mikrokosmen sind in vielerlei Hinsicht wichtig. Diese Studien können z. B. Hinweise darüber geben, ob das Einbringen von Inokulaten mit degradativen Genen das biodegradative Potential einer mikrobiologischen Gemeinschaft verbessern könnte ("*bioaugmentation*"). Um die Verhältnisse im Boden zu simulieren, wurden Gentransferexperimente in Mikrokosmen im Labor durchgeführt. Diese Mikrokosmen können variabel gestaltet sein. Dabei werden Bodenproben beispielsweise in Petrischalen, Flaschen, Glasröhrchen oder andere Glasbehältnisse gefüllt und mit den Teststämmen beimpft (Hill und Top, 1998). In diesen Mikrokosmen kann der Einfluss verschiedener Parameter wie Temperatur, Wassergehalt, pH-Wert, Nährstoffgehalt, Schwermetallgehalt, Pflanzenrhizosphäre und Bodenart auf den DNA-Transfer untersucht werden.

Der Plasmidgehalt einer mikrobiellen Gemeinschaft kann mit der endogenen Plasmidisolierungsmethode ermittelt werden. Dazu werden aus Bodenproben (oder Wasserproben, Proben von Pflanzenmaterial etc.) Bakterien isoliert und auf Agarplatten bis zur Reinkultur vereinzelt. Diese Isolate werden dann mit Plasmidisolierungsmethoden auf das Vorhandensein von Plasmiden untersucht. Zur Ermittlung des konjugativen Potentials der plasmidhaltigen Bakterien werden diese mit verschiedenen Rezipienten gekreuzt. Dabei kann entweder der Selbsttransfer der Plasmide (wenn selektionierbare Marker auf dem Plasmid

vorhanden sind) oder die Mobilisierung von IncQ-Plasmiden durch die Plasmide der Bodenprobe untersucht werden. Der Vorteil bei der endogenen Methode ist die Erfassung theoretisch sämtlicher Plasmide der Probe, die Ermittlung der Wirtsbakterien der Plasmide, der Anzahl der Plasmide in einem Bakterium und der Verteilung von gleichen oder ähnlichen Plasmiden in der mikrobiellen Gemeinschaft. Nachteilig an der endogenen Methode sind der große Zeitaufwand und die Beschränkung auf Plasmide kultivierbarer Bakterien.

Eine andere Methode, um konjugative Plasmide aus Umweltproben zu isolieren, ist die exogene Plasmidisolierungsmethode (Bale *et al.*, 1987). Bei dieser Methode wird direkt auf den Plasmidtransfer selektioniert und eine Kultivierung der Donorstämme ist nicht notwendig. Bei einer biparentalen Kreuzung wird ein geeigneter Rezipientenstamm mit einer Bakteriensuspension eines Umwelthabitates vermischt. Der Nachweis des Gentransfers von Resistenzplasmiden oder degradativen Plasmiden der Umweltprobe kann dann auf geeigneten Selektionsmedien erfolgen.

In triparentalen Kreuzungen wird die Bakteriensuspension des Umwelthabitates mit einem Rezipientenstamm und einem Bakterienstamm, der ein mobilisierbares Plasmid enthält, vermischt. Ein Transfer des mobilisierbaren Plasmides in den Rezipientenstamm durch konjugative Plasmide der Umweltprobe kann ebenfalls durch geeignete Selektionsmedien gezeigt werden. In vielen triparentalen Kreuzungen werden IncQ-Plasmide als mobilisierbare Plasmide eingesetzt, da diese durch eine große Anzahl von konjugativen Plasmiden mobilisiert werden können und einen sehr breiten Wirtsbereich, der fast alle Proteobakterien und auch viele Gram-positive Bakterien umfasst, aufweisen (Rawlings und Tietze, 2001). Die Vorteile der exogenen Plasmidisolierung, bei der auf den Plasmidtransfer von Bakterien des Umwelthabitates in ausgewählte Rezipienten selektioniert wird, ist der geringere Zeitaufwand, da keine Reinkulturen der Bakterien aus Umwelthabitaten erforderlich sind und keine aufwendigen Konjugations- oder Mobilisierungsexperimente durchgeführt werden müssen. Mit der exogenen Isolierung können auch konjugative Plasmide nicht kultivierbarer Bakterien isoliert werden. Nachteilig an dieser Methode ist, dass nur ein kleines Spektrum von verschiedenen Plasmiden, vor allem konjugative oder mobilisierbare, detektiert wird. So werden hauptsächlich degradative Plasmide oder Resistenzplasmide isoliert, deren konjugativer Transfer unter Laborbedingungen mit den verwendeten Rezipienten nachweisbar ist. Plasmide ohne erkennbaren Phänotyp werden durch exogene Isolierung kaum detektiert. Außerdem ist unbekannt, aus welcher Bakterienart die exogen isolierten Plasmide stammen.

Neben den Untersuchungen zum Gentransfer im Labor kann auch der Transfer von konjugativen Plasmiden in natürlichen Habitaten untersucht werden. Dazu sind mehrere Ver

suchsansätze möglich; entweder wird nur der Donorstamm mit einem konjugativen/mobilisierbaren Plasmid in das Umwelthabitat gebracht oder sowohl Donor- als auch der Rezipientenstamm (Götz und Smalla, 1997). Um den Transfer von Resistenzplasmiden oder degradativen Plasmiden in einem Umwelthabitat nachzuweisen, wird dort ein Rezipientenstamm eingebracht. Durch eine Selektion auf den Rezipienten und den zu untersuchenden Phänotyp des konjugativen Plasmides aus dem Umwelthabitat kann der DNA-Transfer nachgewiesen werden (Lilley und Bailey, 1997).

B.4.3 Beispiele bisher durchgeführter Studien zur Ermittlung des Plasmidgehaltes und des konjugativen Gentransferpotentials mikrobieller Gemeinschaften

Der Einfluss verschiedener Parameter auf die konjugative Transferrate im Bodenhabitat wurde mit der Hilfe von Mikrokosmen und auf Agarplatten untersucht. In Mikrokosmen konnten Richaume *et al.* (1989) bei einer Temperatur von 28 °C, einem pH-Wert von 7.25, einem Wassergehalt von 8 % und einem Tongehalt von 15 % maximale Plasmid-Transferraten ($1.5\text{-}2.7 \times 10^{-4}$) von pBLK1-2 vom Donor *E. coli* HB101 in *Rhizobium fredii* erreichen.

Ramos-Gonzales *et al.* (1991) haben vergleichende Transferexperimente von drei rekombinanten TOL-Plasmiden aus *Pseudomonas* mit verschiedenen Rezipienten auf Agarplatten und in sterilen Bodenproben durchgeführt. Ein Transfer des TOL-Plasmides in andere *Pseudomonas*-Stämme konnte sowohl auf Agarplatten als auch im Boden nachgewiesen werden. Hingegen konnte die Konjugation des TOL-Plasmides von *Pseudomonas* nach *E. coli* und *Erwinia chrysanthemi* nur in Filterkreuzungen auf Agarplatten beobachtet werden. Ein Vergleich der Konjugationsraten des degradativen Plasmides pJP4 in Filterkreuzungen auf Agarplatten, in sterilem Boden und in nicht sterilem Boden hat gezeigt, dass die Transferraten von 10^{-3} (Kreuzung auf Agarplatten), 10^{-5} (steriler Boden) bis zu 10^{-6} (nicht steriler Boden) variieren (Neilson *et al.*, 1994). Auch für den Transfer des mobilisierbaren Plasmides pDN705 konnten in sterilen Mikrokosmen höhere Transferraten beobachtet werden als in nicht-sterilen (Top *et al.*, 1990). Die Mobilisierungsrate des IncQ-Plasmides pD10 durch Plasmide einer epilithischen mikrobiellen Gemeinschaft variierte in Abhängigkeit der Temperatur (Hill *et al.*, 1992). Smets *et al.* (1993) konnten eine Abhängigkeit der Konjugationsrate des TOL-Plasmides von der Wachstumsrate des Donorstammes zeigen. Der Einfluss von Temperatur, pH-Wert, Kreuzungsdauer, Nährstoffkonzentration und Wahl des Rezipienten auf die Konjugationsraten von Quecksilberresistenzplasmiden einer epilithischen

mikrobiellen Gemeinschaft wurden von Rochelle *et al.* (1989) untersucht. Gentransferexperimente in Mikrokosmen und auf Agarplatten haben verdeutlicht, dass die Transferrate konjugativer Plasmide sowohl von biotischen (z. B. Wachstumsrate des Donors, Rezipient, Nährstoffe) als auch von abiotischen Faktoren (Temperatur, Feuchtigkeit, pH Wert) abhängt (Review: Hill und Top, 1998; Dröge *et al.*, 1999).

Da die Bedingungen, unter denen Gentransferexperimente im Labor durchgeführt werden, nicht unbedingt denen in Umwelthabitaten entsprechen, sind auch Studien über den Gentransfer in natürlichen Habitaten erforderlich. Gentransferexperimente in Feldstudien sind relativ selten. Lilley und Bailey (1997) konnten in einer Feldstudie mit einem genetisch modifizierten *Pseudomonas fluorescens*-Stamm den Transfer von Quecksilberresistenzplasmiden aus der Zuckerrübenmikroflora zeigen. In einer weiteren Feldstudie konnten Götz und Smalla (1997) die Mobilisierung eines IncQ-Plasmides durch Bodenplasmide in gedüngten und in ungedüngten Böden nachweisen.

Eine andere oft verwendete Methode, um konjugative Plasmide in Umwelthabitaten nachzuweisen, ist die exogene Plasmidisolierung (Dröge *et al.*, 1999; Davison, 1999). Über biparentale Kreuzungen konnten konjugative Quecksilberresistenzplasmide aus marinen Habitaten (z. B. Dahlberg *et al.*, 1997), der Phytosphäre von Zuckerrohr (Lilley *et al.*, 1996; Lilley und Bailey, 1997) und des Bodens (Drønen *et al.*, 1999) detektiert werden. Mit Hilfe der triparentalen Kreuzung, bei der IncQ-Plasmide als mobilisierbare Plasmide eingesetzt wurden, konnten konjugative Plasmide aus einer Bakteriengemeinschaft der Rhizosphäre des Weizens (van Elsas *et al.*, 1998), aus einem epilithischen Habitat eines Flusslaufes (Hill *et al.*, 1992) und aus Schlamm- und Bodenproben (Top *et al.*, 1994) isoliert werden.

Da Plasmide bezüglich ihrer Replikation einen spezifischen Wirtsbereich haben und die Transfersysteme der konjugativen Plasmide mit verschiedenen Rezipienten sehr unterschiedliche Transfereffizienzen zeigen, erfolgt bei der exogenen Plasmidisolierung durch die Auswahl des Rezipienten schon eine Vorselektion der isolierbaren konjugativen Plasmide.

So konnten Drønen und Mitarbeiter (1999) zeigen, dass bei der exogenen Isolierung von Quecksilberresistenzplasmiden mit zwei verschiedenen Rezipienten (*E. coli*, einem γ -Proteobakterium, und *Agrobacterium tumefaciens*, einem α -Proteobakterium) ca. 50 % mehr Plasmidtypen detektiert werden als mit nur einem Rezipienten.

Der Gesamtgehalt an Plasmiden in einer bakteriellen Gemeinschaft und der Anteil an konjugativen Plasmiden können mit Hilfe der exogenen Plasmidisolierung nur unzureichend beschrieben werden. Diese Fragestellung kann dagegen durch eine endogene Plasmidisolierung annähernd beantwortet werden. Die endogene Plasmidisolierung ist sehr zeitauf

wendig und erfordert einen großen Stichprobenumfang. In der Literatur sind nur sehr wenige Experimente beschrieben, in denen durch endogene Plasmidisolierung der Plasmidgehalt und das Gentransferpotential untersucht werden. Aus einer mikrobiellen Gemeinschaft auf Zuckerrohrblättern isolierten Powell *et al.* (1993) 435 Bakterienstämme, von denen 18 % (79 Isolate) plasmidhaltig waren. Insgesamt konnten sechs Plasmide mit Transfereigenschaften detektiert werden; drei konjugative Schwermetallresistenzplasmide und drei Plasmide, die ein IncQ-Plasmid mobilisieren konnten. Campbell *et al.* (1995) isolierten 132 fluoreszierende Pseudomonaden aus landwirtschaftlich und industriell genutzten Böden. In den landwirtschaftlichen Bodenproben wurden 3 % plasmidhaltige Isolate (2 von 68 Isolaten) detektiert, in den Industrieböden hingegen 44 % (28 von 64 Isolaten). In triparentalen Kreuzungen sollte das Gentransferpotential dieser Isolate durch die Fähigkeit der Bodenplasmide, ein IncQ-Plasmid zu mobilisieren, bestimmt werden. Es konnte nur für ein Isolat eine Mobilisierung des IncQ-Plasmides nachgewiesen werden. Von 521 Isolaten, die aus der Rhizoplane von Salzsumpfmakrophyten endogen isoliert wurden, enthielten 134 Isolate Plasmide (25 %) (Beeson *et al.*, 2002). Cook *et al.* (2001) konnten in marinen Bodenproben von drei unterschiedlichen Standorten Plasmidabundanzen von 26 % (244 plasmidhaltige Isolate), 23 % (382 plasmidhaltige Isolate) und 10 % (54 plasmidhaltige Isolate) ermitteln. Untersuchungen zum Plasmidgehalt der mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens mit einem ähnlichen Stichprobenumfang wie in der Studie von Cook und Mitarbeitern sind nach Wissen der Autorin in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

B.5 Analyse von Plasmiden und Ermittlung des Gentransferpotentials in einer mikrobiellen Gemeinschaft von Bodenbakterien

Im Rahmen eines BMBF-Projektes mit dem Titel "Diversität und Gentransfer in denitrifizierenden Bakteriengemeinschaften" wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Dreiseikelmann an der Universität Bielefeld das Teilprojekt "Analyse des Gentransferpotentials für Konjugation und Transformation" bearbeitet. Dabei wurden 3055 Bodenisolat auf ihren Plasmidgehalt untersucht. Mit Hilfe der ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) wurden 951 Isolate verwandtschaftlich eingruppiert (Lin, 1998). Das Gentransferpotential für Konjugation sollte mit Hilfe von degenerierten PCR-Primern ermittelt werden. Proteinalignments von Transferproteinen konjugativer Plasmide haben gezeigt, dass auf Aminosäureebene zum Teil große Übereinstimmungen zwischen den einzelnen Proteinen bestehen (z. B. Kado, 1994; Alt-Mörbe *et al.*, 1996). Auf Nukleotidebene sind die

Übereinstimmungen nicht so stark ausgeprägt, die größten Ähnlichkeiten findet man dort bei *traG*- und *trbB*-homologen Genen. Bei den bisher bekannten *traG*-ähnlichen Genen handelt es sich um essentielle Transfergene, deren Genprodukte als *coupling*-Proteine bezeichnet werden, da sie zwischen dem Relaxosom und dem DNA-Translokationskomplex in der Membran eine verbindende Funktion ausüben (Cabezón *et al.*, 1997; Gomis-Rüth *et al.*, 2002). Die Bindung der TraG-Proteine an Proteine des Relaxosoms konnte für einige Konjugationssysteme gezeigt werden (Disqué-Kochem und Dreiseikelmann, 1997; Szpirer *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2002).

Die TrbB-ähnlichen Proteine gehören zur Gruppe der VirB11-homologen Proteine, die ebenfalls zu den essentiellen Transferproteinen gehören und vermutlich Energielieferanten für den Zusammenbau der Transportpore sind (Krause *et al.*, 2000b; Cao und Saier, 2001).

Zu Beginn des Projektes waren kaum Sequenzdaten von *traG*- und *trbB*-ähnlichen Genen konjugativer Bodenplasmide vorhanden. Zum Design degenerierter *trbB*- bzw. *traG*-PCR-Primerpaare wurden u. a. Sequenzdaten der folgenden Plasmide herangezogen (Details zum Design der Primer: siehe Disqué-Kochem *et al.*, 2001): RP4 (IncP α), R388 (IncW), pTi (IncRh1), pKM101 (IncN) und pSK41 (aus *Staphylococcus aureus*). Zur Amplifikation von *traG*-ähnlichen Genen wurden die Primerpaare G-41/G-6 und G-413/G-6 eingesetzt. Mit dem Primerpaar B-1/B-2 sollten *trbB*-homologe Gene detektiert werden. Da diese Primer jedoch nicht für IncN-Plasmide geeignet waren, wurden zusätzlich die Primer B-11/B-31 entwickelt (Disqué-Kochem *et al.*, 2001).

Zur Erprobung der Primer wurden die beim Design berücksichtigten Plasmide als Ziel-DNA eingesetzt. In jedem Fall gab es ein Amplifikat der erwarteten Größe. Durch Restriktionsanalysen und Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass tatsächlich die *traG*- bzw. *trbB*-homologen Gene amplifiziert wurden. Die Primer wurden mit weiteren konjugativen Plasmiden [F (IncFI), R124 (IncFIV), R478 (IncHI2), R702 (IncP α), pJP4 (IncP β), R6K (IncX)] getestet und auch hier konnte u. a. durch Sequenzierung gezeigt werden, dass Transfergene amplifiziert wurden (Disqué-Kochem *et al.*, 2001).

Alle plasmidhaltigen Bodenisolat wurden anschließend mit diesen *trbB*- und *traG*-PCR-Primern getestet. In einigen Fällen gab es ein Amplifikat der erwarteten Größe, in vielen Fällen wurden jedoch mehrere PCR-Produkte oder gar kein Amplifikat beobachtet. Die partielle Sequenzierung einiger Amplifikate hat gezeigt, dass in keinem Fall *trbB*- oder *traG*-homologe Gene amplifiziert wurden. Für diese negativen Ergebnisse gibt es folgende Erklärungen: 1. die Plasmide aus Bodenbakterien besitzen keine *trbB*- oder *traG*-homologen Gene oder 2. die Plasmide aus Bodenbakterien sind nur entfernt verwandt zu den zur

Primerauswahl herangezogenen Plasmiden und verwenden eventuell eine andere "Codon-usage" als die Plasmide der Inc-Gruppen P, W und N aus *Enterobacteriaceen*, von denen die *trbB/traG*-Primer abgeleitet wurden, so dass aufgrund der Primerauswahl keine Amplifikate erhalten werden.

Die Sequenzen von *trbB*- und *traG*-homologen Genen von Plasmiden aus Bodenisolaten wie z. B. die von pWW0 (Acc.-Nummer NC_003350), pXAC64 (Acc.-Nummer NC_003922), pBI1063 (diese Arbeit) und pBI709 (diese Arbeit) haben gezeigt, dass diese Gene auf DNA-Ebene nicht so stark konserviert sind, um sowohl spezifische als auch universelle PCR-Primer zur Amplifizierung einsetzen zu können.

B.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Abundanz, die Diversität und die Verteilung von Plasmiden in Bodenisolaten und deren konjugatives Potential sind nahezu unbekannt. Sequenzdaten von Transferregionen konjugativer Bodenplasmide sind ebenfalls nur vereinzelt bekannt. Diese Aspekte sollten in dem BMBF-Teilprojekt "Analyse des Gentransferpotentials für Konjugation und Transformation", in das auch die vorliegende Dissertation eingegliedert war, näher untersucht werden.

Bestandteil der vorliegenden Arbeit war zunächst die molekulare und phänotypische Charakterisierung der Plasmide Gram-negativer Bodenisolate. Es war vorgesehen, mittels PCR und Hybridisierungen die Plasmide auf ihre Zugehörigkeit zu bekannten Inc-Gruppen zu analysieren. Um vergleichende Restriktionsanalysen der Plasmide durchführen zu können, sollten Plasmidisolierungsmethoden für verschiedene Bakteriengattungen etabliert werden.

Bei der Analyse der Plasmide stand vor allem die Identifizierung von Transfergenen im Vordergrund. Es war geplant, das konjugative Potential der Bodenplasmide mit Hilfe der *trbB/traG*-PCR-Primer zu ermitteln. Die PCR-Experimente wurden größtenteils von Dr. Disqué-Kochem durchgeführt. Die Plasmide, die ein Amplifikat mit den PCR-Primern ergaben, sollten dann im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Transfereigenschaften untersucht werden.

Erste Sequenzierungen von Transfergenen dieser Plasmide sollten über eine direkte Sequenzierung der *trbB/traG*-Amplifikate erfolgen. Es war vorgesehen, durch Hybridisierung dieser PCR-Produkte gegen gespaltene Plasmid-DNA die Transferregionen auf den Plasmiden zu lokalisieren, um dann anschließend die komplette Transferregion über Sequenzierung zu charakterisieren. Wie sich herausstellte, handelte es sich jedoch bei den

erhaltenen Amplifikaten nicht um *trbB*- oder *traG*-homologe Sequenzen. Da es keinen Anhaltspunkt gab, welche Plasmide Gentransferpotential besaßen, konnte für die Konjugations- und Mobilisierungsexperimente keine Vorauswahl getroffen werden.

Die Transferregionen von Plasmiden aus Bodenbakterien konnten mit molekularbiologischen Methoden (Hybridisierung, PCR) auf diesen Plasmiden nicht lokalisiert werden, so dass eine Identifizierung von Transfergenen nur über die Sequenzierung klonierter Restriktionsfragmente dieser Plasmide möglich war.

Die Antibiotika- und Schwermetallresistenzanalysen aller Plasmide waren ebenso Bestandteil der phänotypischen Charakterisierung wie die Analyse der Konjugations- und Mobilisierungsfähigkeit und des Wirtsspektrums einiger Plasmide. Während in der Literatur in vielen Fällen nur Antibiotika- und/oder Schwermetallresistenzplasmide auf ihre Konjugationsfähigkeit getestet wurden, war vorgesehen, in der vorliegenden Dissertation auch Plasmide ohne selektionierbaren Marker hinsichtlich ihres Transferpotentials zu untersuchen. Durch Antibiotika-resistente Transposonmutanten dieser Plasmide ergab sich die Möglichkeit, diese Plasmide mit verschiedenen Rezipienten auf ihre Selbsttransfer-eigenschaften zu testen. Neben der Konjugation sollte auch die Mobilisierung eines RSF1010-Derivates durch die Plasmide aus Bodenisolaten mit verschiedenen Rezipienten untersucht werden.

Diese Arbeit sollte dazu beitragen, einen kleinen Einblick in die Abundanz, die Diversität und die Verteilung von Plasmiden in einer mikrobiellen Gemeinschaft von Bodenbakterien zu bekommen. Das konjugative Potential der plasmidhaltigen Bodenisolate sollte durch die Konjugations- und Mobilisierungsexperimente verdeutlicht werden. Die Sequenzierung von Transfergenen der Plasmide aus Bodenisolaten kann weitere Hinweise zur Evolution von Typ IV-Sekretionssystemen liefern.

C. MATERIAL UND METHODEN

C.1 Material

C.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
<i>E. coli</i> C600	F ⁻ e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 supE44 rfbD1 fhuA21</i>	Bachmann, 1987
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F ['] :: Tn10 <i>proA⁺ B⁺ laqI^q Δ(lacZ) M15 /recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_K⁻ m_K⁻) supE44 relA1 lac</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> S17-1	RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> S17-1 λ <i>pir</i>		De Lorenzo <i>et al.</i> , 1993
<i>E. coli</i> EC294	<i>res⁻, mod⁺, hsdR, pro⁻, endA, thi</i>	Stammsammlung B. Dreiseikelmann
<i>Pseudomonas putida</i> PaW340		DSM 2112
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		Stammsammlung A. Pühler
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		Stammsammlung W. Wackernagel
<i>Pseudomonas</i> KT2440	<i>hsdR1, hsdM⁺</i>	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981
<i>Paracoccus aminophilus</i>		DSM 8538
<i>Pseudomonas putida</i> PpG 2100 SAL		DSM 4476
Bi709		Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001
Bi860		Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001
Bi113		Stammsammlung B. Dreiseikelmann
Bi1063		Stammsammlung B. Dreiseikelmann

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
Ki173		Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001
Ki202		Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001
Ki239		Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001
Ol18		Stammsammlung B. Dreiseikelmann
Bi809		Stammsammlung B. Dreiseikelmann
Bi850		Stammsammlung B. Dreiseikelmann
Bi903		Stammsammlung B. Dreiseikelmann
Bi747		Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001
Bi1062		Stammsammlung B. Dreiseikelmann
Bi1696		Stammsammlung B. Dreiseikelmann

C.1.2 Plasmide

Plasmid	Genotyp/Phänotyp	Referenz
Klonierungsvektoren		
pUC13	Ap ^r , <i>lacZ</i> α	Vieira und Messing, 1982
pUC18	Ap ^r , <i>lacZ</i> α	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pGemTEasy	Ap ^r , <i>lacZ</i> α	Promega
pDrive	Ap ^r , Km ^r , <i>lacZ</i> α	Qiagen
Suicidevektor mit Mini Tn5		
pAG408	Ap ^r , <i>gfp</i> , <i>aphA-3</i> , Gm ^r	Suarez <i>et al.</i> , 1997
RSF1010 Derivat		
pSunny	Sm ^r , Km ^r , <i>gfp</i>	Güttler, 1998
Plasmide aus Bodenisolaten		
pBI709	endogenes 60 kb Plasmid aus Bi709	Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001
pBI860	endogenes 70 kb Plasmid aus Bi860	Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001
pKI173	endogenes 105 kb Plasmid aus Ki173	Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001
pKI239	endogenes 42 kb Plasmid aus Ki239	Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001

Plasmid	Genotyp	Referenz
Plasmide aus Bodenisolaten		
pKI202	endogenes 130 kb Plasmid aus Ki 202	Disqué-Kochem <i>et al.</i> , 2001
pBI113	endogenes 48 kb Plasmid aus Bi113	diese Arbeit
pOL1820	endogenes 20 kb Plasmid aus OI18	diese Arbeit
pBI1063	endogenes 68 kb Plasmid aus Bi1063	diese Arbeit
pBI860.105	pBI860:: Mini Tn5 aus pAG408	diese Arbeit
Hybridplasmide		
von pBI709		
pE1	pUC13:: 6.5 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pE10	pUC13:: 10 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pE9-4	pUC13:: 1.6 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pS6	pUC18:: 5.8 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pS3	pUC18:: 3.2 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pS15	pUC18:: 3.1 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pS13	pUC18:: 1.7 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pS23	pUC18:: 4.2 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pS18	pUC18:: 2.0 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pH6-9	pUC13:: 4.9 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pH1	pUC13:: 11.5 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pH3	pUC13:: 11.5 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pH6-10	pUC13:: 3.8 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pH3-6	pUC13:: 0.9 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pP31	pUC13:: 18 kb <i>PstI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pPN31	pUC13:: 1.8 kb <i>NruI</i> - Fragment aus pP31	diese Arbeit
pP28	pUC13:: 8.0 kb <i>PstI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pP36	pUC13:: 1.4 kb <i>PstI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pPST52	pUC13:: 1.5 kb <i>PstI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pPST26	pUC13:: 1.3 kb <i>PstI</i> -Fragment aus pBI709	diese Arbeit
pE10B1	pUC13:: 1.0 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus pE10	diese Arbeit
von pBI1063		
p1063H2	pUC13:: 1.2 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063H5	pUC13:: 10 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063H7	pUC13:: 3.1 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063H8	pUC13:: 5.7 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063H10	pUC13:: 3.1 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063H11	pUC13:: 2.4 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063H18	pUC13:: 4.7 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063H31	pUC13:: 10 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063H44	pUC13:: 2.9 kb <i>HindIII</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063E18	pUC13:: 5.0 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063S2	pUC18:: 2.6 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063S3	pUC18:: 5.3 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063S20	pUC18:: 0.7 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063S15	pUC18:: 1.5 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit
p1063S21	pUC18:: 1.0 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pBI1063	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
von pBI860		
p860H2	pUC13:: 1.6 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pBI860	diese Arbeit
p860H11	pUC13:: 2.1 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pBI860	diese Arbeit
p860H13	pUC13:: 2.5 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pBI860	diese Arbeit
pP1610	pUC13:: 10 kb <i>Pst</i> I-Fragment aus pBI860	diese Arbeit
pSPH105	pUC18:: 7.0 kb <i>Sph</i> I-Fragment aus pBI860.105	diese Arbeit
pPST105	pUC18:: 9.0 kb <i>Pst</i> I-Fragment aus pBI860.105	diese Arbeit
von pKI202		
p202H3	pUC13:: 6.5 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI202	diese Arbeit
p202H5	pUC13:: 2.3 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI202	diese Arbeit
p202H8	pUC13:: 2.2 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI202	diese Arbeit
p202H10	pUC13:: 10 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI202	diese Arbeit
p202H15	pUC13:: 3.0 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI202	diese Arbeit
p202E7	pUC13:: 8.1 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus pKI202	diese Arbeit
p202E10	pUC13:: 2.0 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus pKI202	diese Arbeit
p202E13	pUC13:: 8.0 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus pKI202	diese Arbeit
p202E16	pUC13:: 3.6 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus pKI202	diese Arbeit
Hybridplasmide von pOL1820		
p18E2	pUC13:: 1.4 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus pOL1820	diese Arbeit
p18E7	pUC13:: 1.6 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus pOL1820	diese Arbeit
p18E10	pUC13:: 1.4 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus pOL1820	diese Arbeit
p18E13	pUC13:: 2.6 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus pOL1820	diese Arbeit
p18H2	pUC13:: 10 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pOL1820	diese Arbeit
p18H7	pUC13:: 2.7 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pOL1820	diese Arbeit
p18H11	pUC13:: 1.6 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pOL1820	diese Arbeit
p18H19	pUC13:: 0.9 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pOL1820	diese Arbeit
p18H26	pUC13:: 0.5 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pOL1820	diese Arbeit
p18H29	pUC13:: 2.1 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pOL1820	diese Arbeit
von pKI173		
p173H2	pUC13:: 7.0 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H4	pUC13:: 2.6 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H5	pUC13:: 0.9 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H7	pUC13:: 3.3 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H8	pUC13:: 5.0 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H9	pUC13:: 8.0 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H13	pUC13:: 2.6 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H16	pUC13:: 3.2 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H19	pUC13:: 10 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H28	pUC13:: 2.9 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H29	pUC13:: 1.3 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H33	pUC13:: 1.2 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H37	pUC13:: 7.1 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H39	pUC13:: 0.8 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit
p173H45	pUC13:: 1.6 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus pKI173	diese Arbeit

MATERIAL & METHODEN

<u>Tris-Minimalmedium</u>	2 g	Natrium-Glukonat
	6.06 g	Tris Hydrochlorid, pH 7.0
	4.68 g	NaCl
	1.49 g	KCl
	1.07 g	NH ₄ Cl
	0.43 g	Na ₂ SO ₄
	0.20 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	0.03 g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	0.23 g	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O
	0.005 g	Eisen(III)-Ammonium-Citrat
	1 ml	Spurenelementlösung SL7

Tris-Minimalmedium Agar

Tris-Minimalmedium mit 15 g/l Agar

X-Gal Platten

10 µl	100 mM IPTG
50 µl	2 % X-Gal in DMF (w/v) auf TBY-Platten ausspateln

Zugabe von Antibiotika

Endkonzentration

Ampicillin	150 µg/ml
Kanamycin	60 µg/ml
	30 µg/ml
Gentamicin	10 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Rifampicin	100 µg/ml
Chloramphenicol	50 µg/ml
Nalidixinsäure	50 µg/ml
Tetracyclin	15 µg/ml

Zugabe von Schwermetallen

Endkonzentration

NiCl ₂	0.6 mM
CoCl ₂	0.6 mM
ZnCl ₂	1.0 mM
CdCl ₂	0.8 mM

Spurenelementlösung SL7 (Biebl und Pfennig, 1981)

70 mg	ZnCl ₂
100 mg	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
60 mg	H ₃ BO ₃
200 mg	CoCl ₂ x 6 H ₂ O
20 mg	CuCl ₂ x 2 H ₂ O
20 mg	NiCl ₂ x 6 H ₂ O
40 mg	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
1 ml	25 % HCl
1 l	Millipore

C.1.4 Puffer und Lösungen

C.1.4.1 Puffer, allgemein

<u>TA-Puffer</u>	40	mM	Tris-Acetat	pH 7.8
	10	mM	Na-Acetat	
	1	mM	EDTA	
<u>TE-Puffer</u>	10	mM	Tris-HCl	pH 7.5
	1	mM	EDTA	
<u>TES-Puffer</u>	199	mM	Tris-HCl	pH 7.5
	50	mM	NaCl	
	5	mM	EDTA	
<u>BPB-Ladepuffer (10x)</u>	70	%	Sucrose (w/v)	pH 8.0
	0.24	%	BPB (w/v)	
	1	mM	EDTA	
<u>PBS</u>	140	mM	NaCl	
	3	mM	KCl	
	8	mM	Na ₂ HPO ₄	
	2	mM	KH ₂ PO ₄	
<u>Elutionspuffer für DEAE-Membran</u>	1	M	NaCl	pH 8.0
	0.05	M	Arginin	
	0.01	M	EDTA	

C.1.4.2 Lösungen für die Plasmidisolierung

<u>Mix I</u>	50	mM	Glukose	pH 7.5
	10	mM	EDTA	
	25	mM	Tris-HCl	
	2	mg/ml	Lysozym (frisch ansetzen)	
<u>Mix II</u>	0.2	N	NaOH	SDS (w/v) (frisch ansetzen)
	1	%		
<u>Triton-Lytic-Mix</u>	50	mM	Tris-HCl	pH 7.5
	50	mM	EDTA	
	1	%	Triton X-100	
<u>CsCl-gesättigtes Isopropanol</u>	37	g	CsCl gelöst in 41 ml TE	
	100	ml	Isopropanol	
<u>K-P 1</u>	50	mM	Tris-HCl	pH 8.0
	10	mM	EDTA	
	100	µg/ml	RNase A	

MATERIAL & METHODEN

<u>K-P 2</u>	0.2 1	N %	NaOH SDS	
<u>K-P 3</u>	2.55	mM	K-Acetat	pH 4.8
<u>P-1</u>	50 10	mM mM	Tris-HCl EDTA	pH 8.0
<u>P-2</u>	100 1	mM %	NaOH SDS (w/v)	
<u>P-3</u>	2.55	mM	K-Acetat	pH 4.8
<u>QBT</u>	750 50 15 0.15	mM mM % %	NaCl MOPS Ethanol (v/v) Triton X-100	pH 7.0
<u>QC</u>	1000 50 15	mM mM %	NaCl MOPS Ethanol (v/v)	pH 7.0
<u>QF</u>	1250 50 15	mM mM %	NaCl MOPS Ethanol (v/v)	pH 8.2
<u>Waschlsg.</u>	50 50 20	mM mM mM	Tris-HCl NaCl EDTA	pH 7.5
<u>Ramos Lsg. 1</u>	25 25 20 1	mM mM % mg/ml	Tris-HCl EDTA Sucrose (w/v) Lysozym (frisch ansetzen)	pH 8.0
<u>Ramos Lsg. 2</u>	0.3 2	N %	NaOH SDS (w/v) (frisch ansetzen)	
<u>Kirby-Mix</u>	88 12 0.1 100	ml ml g ml	Phenol Kresol Hydroxyquinolin 100 mM Tris-HCl	pH 8.0
<u>AK I</u>	6.7 1 50 10	% mM mM mg/ml	Sucrose EDTA Tris-HCl Lysozym (frisch ansetzen)	pH 8.0

C.1.4.3 Puffer für Enzymreaktionen

C.1.4.3.1 Puffer für Restriktionsenzyme

<u>NEB-Puffer 1</u>	10	mM	Bis-Tris-Propan HCl	pH 7.0
	10	mM	MgCl ₂	
	1	mM	DTT	
<u>NEB-Puffer 2</u>	10	mM	Tris-HCl	pH 7.9
	10	mM	MgCl ₂	
	50	mM	NaCl	
	1	mM	DTT	
<u>NEB-Puffer 3</u>	50	mM	Tris-HCl	pH 7.9
	10	mM	MgCl ₂	
	100	mM	NaCl	
	1	mM	DTT	
<u>NEB-Puffer 4</u>	20	mM	Tris-HCl	pH 7.9
	10	mM	Mg-Acetat	
	50	mM	K-Acetat	
	1	mM	DTT	
<u>NEB-Puffer <i>Eco</i>RI</u>	100	mM	Tris-HCl	pH 7.5
	10	mM	MgCl ₂	
	50	mM	NaCl	
	0.025	%	Triton X-100	
<u>Ligationspuffer</u>	50	mM	Tris-HCl	pH 7.5
	10	mM	MgCl ₂	
	10	mM	DTT	
	1	mM	ATP	
	25	µg/ml	BSA	
<u>C.1.4.3.2 PCR-Puffer</u>				
<u><i>Taq</i> DNA-Pol.-Puffer Y</u>	200	mM	Tris-HCl	pH 8.55
	160	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	
	20	mM	MgCl ₂	
<u><i>Taq</i> DNA-Pol.-Puffer AGS</u>	200	mM	Tris-HCl	pH 8.55
	160	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	
<u>Vent DNA-Pol.-Puffer</u>	20	mM	Tris-HCl	pH 8.8
	10	mM	KCl	
	10	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	
	2	mM	MgSO ₄	
	0.1	%	Triton X-100	

MATERIAL & METHODEN

<u>Pfu DNA-Pol.-Puffer</u>	20	mM	Tris-HCl	pH 8.8
	10	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	
	10	mM	KCl	
	2	mM	MgSO ₄	
	1	mg/ml	BSA	
	1	%	Triton X-100	

<u>dNTP-Mix</u>	2	mM	dATP
	2	mM	dCTP
	2	mM	dGTP
	2	mM	dTTP

C.1.4.3.3 Puffer und Lösungen für die Nicktranslation

<u>NT-Puffer</u>	50	mM	Tris-HCl	pH 7.2
	10	mM	MgSO ₄	
	0.1	mM	DTT	

<u>DNaseI Stammlsg.</u>	1	mg/ml	DNaseI in 0.15 M NaCl + 50 % Glycerin	
-------------------------	---	-------	---------------------------------------	--

Gebrauchslsg. Stammlsg. mit eiskaltem 1 x NT Puffer und 50 % Glycerin bis zu einer Konzentration von 10⁻⁴ verdünnen

<u>Dig-dNTP-Mix</u>	1	mM	dATP
	1	mM	dCTP
	1	mM	dGTP
	0.65	mM	dTTP
	0.35	mM	Dig-11-dUTP

C.1.4.4 Lösungen und Puffer für die Southernhybridisierung

<u>Depurinierungslsg.</u>	0.25	N	HCl
---------------------------	------	---	-----

<u>Denaturierungslsg.</u>	1.5	M	NaCl
	0.5	N	NaOH

<u>Neutralisierungslsg.</u>	1	M	Tris-HCl	pH 5.0
	2	M	NaCl	

<u>20 x SSC</u>	174	g	NaCl	pH 7.0
	88.2	g	Na-Citrat	

<u>Hybridisierungspuffer</u>	5	x	SSC
	0.1	%	N-Laurylsarkosin (v/v)
	0.02	%	SDS (w/v)
	2	%	Blocking Reagenz

MATERIAL & METHODEN

<u>Waschpuffer 1</u>	2	x	SSC	
	0.1	%	SDS (w/v)	
<u>Waschpuffer 2</u>	0.1	x	SSC	
	0.1	%	SDS (w/v)	
<u>Maleinsäurepuffer</u>	100	mM	Maleinsäure	pH 7.5
	150	mM	NaCl	
<u>Dig-Puffer 2</u>	1	%	Blocking Reagenz in Maleinsäurepuffer	
<u>Dig-Puffer 3</u>	100	mM	Tris-HCl	pH 9.5
	100	mM	NaCl	
	50	mM	MgCl ₂	
<u>Antikörperlsg.</u>	1	µl	Anti-Dig-AP Konjugat in 10 ml Puffer 2	
<u>Detektionslsg.</u>	100	µl	NBT/BCIP Stammlsg. in 50 ml Puffer 3	

C.1.5 Bezugsquellen für Chemikalien und Verbrauchsmittel

Bezugsquelle	Chemikalien und Verbrauchsmittel
Beckman Coulter	Quick-Seal Röhrchen
Biozym	Agarose
Fermentas	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase
GibcoBRL	Agar, Hefeextrakt, Trypton
Hybaid-AGS	<i>Taq</i> DNA-Polymerase Puffer
ICN	CsCl
Millipore	Amicon Microcon-PCR centrifugal filter devices
New England Biolabs	Restriktionsendonukleasen, T4 DNA-Ligase, Vent DNA-Polymerase
Oxoid	Antibiotikatestplättchen
peqlab	<i>Taq</i> DNA-Polymerase, dNTP-Stammlsg., peqGOLD Leiter-Mix
Qiagen	Qiagen MinElute Gel Extraktion Kit, QIAprep Miniprep Kit, Qiagen PCR Cloning Kit
Roche	Dig DNA Labeling and Detection Kit, Dig-11-dUTP, High pure PCR template preparation kit, DNA Längenstandard III Digoxigenin-markiert, NBT/BCIP Stammlsg.
Roth	Ampicillin, Tween 80, Maleinsäure, RNaseA
Sartorius	Cellulose-Nitrat-Filter, 0.45 µm
Serva	Streptomycin, N-Laurylsarkosin
Sigma	Lysozym, Rifampicin, Chloramphenicol, Kanamycin, Tetracyclin, Nalidixinsäure, Gentamicin
Schleicher & Schuell	S & S Nytran N Membran, DEAE-Membran

C.1.6 Geräte

Zentrifugen	Heraeus-Hermle Biofuge Heraeus Biofuge Pico Optima LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Kühlzentrifugen: centricon T-324 und H-401
Rotoren	A 8.24, A 6.9, VTi 50, VTi 65.2 (Kontron)
PCR-Geräte	Mini Cyclor (MJ Research) RoboCycler Gradient 96 (Stratagene)
Vakuumblotter	VacuGene Pump (LKB Pharmacia)

C.2 Methoden

C.2.1 Plasmidisolierungen

Die Plasmidisolierung nach Ramos-Gonzales ist eine schnelle und einfache Methode, die Bodenisolat auf das Vorhandensein von Plasmiden zu überprüfen. Selbst Plasmide, die größer als 100 kb sind, können mit dieser Methode erfasst werden.

C.2.1.1 Plasmidisolierung nach Ramos-Gonzales (Ramos-Gonzales *et al.*, 1991)

- 0.5 ml Übernachtskultur 3 min zentrifugieren, 13000 rpm Biofuge
- Pellet in 0.2 ml Ramos Lsg. 1 resuspendieren
- add 0.1 ml Ramos Lsg. 2, vorsichtig invertieren
- zur Minimierung der chromosomalen DNA 5 min bei 55 °C inkubieren
- Phenolextraktion: add 0.3 ml Kirby Mix, vorsichtig mischen, 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren und die wässrige Phase abziehen
- 20-50 µl der wässrigen Phase zur Analyse auf ein Agarosegel auftragen

Plasmid-DNA, die mit dieser Methode isoliert wurde, war für Restriktionsexperimente nicht geeignet. Zur Isolierung von reiner Plasmid-DNA musste auf andere Methoden zurückgegriffen werden. Mit den Bodenisolaten konnten mit den von verschiedenen Firmen angebotenen Kits zur Plasmidisolierung keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Deshalb wurden Plasmide, die größer als 80 kb waren, mit der Triton-Lyse isoliert. Für Plasmide, deren Größe zwischen 15 kb und 80 kb lag, wurde die Birnboim & Doly Isolierungsmethode angewendet.

C.2.1.2 Triton-Lyse (für einkopiezahlige Plasmide) (modifiziert)

- 1 l Übernachtskultur 10 min bei 6500 rpm zentrifugieren, 4 °C, Rotor A 6.9
- das Pellet in 8 ml TES + 25 % Sucrose resuspendieren
- add 2 ml Lysozym (10 mg/ml)
- add 4 ml EDTA (250 mM)
- 20 min bei 0 °C inkubieren
- add 14 ml Triton-Lytic-Mix, warten bis die Lsg. viskös wird, dann sofort
- 45 min bei 16000 rpm zentrifugieren, 4 °C, Rotor A 8.24

- Überstand abgießen und evtl. mit TE-Puffer auf 32 ml Gesamtvolumen auffüllen
- 32 g CsCl zugeben und vorsichtig lösen
- add 2 ml Ethidiumbromidlsg. (5 mg/ml)
- die Lsg. auf zwei Corexröhrchen verteilen und 1 h bei 10000 rpm zentrifugieren, 15 °C, Rotor A 8.24
- die Überstände in ein Quick-Seal Röhrchen füllen und dieses zuschweißen
- über Nacht in der Ultrazentrifuge bei 40000 rpm zentrifugieren, 15 °C, Rotor VTi 50
- mit einer Spritze unter UV-Licht die untere DNA-Bande (ccc Plasmid-DNA) aus dem Röhrchen abziehen (ca. 4 ml Lsg abziehen) und in ein kleines Quick-Seal Röhrchen überführen, zuschweißen und
- über Nacht bei 50000 rpm und 15 °C erneut in der Ultrazentrifuge zentrifugieren, Rotor VTi 65.2
- die untere DNA-Bande unter UV-Licht abziehen
- Extraktion des Ethidiumbromids mit CsCl-gesättigtem Isopropanol
- Dialyse 2 x 1 h gegen TE-Puffer bei Raumtemperatur

C.2.1.2.1 Modifizierungen der Triton-Lyse

für die Bodenisolat Ki173, Ki169 und Ki202:

- es wurden nur 500 ml Übernachtskultur verwendet
- Konzentration der Lysozymlsg. 0.25 mg/ml
- 100 mM EDTA
- die Inkubation bei 0 °C wurde auf 10 min verkürzt

für die Bodenisolat Ki163a und Ki163b:

- Konzentration der Lysozymlsg. 3 mg/ml

für die Paracoccen-Bodenisolat der ARDRA-Gruppe 57

- Zellpellet in 20 ml Waschlsg. aufnehmen, erneute Zentrifugation bei 6500 rpm
- Konzentration der Lysozymlsg. 1 mg/ml

für die Bodenisolat Bi251, Bi1418, Bi1436, Bi1506 und Bi1508:

- es wurden 2 l Übernachtskultur verwendet
- Konzentration der Lysozymlsg 0.25 mg/ml
- 30 mM EDTA
- nach Zugabe des Triton-Lytic-Mix 1 h bei 19000 rpm zentrifugieren, A 8.24

für das Bodenisolat Bi569:

- Konzentration der Lysozymlsg. 0.25 mg/ml

für das Bodenisolat Bi1363:

- Konzentration der Lysozymlsg. 2 mg/ml
- 125 mM EDTA

C.2.1.3 Plasmidisolierung nach Birnboim & Doly 1979 (modifiziert)

- 40 ml Übernachtskultur 10 min bei 6500 rpm zentrifugieren, 4 °C, Rotor A 8.24
- das Pellet in 8 ml Mix I resuspendieren
- 30 min bei 0 °C inkubieren
- add 16 ml Mix II
- 10 min bei Raumtemperatur inkubieren

- add 12 ml Na-Acetat, pH 4.8
- mindestens 30 min 0 °C
- 30 min bei 20000 rpm zentrifugieren, 4 °C, Rotor A 8.24
- den Überstand auf zwei 40 ml Zentrifugenröhrchen verteilen
- add 18 ml Isopropanol pro Röhrchen
- 20 min bei – 70 °C
- Zentrifugation bei 20000 rpm, 20 min, 4 °C, Rotor A 8.24
- die Pellets gut trocknen lassen und beide in insgesamt 4.1 ml TE-Puffer vorsichtig lösen
- add 4.2 g CsCl und 300 µl Ethidiumbromidlsg. (5 mg/ml)
- 30 min bei 20000 rpm zentrifugieren, 15 °C, Rotor A 8.24
- den Überstand in ein Quick-Seal Röhrchen füllen und dieses zuschweißen
- über Nacht Zentrifugation bei 50000 rpm in der Ultrazentrifuge, 15 °C, Rotor VTi 65.2
- unter UV-Licht die untere DNA- Bande abziehen
- Extraktion des Ethidiumbromids mit CsCl-gesättigtem Isopropanol
- Dialyse 2 x 1 h gegen TE-Puffer

Zur Isolierung von Plasmiden bis 20 kb aus *E. coli* Stämmen für die Sequenzierung wurden das QIAGEN Plasmid Mini Kit und das Qiaprep Miniprep Kit verwendet.

C.2.1.4 Plasmidisolierung mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit

- Bakterienzellen von einer Festmediumplatte abkratzen und in 500 µl P-1 (RNase) resuspendieren
- 500 µl P-2 zugeben und sechsmal invertieren und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 500 µl P-3 zugeben und sofort sechsmal invertieren
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Qiagen Tip-20 Säule zweimal mit 2 ml QBT equilibrieren
- den Zentrifugationsüberstand auf die Säule geben
- zweimal mit QC waschen
- die DNA mit 0.8 ml QF eluieren
- das Eluat mit 0.7 ml Isopropanol mischen und 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- den Überstand abziehen und das Pellet mit 0.5 ml 70 % Ethanol waschen und 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- den Überstand quantitativ anziehen und das Pellet 5 min bei Raumtemperatur trocknen
- das Pellet in 20 µl H₂O lösen und bei 4 °C lagern

C.2.1.5 Plasmidisolierung mit dem Qiaprep Miniprep Kit

- 1-5 ml Übernachtskultur 5 min bei 6500 rpm zentrifugieren
- das Pellet in 250 µl P-1 resuspendieren
- Zugabe von 250 µl P-2 und sechsmal invertieren
- Zugabe von 350 µl N-3 und sechsmal invertieren
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- den Zentrifugationsüberstand auf eine Spinsäule geben
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren und den Durchlauf verwerfen
- 750 µl Waschpuffer PE auf die Säule geben und erneut 1 min zentrifugieren und den Durchlauf verwerfen
- um den Rest des Waschpuffers zu entfernen, 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren

- die Säule in ein neues Eppendorfgefäß setzen und 500 µl H₂O auf die Säule geben, 1 min inkubieren und 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren

C.2.2 Isolierung von Gesamt-DNA

Zur Isolierung von Gesamt-DNA wurden zwei Methoden angewendet.

Die DNA-Isolierung mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) ist eine schnelle Methode, um hochreine Gesamt-DNA zu erhalten. Die DNA-Ausbeute variierte jedoch bei den einzelnen Bodenisolaten ziemlich stark, so dass Stämme, die mit dieser Methode keine gute DNA-Ausbeute ergaben, mit der Methode nach Hopwood behandelt wurden. Diese Isolierungsmethode war für alle getesteten Bodenisolat geeignet, ist aber sehr zeitaufwendig, da sie eine Dialyse über Nacht beinhaltet.

C.2.2.1 Gesamt-DNA-Isolierung mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)

- 1 ml Übernachtskultur bei 6000 rpm abzentrifugieren
- das Pellet in 200 µl PBS resuspendieren
- 15 µl Lysozym (10 mg/ml in TE-Puffer) dazu geben und 15 min bei 37 °C inkubieren; falls das Lysat viskös wird, muss gevortext werden
- Zugabe von 200 µl Bindungspuffer und 40 µl Proteinase K, sofort mischen und 10 min bei 72 °C inkubieren
- 100 µl Isopropanol zugeben und das Lysat auf ein Filter-Tube pipettieren
- bei 8000 rpm 1 min zentrifugieren und den Durchlauf verwerfen
- 500 µl Waschpuffer auf das Filter-Tube geben und 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren, diesen Vorgang einmal wiederholen
- das Filter-Tube in ein neues Eppendorfgefäß setzen und die DNA mit 200 µl Elutionspuffer (auf 70 °C vorgewärmt) 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- die DNA kann direkt analysiert werden und wird bei 4 °C gelagert

C.2.2.2 Isolierung von Gesamt-DNA nach Hopwood (Hopwood, 1985) (modifiziert)

- 1.5 ml Übernachtskultur abzentrifugieren
- das Pellet in 250 µl AKI resuspendieren und 1 h bei 37 °C inkubieren
- Zugabe von 125 µl 2 % SDS und sofort intensiv vortexen; sollte die Lyse nicht vollständig sein, dann bei 37 °C inkubieren
- 125 µl Kirby-Mix zugeben, vortexen und 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Oberphase abnehmen und 125 µl Kirby-Mix zugeben, vortexen und 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- die Oberphase abnehmen und über Nacht gegen TE-Puffer dialysieren

C.2.3 Klonanalysen

C.2.3.1 Schnell-Lyse (Birnboim & Doly, 1979) (modifiziert)

- 1.5 ml Übernachtskultur bei 13000 rpm abzentrifugieren
- das Pellet in 150 µl K-P 1 resuspendieren
- Zugabe von 150 µl K-P 2, sechsmal invertieren und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 150 µl K-P 3 zugeben, sechsmal invertieren und 10 min bei 0 °C inkubieren

- das Lysat 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- den Zentrifugationsüberstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen und 1 ml Isopropanol zugeben
- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen
- das Pellet mit 150 µl 70 % Ethanol waschen, 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand quantitativ abziehen, das Pellet trocknen und in 50 µl H₂O lösen
- für Restriktionsanalysen 3-5 µl einsetzen, DNA bei -20 °C lagern

C.2.4 Alkoholfällung von DNA

- 1 Vol. DNA in Puffer
- Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat pH 7.5
- Zugabe von 1 Vol. Isopropanol oder 2 Vol. Ethanol
- 10-20 min bei -70 °C inkubieren und 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- den Überstand verwerfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol waschen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand quantitativ entfernen, das Pellet trocknen und in H₂O lösen

C.2.5 Extraktion von Proteinen mit Phenol

- zu 1 Vol. DNA in Lösung 1 Vol. Kirby-Mix geben und vortexen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren, die Oberphase abnehmen
- Ethanol-fällung

C.2.6 Anhängen von einzelnen Adenosinen an das 3' Ende von PCR-Produkten

- 25 µl PCR-Ansatz
- die DNA 20 min bei 95 °C denaturieren
- 7.5 µl dATP (2 mM) und 2.5 U *Taq* DNA-Polymerase zugeben und 15 min bei 70 °C inkubieren
- Ethanol-fällung

C.2.7 Reinigen von PCR-Ansätzen oder Entsalzen von Ligationsansätzen mit dem Microcon PCR-Kit von Millipore

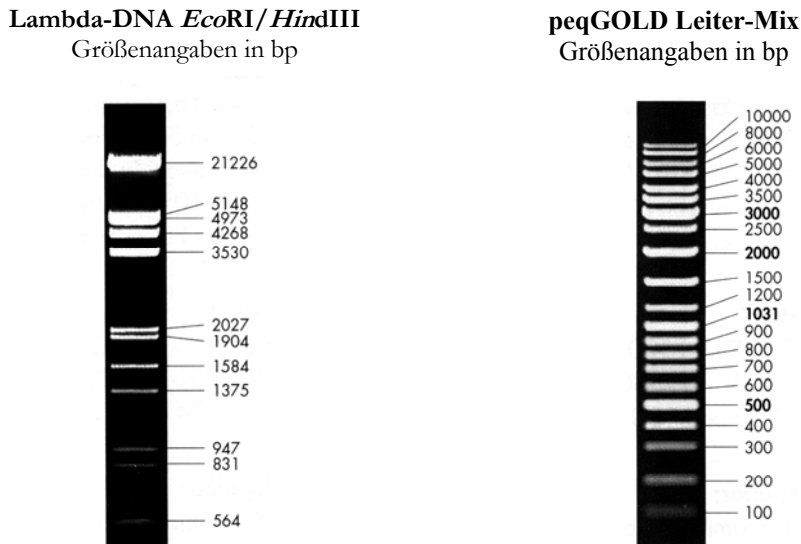
- 400 µl H₂O mit 100 µl PCR-Ansatz (ohne Öl!) mischen und auf die Microcon Säule geben
- 15 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- die Säule umdrehen und in ein neues Eppendorfgefäß setzen
- 20 µl H₂O auf die Säule pipettieren und 2 min bei 3000 rpm zentrifugieren

C.2.8 Agarosegelelektrophorese

In einem elektrischen Feld wandern Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung zur positiven Elektrode. Die Agarosegelmatrix trennt die Nukleinsäurefragmente entsprechend ihrer Größe auf, die Trennschärfe hängt dabei von der Agarosekonzentration ab. Für große Fragmente wurden 0.8 % Agarosegele verwendet, für sehr kleine Fragmente 2 % oder 2.5 % Gele.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromspannung von ca. 70-90 V in TA-Puffer. Die Gele wurden 15 min in einer Ethidiumbromidlg. (1 µg/ml) gefärbt und im UV-Durchlicht fotografiert.

Als Größenstandards für die DNA Fragmente diente DNA des Bakteriophagen Lambda hydrolysiert mit *EcoRI/HindIII* und den peqGold Leiter-Mix (peqLab).



C.2.8.1 Präparative DNA-Fragmentisolierung aus dem Agarosegel

elektrophoretische Auftrennung der hydrolysierten DNA und Färben des Agarosegels

C.2.8.1.1 Isolierung mit der DEAE-Membran

- ober- oder unterhalb des zu isolierenden DNA-Fragmentes das Agarosegel mit einem Skalpell einschneiden und ein Stück der DEAE-Membran in den Spalt setzen
- das Agarosegel so in die Elektrophoresekammer legen, dass das DNA-Fragment auf die DEAE-Membran läuft, 15 min Elektrophorese bei 80 V
- zur Elution die DEAE-Membran 30-60 min bei 70 °C in 400 µl Elutionspuffer inkubieren
- anschließend Ethanolfällung

C.2.8.1.2 Isolierung mit dem Qiagen Kit MinElute

- das DNA-Fragment mit dem Skalpell aus dem Agarosegel schneiden
- Zugabe von 300 µl QG zu 100 mg Agarosegel
- 10 min bei 55 °C inkubieren, 2-3 mal vortexen
- falls es einen Farbumschlag gibt, 3 M Na-Acetat pH 5.0 zugeben
- 1 Vol. Isopropanol zugeben und auf die Qiaquick-Säule pipettieren
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- den Durchlauf verwerfen und 500 µl QG auf die Säule geben
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, den Durchlauf verwerfen und die Säule mit 750 µl PE waschen
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen und Säule 1 min trocken zentrifugieren
- 10 µl H₂O auf die Säule pipettieren, 1 min warten und 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren

C.2.9 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

- DNA-Lösung in gewünschter Menge und Konzentration, dazu 1/10 Vol. Restriktionspuffer geben
- 1-4 U Restriktionsenzym und mit Millipore bis zum berechneten Endvolumen auffüllen
- 1 h im enzymespezifischen Temperaturoptimum inkubieren
- zur Enzyminaktivierung 10 min bei 65 °C oder Phenolextraktion

C.2.10 *In vitro* Neukombination von DNA (Ligation)

- hydrolysierte Vektor-DNA und zu klonierende DNA ca. im Verhältnis 1:10 mischen
- 1 U T4-DNA Ligase und 1/ 10 Vol. Ligationspuffer zugeben und mit Millipore auf das gewünschte Endvolumen auffüllen
- über Nacht bei 16 °C inkubieren
- den Ligationsansatz 10 min bei 65 °C hitzeinaktivieren

Bei der PCR mit der *Taq* DNA-Polymerase werden an den 3' Enden des Amplifikates einzelne Adenosine angefügt. Vektoren, die an ihren 3'Enden das dazu komplementäre Thymidin tragen (sogenannte T-A-Vektoren), erleichtern das Klonieren von PCR-Produkten mit überstehenden Adenosinen.

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden zwei verschiedene T-A-Vektoren verwendet.

C.2.10.1 Klonierung von PCR-Produkten mit dem pGEM TEasy (Promega)

- 5 µl Promega Ligationspuffer, 1 µl Vektor pGEM TEasy und 1 µl Ligase in einem 0.5 ml Reaktionsgefäß mischen
- maximal 3 µl PCR-Ansatz zugeben
- 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubieren
- 10 min bei 65 °C Hitzeinaktivierung

C.2.10.2 Klonierung von PCR-Produkten mit dem Qiagen PCR Cloning Kit

- 5 µl Ligations Master Mix mit 1 µl Vektor pDrive mischen
- maximal 4 µl PCR-Produkt zugeben
- mind. 30 min bei 4-16 °C inkubieren, für eine dreifache Ausbeute die Inkubation auf 2 h ausdehnen
- 10 min bei 70 °C Hitzeinaktivierung

C.2.11 DNA-Amplifizierung mittels PCR (Mullis und Faloona, 1987)

Die Polymerase Ketten Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine *in vitro* Technik, mit der spezifische DNA-Fragmente vervielfältigt werden können. Um mit dieser Methode DNA zu amplifizieren, werden Primer als Starthilfe benötigt. Die Primer sind kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden Bereiches sind. Unter den geeigneten Reaktionsbedingungen und in Anwesenheit von dNTPs verlängert die DNA-Polymerase (z.B. *Taq*, *Vent*, *Pfu*) die Primer und synthetisiert neue DNA-Stränge, die komplementär zur Matrize sind.

Die Amplifizierung erfolgte im MiniCycler oder im Robocycler.

C.2.11.1 Amplifikation von Sequenzen konjugativer Plasmide mit Hilfe von *tra*-Primern (Disqué-Kochem *et al.*, 2001)

Auf der Basis von *traG*- (RP4) und *trbB*- (RP4) homologen Genen wurden degenerierte PCR-Primer entwickelt, mit denen *traG*- bzw. *trbB*-ähnliche Gene auf Plasmiden detektiert werden sollten. Zur Amplifizierung von *trbB*-homologen Genen wurden das Primerpaar B-1/B-2 und speziell für die *trbB*-homologen Gene von IncN-Plasmiden das Primerpaar B-11/B-31 eingesetzt. Die Primerpaare G-41/G-6 und G-413/G-6 sind für *traG*-ähnliche Gene entwickelt worden.

traG-Primer:

Primer G-41: 5' GAC STI AAA GGC GAG ITK TIK GMG C 3'

Primer G-413: 5' GAC CCI AIT GGC GAW RTK T 3'

Primer G-6: 5' GYT TGC CIA IHI TIG GIA AYT CGT C 3'

trbB-Primer:

Primer B-1: 5' TTG CCG CCG III GTR SCM KCG 3'

Primer B-2: 5' CTC RCC GAS CAG KAT ICG GTC 3'

Primer B-11: 5' ATC TGT ITG CCI CCK RCG GT 3'

Primer B-31: 5' AGA TAA KCC CAC GCR GCA TCR T 3'

Als Templates für diese PCR wurden Gesamt-DNA oder über CsCl-Ethidiumbromiddichte-gradienten gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt. Die PCR erfolgte im Robocycler mit einem Temperaturgradienten. Die Annealingtemperatur lag im Bereich von 44 °C bis 58 °C, mit einem Intervall von 2 °C zwischen zwei Proben.

PCR-Ansatz (50 µl):

50-100 ng	DNA
0.1 µM	Primer 1
0.1 µM	Primer 2
5 µl	Taq DNA-Pol.-Puffer AGS
3 mM	MgCl ₂
5 µl	dNTP-Mix
2 U	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
ad 50 µl Millipore	

PCR-Programm:

35 Zyklen:		
1 min	94 °C	
2 min	44 °C-58 °C	
2 min	72 °C	

C.2.11.2 Amplifizierung der 16S-rDNA mit dem Primerpaar 27f und 1385r

Um PCR-Fehler zu minimieren, erfolgte die Amplifizierung der 16S-rDNA mit DNA-Polymerasen, die eine Korrekturlesefunktion besitzen (Vent, *Pfu*). Die PCR wurde mit dem Primerpaar 27f und 1385r durchgeführt (Lane, 1991).

Primer 27f: 5´ GAG TTT GAT CCT GGC TCA 3´
 Primer 1385r: 5´ CGG TGT TGR CAA GGC CC 3´

PCR-Ansatz mit *Pfu* DNA-Polymerase:

	10 µl	<i>Pfu</i> DNA-Pol.-Puffer
	10 µl	dNTP-Mix
	1 µl	Primer 27f (Endkonzentration 0.5 µM)
	1 µl	Primer 1385r (Endkonzentration 0.5 µM)
	1 µl	Gesamt-DNA
	1 µl	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase
	76 µl	Millipore
	mit 40 µl	Mineralöl überschichten

PCR Ansatz mit Vent-DNA-Polymerase:

	10 µl	Vent DNA-Pol.-Puffer
	10 µl	dNTP-Mix
	1 µl	Primer 27f
	1 µl	Primer 1385r
	1 µl	Gesamt-DNA
	1 µl	Vent DNA-Polymerase (2000 U/ml)
	76 µl	Millipore
	mit 40 µl	Mineralöl überschichten

PCR-Programm für beide Ansätze:

	5 min	95 °C
	30 Zyklen:	
	1.5 min	94 °C
	1.5 min	55 °C
	1.5 min	72 °C
	10 min	72 °C

C.2.11.3 Detektion von Quecksilberresistenzgenen mittels PCR (Liebert *et al.*, 1997)

Zur Detektion von Quecksilberresistenzoperons wurden von Liebert *et al.* (1997) *mer*-spezifische PCR-Primer entwickelt. Das *merA*-Gen ist ein essentielles Gen in Quecksilberresistenzoperons, mit dem *merA*-spezifischen Primerpaar A1 und A5 werden ca. 72 % dieses Gens amplifiziert. Dieses Amplifikat hat eine Größe von 1.238 kb.

Primer A1: 5´ ACC ATC GTC AGG TAG GGG AAC AA 3´
 Primer A5: 5´ ACC ATC GGC GGC ACC TGC GT 3´

MATERIAL & METHODEN

<u>PCR-Ansatz (50 µl):</u>	5 µl	<i>Taq</i> DNA-Pol.-Puffer Y
	5 µl	dNTP-Mix
	0.5 µl	Primer A1
	0.5 µl	Primer A5
	1 µl	DNA
	0.5 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ml)
	37.5 µl	Millipore
	mit 25 µl	Mineralöl überschichten

<u>PCR-Programm:</u>	30 Zyklen:	
	1 min	94 °C
	2 min	62 °C
	1 min	72 °C
	10 min	72 °C

C.2.11.4 PCR zur Bestimmung von Plasmid-Inkompatibilitätsgruppen (Götz *et al.*, 1996)

Inc Gruppe	Region	Primer Sequenz	Produktgröße (bp)	Annealing-temp. (°C)
IncN	<i>kik</i> 1	ACT TAC CTT TAT CAA CAT TCT GGC G	329	55
	<i>kik</i> 2	CGA CTG GTT ACT TCC ACC TTC GC		
IncP	<i>oriT</i> 1	CAG CCT CGC AGA GCA GGA T	110	57
	<i>oriT</i> 2	CAG CCG GGCAGG ATA GGT GAA GT		
	<i>trfA1</i> 1	ATG ACG ACC AAG AAG CG	889	57
	<i>trfA1</i> 2	AAC CCC CAG CCG GAA CTG		
	<i>trfA2</i> 1	CGA AAT TCR TRT GGG AGA AGT A	241	57
	<i>trfA2</i> 2	CGY TTG CAA TGC ACC AGG TC		
	<i>korA</i> 1	ATG AAG AAA CGG CTN ACC GA	294	52
	<i>korA</i> 2	TTC CTG TTT YYT CTT GGC GTC		
	<i>traG</i> 1	CTG CGT CAC GAT GAA CAG GCT TAC C	762	63
	<i>traG</i> 2	ACT TCC AGC GGC GTC TAT GTG G		
IncQ	<i>repB</i> 1	TCG TGG TCG CGT TCA AGG TAC G	1160	62
	<i>repB</i> 2	CTG TAA GTC GAT GAT CTG GGC GTT		
	<i>oriV</i> 1	CTC CCG TAC TAA CTG TCA CG	436	57
	<i>oriV</i> 2	ATC GAC CGA GAC AGG CCC TGC		
	<i>oriT</i> 1	TTC GCG CTC GTT GTT CTT CGA GC	191	57
	<i>oriT</i> 2	GCC GTT AGG CCA GTT TCT CG		
	<i>repC</i> 1*	CTG GAC GTG ACG TAT GAC TAC G	460	60
	<i>repC</i> 2*	ACC TCG TCC ATG CTG ATG CG		
IncW	<i>oriV</i> 1	GAC CCG GAA AAC CAA AAA TA	1140	58
	<i>oriV</i> 2	GTG AGG GTG AGG GTG CTA TC		
	<i>oriT</i> 1	TCT GCA TCA TTG TAG CAC C	317	51
	<i>oriT</i> 2	CCG TAG TGT TAC TGT AGT GG		
	<i>trwAB</i> 1	AGC GTA TGA AGC CCG TGA AGG G	141	57
	<i>trwAB</i> 2	AAA GAT AAG CGG CAG CAG GAC AAT AAC G		

* Primersequenzen von Dr. E. Tietze, Robert Koch Institut, Bereich Wernigerode

Die PCR mit allen diesen Primern erfolgte mit einem Standard PCR-Ansatz und einem PCR-Programm, bei dem nur jeweils die Annealingtemperatur verändert wurde.

<u>PCR-Ansatz (50 µl):</u>	5	µl	<i>Taq</i> DNA-Pol.-Puffer Y
	5	µl	dNTP-Mix
	1	µl	Primer 1
	1	µl	Primer 2
	1	µl	Gesamt-DNA
	0.5	µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
	36.5	µl	Millipore

<u>PCR-Programm:</u>	35	Zyklen:
	1	min 94 °C
	1	min entspr. Annealingtemp.
	1	min 72 °C
	10	min 72 °C

C.2.12 Amplified Ribosomal DNA-Restriction Aalysis (ARDRA)

Zur ersten verwandtschaftlichen Einordnung der Bakterienstämme wurde die ARDRA-Methode angewendet. Dabei wird mit dem Primerpaar R1n (Primersequenz von Dr. H.-V. Tichy, TÜV Energie und Umwelt GmbH, Fachgruppe Biologische Sicherheit, Freiburg) und U2 (Weidner *et al.*, 1996) ein Stück des 16S-rRNA Gens amplifiziert und nachfolgend mit drei verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es entstehen spezies-spezifische Fragmentmuster, die eine verwandtschaftliche Einordnung der Bodenisolate erlauben.

Primer R1n: 5´GCT CAG ATT GAA CGC TGG CG	Position in <i>E. coli</i> 16S-rDNA 22-41
Primer U2: 5´ACA TTT CAC AAC ACG AGC TG	Position in <i>E.coli</i> 16S-rDNA 1085-1066

PCR-Ansatz mit Bakterienzellen oder Gesamt-DNA:

1	µl	Gesamt-DNA oder Bakterienzellen aus einer Einzelkolonie mit einer sterilen Spitze im PCR-Ansatz resuspendieren
10	µl	AGS PCR-Puffer
10	µl	dNTP-Mix
6	µl	MgCl ₂
2	µl	Primer R1n (80 pmol/µl)
2	µl	Primer U2 (80 pmol/µl)
1	µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ml)
68	µl	Millipore
mit 40	µl	Mineralöl überschichten

<u>PCR-Programm:</u>	4 min	94 °C
	35 Zyklen:	
	1 min	94 °C
	1.5 min	54 °C
	2 min	72 °C

Die PCR-Produkte wurden jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *HinfI*, *HpaII* und *HaeIII* hydrolysiert. Die Restriktionsansätze wurden in einem 2.5 % Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

C.2.13 Transformation von *E. coli* (nach Mandel und Higa, 1970) (modifiziert)

C.2.13.1 Herstellung kompetenter Zellen

- 10 ml log-Kultur (Titer ca. $2-4 \times 10^8$ /ml)
- 5 min bei 6500 rpm zentrifugieren, 4 °C, Rotor A8.24
- Zellpellet in 5 ml 100 mM CaCl₂ (vorgekühlt) resuspendieren
- 30 min Inkubation auf Eis
- 5 min bei 6500 rpm zentrifugieren, 4 °C, Rotor A8.24
- Zellpellet in 1 ml 100 mM CaCl₂ 20 % Glycerin (vorgekühlt) aufnehmen
- die Zellen können sofort zur Transformation eingesetzt werden oder bei -70 °C gelagert werden

C.2.13.2 Transformation

- 200 µl kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA mischen
- auf Eis 20 min inkubieren
- 3 min Hitzeschock bei 42 °C
- Zellen kurz auf Eis abkühlen und 800 µl TBY-Medium zugeben
- 60 min zur Expression der Antibiotikaresistenz bei 37 °C inkubieren
- auf Selektionsmedium ausplattieren

C.2.14 Antibiotikaresistenztest mit den Antibiotikatestplättchen (Oxoid)

100 µl einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Bakterienstammes werden mit 3 ml TBY-Weichagar vermischt und auf eine TBY-Agarplatte gegossen. Nach Erstarren des Weichagars werden die Antibiotikatestplättchen mit einer sterilen Pinzette auf der TBY-Platte verteilt (Abstand der Plättchen mind. 1.5 cm). Diese Platte wird über Nacht bei 37 °C für *E. coli*-Stämme oder bei 28 °C für Bodenisolat bebrütet. Die Auswertung des Resistenztests erfolgt über die Größe des Hemmhofes um die Antibiotikatestplättchen.

C.2.15 Konjugation und Mobilisierung

Die beiden Konjugationspartner in geeigneten Selektionsmedien bis zu einem Titer von $1-3 \times 10^8$ /ml anziehen. Jeweils 15 µl der log-Kulturen zusammen auf einen Cellulose-Nitrat-Filter tropfen, der auf einer TBY-Agarplatte (Konjugation mit *E. coli* als Donor) oder auf einer ½ TBY-Agarplatte (Konjugation mit Bodenisolat) liegt. Den Filter trocknen lassen und die Agarplatte über Nacht bei 28 °C bebrüten. Das Konjugationsgemisch vom Filter abnehmen

und in Flüssigmedium (TBY oder ½ TBY Medium) resuspendieren. Geeignete Verdünnungsstufen auf Selektionsmedien ausplattieren und 1-3 Tage bei 28 °C bebrüten.

C.2.16 DNA-DNA-Hybridisierung

C.2.16.1 Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin

Eine Alternative zur radioaktiven Markierung stellt die Markierung mit Digoxigenin dar. Das Digoxigenin wird durch eine Esterbindung an dUTP gekoppelt (Dig-11-dUTP), dieses markierte Nukleotid kann über verschiedene Methoden in DNA-Proben eingebaut werden.

C.2.16.1.1 Nicktranslation

Bei der Nicktranslation werden durch DnaseI-Behandlung Strangbrüche in doppelsträngige DNA eingefügt. Die 5'-3' Exonukleaseaktivität der *E. coli* DNA-Polymerase I beginnt an dem Strangbruch und entfernt einzelsträngige DNA-Bereiche. Durch die 5'-3' Polymeraseaktivität der DNA-Polymerase I können jetzt neue markierte dNTPs eingebaut werden.

- 1 µg DNA
- 5 µl NT-Puffer (10 x)
- 2 µl Dig-dNTP-Mix
- 0.5 µl DNaseI (10⁻⁴)
- 0.5 µl DNA-Polymerase I von *E. coli*
- ad 50 µl Millipore und 90 min bei 16 °C inkubieren
- zum Abstoppen der Reaktion 4 µl EDTA (250 mM) zugeben
- Ethanol-fällung

C.2.16.1.2 Random Primed DNA-Markierung mit dem DIG DNA Labeling und Detection Kit (Roche)

Bei dem Prinzip des "Random Priming" wird die zu markierende DNA denaturiert, so dass sich an die Einzelstränge Hexanukleotide anlagern können, die als Startprimer für das Klenowfragment dienen. Bei der Neusynthese des DNA-Stranges wird auch Dig-11-dUTP eingebaut.

- Denaturierung der DNA im Wasserbad bei 98 °C
- die DNA sofort auf Eis abkühlen und die weiteren Schritte auch auf Eis durchführen
- 2 µl Hexanukleotid Mix, 2 µl dNTP-Mix und 1 µl Klenow Enzym dazugeben und mischen
- Inkubation 1 h bei 37 °C
- die Reaktion mit 2 µl EDTA (200 mM) stoppen
- Ethanol-fällung

C.2.16.2 Southernblot (Southern, 1975) (modifiziert)

Mit dieser Methode können homologe DNA-Sequenzen in verschiedenen DNA-Proben nachgewiesen werden. Dazu werden die zu untersuchenden DNA-Proben in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch verschiedene Blottechniken auf eine

Nylonmembran transferiert. Durch Hybridisierung mit einer einzelstängigen DNA-Sonde können so homologe DNA-Bereiche auf der Membran detektiert werden.

C.2.16.2.1 Southernblot mit dem Vakuumblotter: VacuGene Pump (LKB Pharmacia)

Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben im Agarosegel

- die Plastikmaske anfeuchten und luftblasenfrei auf den Blotter legen
- die Nylonmembran auf den Ausschnitt der Plastikmaske legen
- das Agarosegel auf die Membran legen und die Vakuumpumpe anstellen, es sollte ein Unterdruck von ca. 50 mbar erzeugt werden
- Depurinierungslsg. auf das Gel pipettieren, solange einwirken lassen, bis der BPB-Ladepuffer sich gelb färbt
- Lsg. abgießen und Denaturierungslsg. auf das Gel geben, sobald der BPB-Ladepuffer wieder blau wird
- Lsg. abgießen und das Gel 3 min mit Neutralisierungslsg. überschichten
- Lsg. abgießen und das Gel für 60 min mit 20 x SSC überschichten
- die DNA mit der Nylonmembran unter UV-Licht quervernetzen, 3 min

C.2.16.2.2 Hybridisierung

- die Nylonmembran luftblasenfrei in einen Hybridisierungszylinder überführen
- 20 ml Prähybridisierungslsg. zugeben und mind. 1 h bei 68 °C im Hybridisierungssofen prähybridisieren
- die DNA-Sonde 15 min bei 98 °C denaturieren
- die Prähybridisierungslsg. abgießen und die DNA-Sonde mit 10 ml Hybridisierungspuffer in den Zylinder geben
- die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 68 °C

C.2.16.2.3 Nachweis

- die Hybridisierungssonde abgießen und bei -20 °C lagern
- die Membran zweimal 5 min mit ca. 30 ml Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur waschen
- die Membran zweimal 15 min mit ca. 30 ml Waschpuffer 2 bei 63 °C im Hybridisierungssofen waschen
- Membran mit der DNA-Seite nach unten in eine Hybridisierungsschale legen und auf einem Schüttler 1 min mit Maleinsäurepuffer inkubieren
- 30 min Inkubation mit Dig-Puffer 2, schütteln
- Membran mit Antikörperlsg. überschichten und 30 min inkubieren, schütteln
- die Membran in eine neue Schale überführen und zweimal 15 min mit Maleinsäurepuffer + 0.3 % Tween 80 waschen
- 2 min mit Dig-Puffer 3 äquilibrieren
- Zugabe der Detektionlsg. und Inkubation im Dunkeln
- zum Abstoppen der Reaktion die Membran mit TE-Puffer waschen

C.2.17 Sequenzierprimer

C.2.17.1 Standard-Sequenzierprimer

M13 universal (-40): 5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'

M13 reverse (-21): 5' AAC AGC TAT GAC CAT G 3'

C.2.17.2 Primer speziell für das I-Ende des Transposons vom Plasmid pAG408

Das Transposon des Plasmides pAG408 (Suarez *et al.*, 1997) wurde zur Markierung von Plasmiden aus Bodenbakterien verwendet (siehe Abschnitt D.2.5.2), um den an das I-Ende des Transposon angrenzenden Bereich dieser Plasmide zu sequenzieren, wurde der Primer I-2 (Herrero *et al.*, 1990) verwendet.

I-2: 5' AGA TCT GAT CAA GAG ACA G 3'

C.3 **Computersoftware und Datenbanken**

Die bei den Sequenzierungen der Plasmide erhaltenen Einzelsequenzen wurden mit dem SeqMan-Programm (DNASTAR 4.06, Lasergene) zu Gesamtsequenzen zusammengefügt. Sequenzkorrekturen wurden mit Hilfe des Chromas-Programmes (Version 2.2, Technelysium) durchgeführt. Mit dem Clone Manager 5.0 (Scientific and Educational Software) wurden Plasmidkarten erstellt.

Proteinalignments und DNA-Alignment wurden mit dem MegAlign-Programm (DNASTAR 4.06, Lasergene) und dem ClustalX Programm (Version 1.81) (Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt.

Die taxonomische Einordnung der 16S-rDNA-Sequenzen der Bodenisolate erfolgte über den Vergleich der ermittelten Sequenzen mit denen des Ribosomal Database Project II (Maidak *et al.*, 2001).

Die ermittelten DNA-Sequenzen der Plasmide wurden mit den BlastN- und BlastX-Algorithmen (Altschul *et al.*, 1997) der NCBI Datenbank auf Ähnlichkeiten zu DNA- oder Proteinsequenzen der Datenbanken untersucht. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von potentiellen Genen dieser Plasmide wurden mit dem BlastP-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) der NCBI Datenbank auf Homologien untersucht.

Die Analyse der Proteinsequenzen auf mögliche Signalsequenzen wurde mit SignalP 2.0 (Nielsen *et al.*, 1997) durchgeführt, die Analyse auf Transmembrandomänen erfolgte mit dem TMHMM 2.0-Programm (Moller *et al.*, 2001; Krogh *et al.*, 2001).

Konservierte Proteinmotive und Domänen wurden mit Hilfe der PFAM-Datenbank (Bateman *et al.*, 2002) und der PROSITE Datenbank ermittelt.

Internetadressen:	NCBI:	ncbi.nlm.nih.gov
	Ribosomal Database:	rdp.cmc.msu.edu
	PFAM:	pfam.wustl.edu
		sanger.ac.uk/Pfam/
	Proteinmotive:	hits.isb-sib.ch/cgi-bin
	SignalP:	cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0
	TMHMM:	cbs.dtu.dk/services/TMHMM

D. ERGEBNISSE

Diese Arbeit war in das BMBF-Projekt "Diversität und Gentransfer in denitrifizierenden Bakteriengemeinschaften" eingegliedert. Ziel dieses Projektes war es, die Beteiligung des horizontalen Gentransfers mittels Konjugation und Transformation an der genetischen Diversität von Bakterienpopulationen zu analysieren. Die Bodenproben-Entnahme und Isolierung der Bakterien wurden von der Arbeitsgruppe Imhoff (Universität Kiel) durchgeführt. DNA-Transfer über Transformation wurde von der Arbeitsgruppe Lorenz/Wackernagel (Universität Oldenburg) untersucht und unsere Arbeitsgruppe befasste sich mit dem durch Konjugation vermittelten Gentransfer.

Die bekannten und im Detail untersuchten konjugativen Transfersysteme von Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppen (Inc-Gruppen) IncF, IncP, IncN, IncW, IncI, IncX und das Virulenzoperon *virB* des Ti-Plasmides zeigen sowohl Gemeinsamkeiten in der Genorganisation als auch in den einzelnen Transferproteinen (Zechner *et al.*, 2000; Cao und Saier, 2001). Bei Plasmiden innerhalb der gleichen Inc-Gruppe sind die Ähnlichkeiten stärker ausgeprägt als zu Plasmiden einer anderen Inc-Gruppe (Zechner *et al.*, 2000). Neu isolierte Plasmide aus Umwelthabitaten konnten mit den Inc-Sonden von Couturier *et al.* (1988) und den PCR-Primern von Götz *et al.* (1996) nur in den wenigsten Fällen einer der bekannten Inc-Gruppen zugeordnet werden (Lilley *et al.*, 1996; Dahlberg *et al.*, 1997). Dementsprechend kann nur die Sequenzierung von Transfergenen konjugativer Plasmide aus Umwelthabitaten zeigen, inwieweit diese Transfersysteme Ähnlichkeiten zu denen der gut untersuchten Inc-Gruppen (IncF, IncP, IncN, IncW, IncI, IncX) haben oder ob die Transfersysteme dieser Plasmide nur zu Transfersystemen anderer Bodenbakterien ähnlich sind.

Nachdem die Bodenisolate auf ihren Plasmidgehalt untersucht worden sind, wurden in dieser Arbeit einige der Plasmide molekular und phänotypisch charakterisiert. Dazu wurden die Plasmide auf Resistenzen und auf ihre Zugehörigkeit zu einer der bekannten Inc-Gruppen getestet. Das konjugative Potential einiger Bodenbakterien wurde in Mobilisierungs- und Konjugationsexperimenten analysiert. Von zwei Plasmiden wurden die Transferregionen sequenziert und charakterisiert.

D.1 Isolierung denitrifizierender Bakterien aus Bodenproben

Die Bodenproben wurden von zwei Parzellen (Nr. 520 und 521) eines Versuchsfeldes des Versuchsgutes Hohenschulen in der Füsinger Au (Schleswig Holstein) genommen. Der Boden des Versuchsfeldes besteht aus sandigem, humusreichen Kolluvisol. Auf beiden Parzellen wurden im Wechsel Raps, Weizen und Gerste angebaut. Der Unterschied zwischen beiden Parzellen bestand in der unterschiedlichen Düngung. Während Parzelle 521 nicht gedüngt wurde, wurden auf Parzelle 520 120 kg Ammoniumnitrat pro ha und Jahr ausgebracht. Von jeder Parzelle wurden im Zeitraum von 1996 bis 1998 (siehe Tab. 1) vier Bodenproben, die jeweils aus vier Einzelproben bestanden, entnommen. Dazu wurden mit einem Probenstecher aus den oberen 10 cm jeweils vier Proben entnommen und zu einer Mischprobe vereinigt (Arbeitsgruppe Imhoff).

Aus den Bodenproben wurden von den Arbeitsgruppen Imhoff und Lorenz/Wackernagel Aufschwemmungen hergestellt. Verdünnungen wurden auf festen Medien ausplattiert und unter Bedingungen bebrütet, die die Anreicherung von Denitrifikanten erlaubten. Diese Platten waren das Ausgangsmaterial für die Herstellung von Einzelisolaten. Da aus praktischen Gründen nicht alle Kolonien bei der Kolonievereinzelnung anaerob bebrütet werden konnten, sind wohl vereinzelt auch nicht denitrifizierende Bodenisolate untersucht worden.

Alle weiteren Kultivierungsschritte bis zur Reinkultur wurden unter aeroben Bedingungen auf Komplettnmedium ($\frac{1}{2}$ TBY) bei 28-30 °C durchgeführt. Die Tab. 1 gibt einen Überblick über die Probenentnahmen und Isolate.

Tabelle 1. Übersicht der Probenentnahmen und Anzahl der jeweils erhalten Isolate.

Datum der Probenentnahme	Isolierung in	Anzahl der Isolate von Parzelle	
		520 (gedüngt)	521 (ungedüngt)
04.10.1996	Ki	168	105
24.04.1997	Ki	109	79
	Ol	183	-
	Bi	670	
15.09.1997	Bi	500	500
12.05.1998	Bi	363	459
Gesamtsumme		3136	

Die Abkürzung Ki steht für Kiel, Ol für Oldenburg und Bi für Bielefeld.

Von der Bodenprobe, die am 15.09.1997 entnommen wurde, konnten 81 Bodenisolat auf den von uns verwendeten Medien nicht über einen längeren Zeitraum kultiviert werden und konnten deshalb nicht zur Ermittlung des Plasmidgehaltes der Isolate herangezogen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die 3136 Isolate keine Schwesterzellen eines Isolates enthalten. Das Auftreten gleicher Plasmide in Bodenisolaten, der Gesamtplasmidgehalt und der Plasmidgehalt einzelner Gattungen muss unter diesem Gesichtspunkt diskutiert werden.

D.1.1 Ermittlung des Plasmidgehaltes der Bodenisolat

Als die geeignetste Methode zum Nachweis von Plasmiden in den Isolaten hat sich die alkalische Lyse nach Ramos-Gonzales *et al.* (1991) herausgestellt. Mit dieser Methode sind allerdings integrierte Plasmide, RNA-haltige Plasmide (aufgrund der alkalischen Lyse), lineare Plasmide und Plasmide größer als 250 kb (nicht mehr im Agarosegel nachweisbar) nicht detektierbar. Abb. 1 zeigt exemplarisch ein Agarosegel mit Plasmiden aus Bodenisolaten. Einer Bande im Gel wurde jeweils ein Plasmid zugeordnet, man kann jedoch nicht ausschließen, dass es sich teilweise um verschiedene Konformationen desselben Plasmides handelt. Tab. 2 zeigt die Anzahl der plasmidhaltigen Vertreter unter den Isolaten. Einzelheiten zum Plasmidgehalt der Bodenisolat und den Plasmidgrößen sind Tab. 3 zu entnehmen.

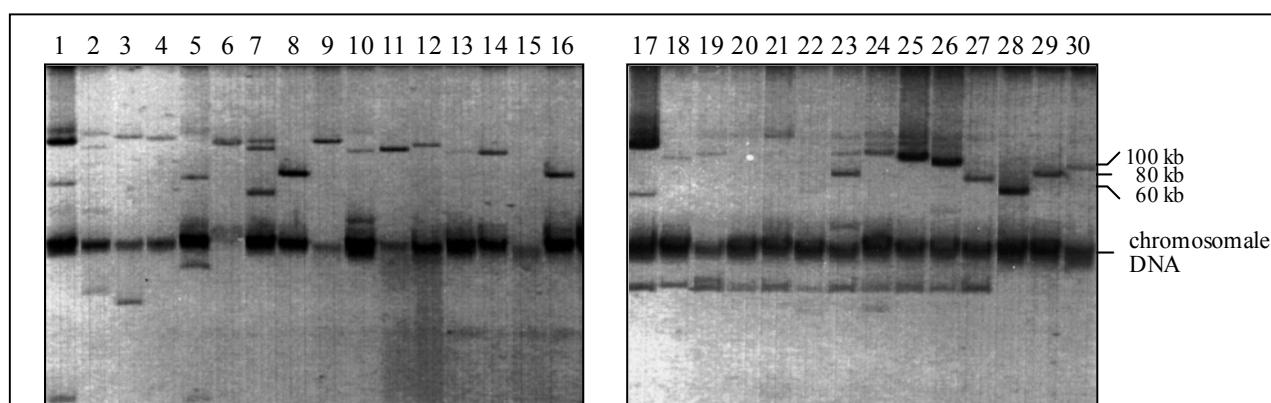


Abb. 1. Agarosegel mit Plasmid-DNA, die mit der alkalischen Lyse nach Ramos-Gonzales *et al.* (1991) isoliert wurde. Spur 1: Bi144 *Paracoccus* sp., Spur 2: Bi1590 *Paracoccus* sp., Spur 3: Bi251 *Pseudomonas* sp., Spur 4: Ki169 *Pseudomonas* sp., Spur 5: Bi1099 *Paracoccus* sp., Spur 6: Bi64 *Pseudomonas* sp., Spur 7: Ki163a *Citrobacter* sp., Spur 8: Bi1098 *Stenotrophomonas* sp., Spur 9: Bi1363 *Stenotrophomonas* sp., Spur 10: Bi271 *Paracoccus* sp., Spur 11: Bi746 *Pseudomonas* sp., Spur 12: Bi1185 *Pseudomonas* sp., Spur 13: Bi563 *Agrobacterium* sp., Spur 14: Ki173 *Pseudomonas* sp., Spur 15: Bi569 *Pseudomonas* sp., Spur 16: Bi1063 *Stenotrophomonas* sp.. Die Spuren 17-27 enthalten Plasmidpräparationen von verschiedenen Bodenisolaten der Gattung *Paracoccus*, Spur 17: Bi144, Spur 18: Bi271, Spur 19: Bi1058, Spur 20: OI18, Spur 21: Bi237, Spur 22: Bi1099, Spur 23: OI24, Spur 24: OI11, Spur 25: Bi1094, Spur 26: Bi165, Spur 27: Bi161. In den Spuren 28-30 sind verschiedene Kontrollplasmide aufgetragen: Spur 28: F, Spur 29: SAL, Spur 30: RP4.

Tabelle 2. Übersicht des Anteils der plasmidhaltigen Isolate in den einzelnen Bodenproben.

Datum der Probenentnahme	Parzelle 520 (gedüngt) Plasmidhaltige Isolate/Gesamtzahl	Parzelle 521 (ungedüngt) Plasmidhaltige Isolate/Gesamtzahl
04.10.1996	7/168	1/105
24.04.1997	0/109	0/79
	3/183	-
	21/670	
15.09.1997	12/448	10/471
12.05.1998	11/363	34/459
Summe	33/1271	45/1114
%	99/3055 = 3.2 %	

Insgesamt wurden 3055 Bodenisolat auf ihren Plasmidgehalt untersucht (siehe Tab. 2). Mit unserer Screening-Methode wurden in 99 Bodenisolaten Plasmide gefunden, dies entspricht einem Anteil von 3.2 % der Bodenisolat. Der Plasmidgehalt der Bakterienpopulationen, die aus dem gedüngten Boden isoliert wurden, liegt bei 2.6 %. In den Bodenisolaten des ungedüngten Bodens liegt er bei 4 %. Zwischen diesen beiden Standorten lässt sich kein großer Unterschied im Gesamtplasmidgehalt der Bodenisolat erkennen, so dass hier die Bodendüngung auf den Plasmidgehalt der Bakterienpopulationen keinen Einfluss zu haben scheint. Allerdings ist für eine endgültige Aussage die Stichprobe plasmidhaltiger Isolate zu gering. Untersuchungen inwieweit sich gedüngte und ungedüngte Böden hinsichtlich des Auftretens und der Häufigkeit einzelner Bakteriengattungen unterscheiden und ob bestimmte Bakteriengattungen einen höheren bzw. niedrigeren Plasmidgehalt als andere aufweisen, könnten Aufschluss über den möglichen Einfluss von Bodendüngung geben.

In dieser Arbeit wurden nur die 54 plasmidhaltigen Bodenisolat der Bodenproben aus den Jahren 1996 und 1997 (siehe Tab. 3) näher charakterisiert. Unter der Annahme, dass jede Plasmid-Bande im Agarosegel einem Plasmid entspricht und es sich nicht um verschiedene Konformationen des gleichen Plasmides handelt, konnten mit der Isolierungsmethode nach Ramos-Gonzales in diesen 54 plasmidhaltigen Isolat 104 Plasmide detektiert werden. 54 % (29 Isolate) der Isolate enthalten nur ein Plasmid und in 46 % (25 Isolate) aller plasmidhaltigen Isolate konnten zwei oder mehr Plasmide (17 % enthalten zwei Plasmide, 18 % drei Plasmide und 11 % mehr als vier Plasmide) detektiert werden. Eine taxonomische Einordnung der plasmidhaltigen Isolate kann Aufschluss darüber geben, ob der Plasmidgehalt und die Anzahl von Plasmiden in einem Isolat mit bestimmten Bakteriengattungen korreliert.

Unter den 104 detektierten Plasmide sind 29 % kleiner als 30 kb, 24 % haben eine Größe zwischen 30 und 70 kb und größer als 70 kb sind 47 % aller detektierten Plasmide.

Da konjugative Plasmide Gram-negativer Bakterien in der Regel größer als 30 kb sind, könnten von den 104 Plasmiden 74 Plasmide potentiell konjugativ sein. Aufgrund der Plasmidisolierungsmethode sind sehr kleine Plasmide (< 2 kb) und sehr große Plasmide (> 250 kb) schlecht zu detektieren und die ermittelten Plasmidgrößenverhältnisse sind nur grob geschätzt.

D.1.2 Einordnung der Isolate durch ARDRA

Alle plasmidhaltigen Vertreter der Bodenproben vom 04.10.1996 (8 Bodenisolat) und 24.04.1997 (24 Bodenisolat) und die Isolate vom 15.09.1997 (919 Bodenisolat) wurden mit Hilfe der ARDRA (*amplified ribosomal DNA-restriction analysis*) eingruppiert (Lin, 1998). Die Bodenisolat konnten in 88 ARDRA-Gruppen aufgeteilt werden, von den häufigsten Gruppen wurden 16S-rDNA-Sequenzanalysen durchgeführt (siehe Tab. 4) (Lin, 1998; diese Arbeit). Die ARDRA-Einteilung und die 16S-rDNA-Sequenzanalyse von 54 plasmidhaltigen Vertretern sind in Tab. 3 dargestellt.

Die 16S-rDNA-Sequenzen der Bodenisolat, deren Plasmide in dieser Arbeit näher charakterisiert wurden, sind im Anhang I aufgeführt. Nur bei den Bodenisolat, von denen eine 16S-rDNA-Analyse durchgeführt wurde, sind die Gattungen in die Tab. 3 eingetragen.

Tabelle 3. Plasmidhaltige Mitglieder einer Gemeinschaft von 951 Bodenisolat.

Stamm	Gattung	Gram-positiv	ARDRA-Gruppe	Plasmidgrößen (kb)
Bi 272	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	36	32, 30
Ki 10	<i>Bacillus</i> sp.	+	41	42, 12, 8
Ki 14		+	41	55, 40, 10
Bi 1167	<i>Bacillus</i> sp.	+	42	55
Bi 1429		+	42	19
Bi 566	<i>Bacillus</i> sp.	+	44	70, 16
Bi 467		+	51	100
Bi 621		+	51	100
Bi 962	<i>Bacillus</i> sp.	+	84	75

Die Plasmidgrößen in der fünften Spalte wurden durch Vergleiche mit Plasmiden bekannter Größen abgeschätzt.

Fortsetzung Tabelle 3.

Stamm	Gattung	Proteobakterien -Gruppe	ARDRA- Gruppe	Plasmidgrößen (kb)	
Ki 173	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ	19	105	
Ki 239	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	42	
Bi 1189	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	42	
Bi 113	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	48	
Bi 156	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	48	
Bi 173	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	30	
Bi 251	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	135, 10	
Bi 1418			19	135, 10	
Bi 1436	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	135, 10	
Bi 1506	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	135, 10	
Bi 1509			19	135, 10	
Bi 746			19	110	
Bi 860	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	70	
Bi 569			19	70	
Bi 1141	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	70	
Bi 1185			19	120	
Bi 64	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	125	
Bi 382	<i>Pseudomonas</i> sp.		19	22	
Bi 709	<i>Pseudomonas</i> sp.		23	60	
Ki 169	<i>Pseudomonas</i> sp.		65	130	
Ki 202			65	130	
Bi 1063	<i>Stenotrophomonas</i> sp. *		17	68	
Bi 1098	<i>Stenotrophomonas</i> sp. *		17	68	
Bi 1363			17	125	
Ki 163a	<i>Citrobacter</i> sp.		76	140, 125, 110, 50, 2.5	
Ki 163b	<i>Citrobacter</i> sp.		76	129, 115, 42	
Bi 147			β	6	7
Bi 203	<i>Alcaligenes</i> sp.			6	8
Bi 471				27	75
Bi 563			α	2	110
Bi 1087	<i>Agrobacterium</i> sp.			1	73
Ol 11				57	140, 115, 20
Ol 18	<i>Paracoccus</i> sp.			57	140, 20
Ol 24		57		140, 110, 80, 40, 20	
Bi 144	<i>Paracoccus</i> sp.	57		140, 125, 60, 20, 7.5	
Bi 161	<i>Paracoccus</i> sp.	57		140, 78, 20	
Bi 165	<i>Paracoccus</i> sp.	57		140, 100, 45, 20	
Bi 237		57		140, 20	
Bi 271	<i>Paracoccus</i> sp.	57		140, 105, 35, 20	
Bi 1058		57		140, 105, 20	
Bi 1094		57		140, 105, 20	
Bi 1099		57		140, 65, 20, 18, 7.5	
Bi 1590	<i>Paracoccus</i> sp.	57		140, 110, 14	
Bi 1663		57		140, 110, 14	
Bi 1664		57		140, 110, 14	

* Die 16S-rDNA-Sequenzen dieser beiden Bodenisolat zeigen die größten Übereinstimmungen zu der 16S-rDNA-Sequenz von *Stenotrophomonas maltophilia*. Dieser Stamm gehört aber nach der 16S-rDNA-Klassifizierung nicht zur *Stenotrophomonas*-Gruppe, sondern zur Untergruppe *Xanthomonas campestris*.

Der Gesamtplasmidgehalt aller Bodenisolat lag bei 3.2 %, innerhalb der einzelnen Gattungen variierte der Plasmidgehalt sehr stark. Bei der Gattung *Paracoccus* lag der Plasmidgehalt bei 100 %, wohingegen nur 2 % der Isolate aus der Gattung *Arthrobacter* plasmidhaltig waren. Tab. 4 zeigt die Anzahl der plasmidhaltigen Vertreter innerhalb einiger abundanter Gattungen.

Tabelle 4. Übersicht des Plasmidgehaltes einzelner Gattungen.

Gattung	Klasse	Gesamtanzahl der Isolate	Anzahl der plasmidhaltigen Isolate	Plasmidgehalt in %
<i>Pseudomonas</i>	γ-Proteobakterium	361	21	6
<i>Stenotrophomonas</i>		51	1	2
<i>Xanthomonas</i>		34	3	9
<i>Citrobacter</i>		12	2	17
<i>Alcaligenes</i>	β-Proteobakterium	25	2	8
<i>Paracoccus</i>	α-Proteobakterium	14	14	100
<i>Agrobacterium</i>	α-Proteobakterium	13	2	15
<i>Bacillus</i>	low GC-Gram ⁺	235	8	3
<i>Arthrobacter</i>	Actinomyceten	61	1	2

Einige Daten zur Eingruppierung der Bodenisolat in Gattungen wurden der Arbeit von Lin (1998) entnommen.

Zusammenfassung:

Mit der Isolierungsmethode von Ramos-Gonzales konnten von 3055 Bodenisolaten 3.2 % plasmidhaltige (99 Isolate) identifiziert werden. Insgesamt konnten 104 Plasmide detektiert werden. Die einzelnen Bakteriengattungen zeigen Unterschiede im Plasmidgehalt, auffällig ist hier besonders die Gattung *Paracoccus*, die in den untersuchten Bodenproben mit keinem plasmidfreien Bodenisolat vertreten war. Bodenisolat, die mehr als drei Plasmide enthielten, konnten nur innerhalb der Gattungen *Citrobacter*, *Bacillus* und *Paracoccus* detektiert werden. Von den 104 Plasmiden sind 61 % größer als 30 kb und somit groß genug, um für ein konjugatives DNA-Transfersystem zu kodieren.

Die zum Screenen verwendete Plasmidisolierungsmethode nach Ramos-Gonzales *et al.* (1991) ist für kleine Plasmide (< 2 kb) und sehr große Plasmide (> 250 kb) nicht sehr sensitiv. Außerdem ist mit dieser Methode nur die Detektion von ccc-Plasmiden möglich. Da somit lineare, integrierte und Plasmide kleiner als 2 kb und größer als 250 kb nicht detektiert wurden, liegt der Plasmidgehalt der untersuchten Bodenproben sicherlich höher als 3.2 %.

D.2 Charakterisierung der Plasmide

Für die weitergehenden Untersuchungen wurden nur die Gram-negativen Bodenisolat herangezogen.

Die Plasmide wurden, wenn nur ein Plasmid im Bodenisolat vorhanden war, nach der Stamm-Nummer bezeichnet, so erhielt z. B. das Plasmid aus dem Stamm Bi860 die Bezeichnung pBI860. Bei der Bezeichnung von Plasmiden aus Bodenisolaten mit mehreren Plasmiden wurden der Stamm-Nummer folgend die Größe des Plasmides angegeben (z. B. wird das 20 kb Plasmid aus dem Bodenisolat OI18 als pOL1820 bezeichnet).

D.2.1 Restriktionsanalysen ausgewählter Plasmide

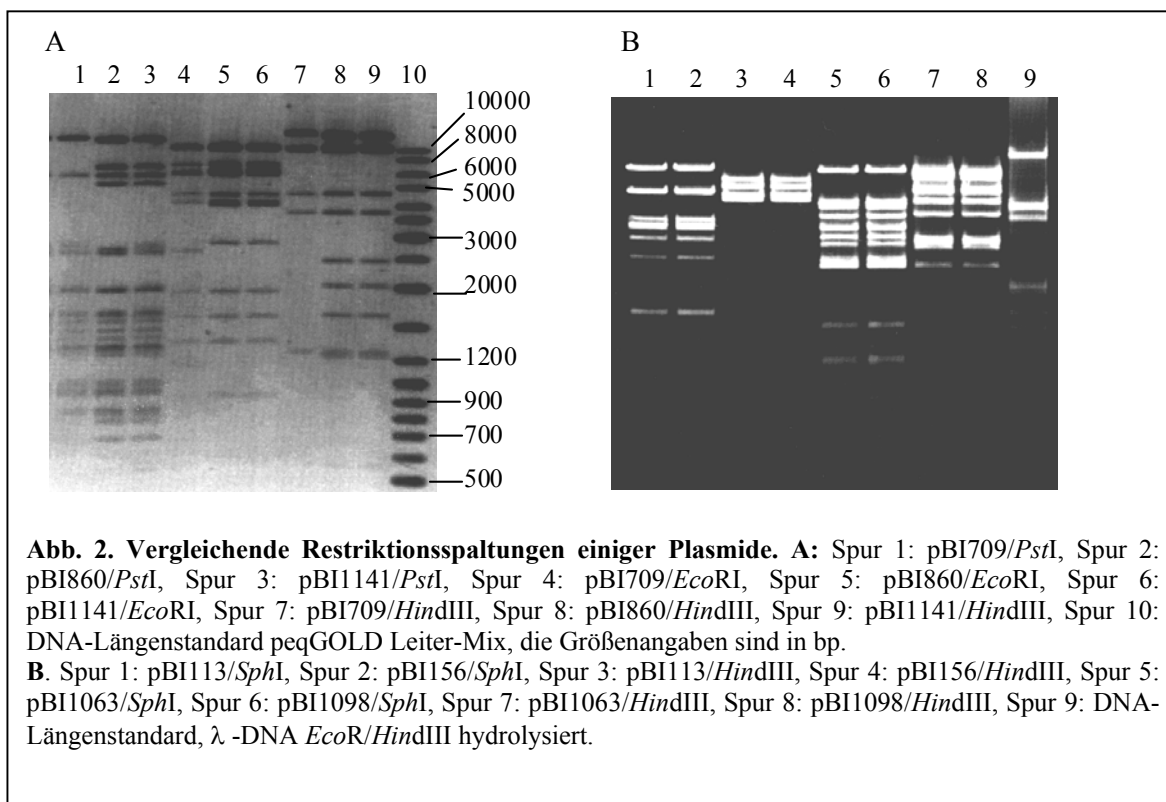
Wie Tab. 3 zu entnehmen ist, scheinen einige Bodenisolat Plasmide gleicher Größe zu besitzen. Restriktionsanalysen sollten nun einen ersten Hinweis darauf geben, ob es sich dabei um identische Plasmide handelt. Das Vorkommen von identischen Plasmiden in unterschiedlichen Bodenisolaten könnte ein erster Hinweis auf einen im Boden erfolgten Gentransfer sein. Für die Restriktionsanalysen wurden die Plasmide über einen CsCl-Gradienten isoliert und mit mindestens zwei Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Abb. 2 zeigt exemplarisch einige vergleichende Restriktionsspaltungen und in Tab. 5 sind die Ergebnisse der Restriktionsspaltungen zusammengefasst.

Dass die beiden Plasmide pBI113 und pBI156 aus *Pseudomonas*-Stämmen und die beiden Plasmide pBI1063 und pBI1098 aus Isolat der Gattung *Stenotrophomonas* sp. identisch sind, lassen die identischen Restriktionsmuster der *SphI*- und *HindIII*-Spaltungen vermuten (Abb. 2 B).

Die Restriktionsmuster der Hydrolysen mit *EcoRI*, *HindIII* und *PstI* sind für die aus Pseudomonaden der ARDRA-Gruppe 19 isolierten Plasmide pBI860 und pBI1141 identisch (Abb. 2 A). Das Plasmid pBI709 aus dem zu der Gattung *Pseudomonas* gehörenden Bodenisolat Bi709 scheint ein Deletionsderivat von pBI860 und pBI1141 zu sein bzw. pBI860 und pBI1141 sind Integrationsderivate von pBI709, da die Restriktionsmuster bis auf einige bei pBI709 fehlende Banden identisch sind (Abb. 2 A). Das 70 kb Plasmid aus dem Bodenisolat Bi569 zeigt andere Restriktionsmuster als die 70 kb großen Plasmide pBI860 und pBI1141 und ist somit nicht identisch mit ihnen (Daten nicht gezeigt).

Die ca. 48 kb großen Plasmide pBI1189 und pKI239, die aus Pseudomonaden der ARDRA-Gruppe 19 stammen, zeigen völlig unterschiedliche Restriktionsmuster und sind somit nicht identisch (Daten nicht gezeigt). Die Plasmide pKI169 und pKI202, beide aus *Pseudomonas*-

Bodenisolate der ARDRA-Gruppe 65, zeigen gleiche Restriktionsmuster und auch die 135 kb und die 10 kb Plasmide der Boden isolate Bi251, Bi1418, Bi1436, Bi1506 und Bi1509 (alle aus der Gattung *Pseudomonas*) ergaben gleiche Restriktionsmuster und sind vermutlich identisch (Daten nicht gezeigt).



D.2.2 Gleiche Plasmide – ein Hinweis auf im Boden erfolgten Gentransfer?

Um zu überprüfen, ob das Vorhandensein gleicher Plasmide in verschiedenen Bodenisolaten ein Ergebnis eines Gentransfers im Boden war oder ob es sich bei diesen Isolaten (siehe Tab. 5) um die gleiche Art und somit vermutlich um Schwesterzellen handelt, wurden die 16S-rDNA-Gene der entsprechenden Stämme über PCR amplifiziert, kloniert und partiell sequenziert. Die taxonomische Einordnung dieser Sequenzen erfolgte über den Vergleich mit Sequenzen des Ribosomal Database Projekt II (RDP) (Maidak *et al.*, 2001). Die Alignments sind in Anhang I dargestellt. Der direkte Vergleich der 16S-rDNA-Sequenzen von Bodenisolaten wurde mit dem ClustalX-Programm (Version 1.81) (Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt. Die Übereinstimmungen der 16S-rDNA-Sequenzen sind in Prozent angegeben, bei Prozentangaben die durch Vergleiche mit Sequenzen des RDP ermittelt wurden, ist dies angegeben.

Eine Analyse der 16S-rDNA-Sequenzen hat gezeigt, dass die 16S-rDNA-Sequenz von Bi113

(684 bp) zu 99.7 % identisch zu der von Bi156 und zu 100 % identisch zu der von Ki173 ist. Die 16S-rDNA-Sequenzen der Bodenisolat Ki173 und Bi113 zeigen 100 % Übereinstimmung (RDP) und die von Bi156 99.9 % Übereinstimmung (RDP) mit einem nicht näher klassifizierten Bakterium (Acc.-Nummer AF078418) der *Pseudomonas*-Gruppe. Bei den Bodenisolaten Bi113 und Bi156 mit identischen 48 kb Plasmiden wird es sich vermutlich um Schwesterzellen handeln, da die 16S-rDNA-Sequenzen fast identisch sind. Bei Ki173 handelt es sich vermutlich um ein Bakterium der gleichen bzw. einer sehr nah verwandten Art, das aber nicht das 48 kb Plasmid pBI113, sondern das 105 kb große Plasmid pKI173 besitzt. Bei der *SphI*-Spaltung der Plasmide pBI113 und pKI173 zeigten sich keine identischen Restriktionsfragmente, so dass es sich bei diesen Plasmiden vermutlich um keine verwandten Plasmide handelt (Daten nicht gezeigt).

Die 16S-rDNA-Sequenzen der Bodenisolat Bi860 und Bi1141, die beide ein identisches 70 kb Plasmid besitzen, sind über einen Bereich von 1012 bp zu 99 % identisch, so dass es sich auch hier um Schwesterzellen handeln könnte. Die 16S-rDNA-Sequenz des Bodenisolates Bi709, dessen Plasmid ein Deletionsderivat der Plasmide aus Bi860 und Bi1141 ist (oder die Plasmide aus Bi860 und Bi1141 sind Integrationsderivate von pBI709), zeigt zu den 16S-rDNA-Sequenzen von Bi860 bzw. Bi1141 ebenfalls über 99 % Identität. Die 16S-rDNA-Sequenz von Bi709 zeigt bei Vergleichen mit Sequenzen des RDP die beste Übereinstimmung mit einem *Pseudomonas putida*-Stamm (Acc.-Nummer D85995) und die Sequenzen von Bi860 und Bi1141 passen am besten zu nicht näher klassifizierten *Pseudomonas*-Stämmen (Acc.-Nummer PSPS1X10 und PSPSX14). Auch hier kann aufgrund einer Übereinstimmung von 99 % bei den 16S-rDNA-Sequenzen nicht eindeutig auf einen Gentransfer geschlossen werden.

Die 16S-rDNA-Sequenz von Bi1098 (640 bp) ist zu 100 % identisch mit der Sequenz des Bodenisolates Bi1063. Die 16S-rDNA-Sequenzen dieser beiden Stämme zeigen bei Vergleichen mit Sequenzen des RDP die besten Übereinstimmungen (98.7 %) zu *Stenotrophomonas maltophilia* HK40 (Acc.-Nummer AJ011332 aus der *Xanthomonas campestris* Untergruppe). Aufgrund der identischen 16S-rDNA-Sequenzen ist davon auszugehen, dass es sich ebenfalls um Schwesterzellen mit dem gleichen Plasmid handelt. Auch die 16S-rDNA-Sequenzen der Bodenisolat Bi251, Bi1436 und Bi1506 sind zu 99 % identisch und geben keinen Hinweis auf einen Gentransfer.

Tabelle 5. Zusammenfassung der 16S-rDNA-Analyse verschiedener Bodenisolat und Ergebnisse der Restriktionsanalysen ihrer Plasmide.

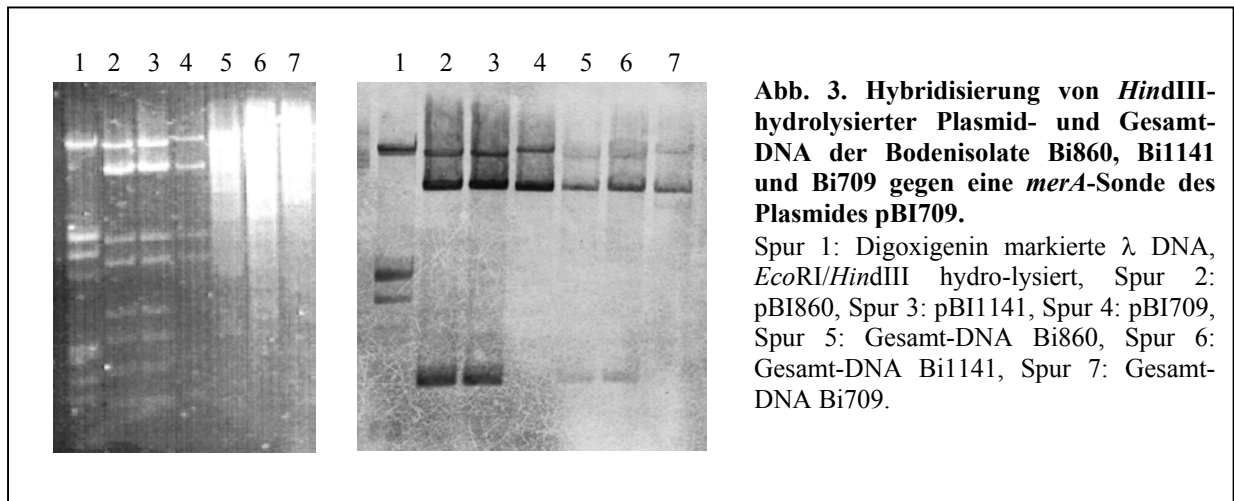
Plasmid	Wirtsbakterien-gattung	16S-rDNA-Übereinstimmung (%)	Plasmid-größe (kb)	Restriktionsmuster
pBI113	<i>Pseudomonas</i> sp.	99.7	48	identisch
pBI156	<i>Pseudomonas</i> sp.		48	
pKI239	<i>Pseudomonas</i> sp.		42	verschieden
pBI1189	<i>Pseudomonas</i> sp.		42	
pBI251	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	135, 10	identisch
pBI1436	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	135, 10	
pBI1418		nt	135, 10	
pBI1506	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	135, 10	
pBI1509		nt	135, 10	
pBI569			70	verschieden
pBI860	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	70	identisch
pBI1141	<i>Pseudomonas</i> sp.		70	
pBI709	<i>Pseudomonas</i> sp.		60	große Übereinstimmung
pKI169	<i>Pseudomonas</i> sp.		130	identisch
pKI202		nt	130	
pBI1063	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	100	68	identisch
pBI1098	<i>Stenotrophomonas</i> sp.		68	

In der dritten Spalte sind die Übereinstimmungen der 16S-rDNA-Sequenz der Bodenisolat gleicher Plasmide aufgeführt. Die Alignments der 16S-rDNA-Sequenzen wurden mit dem ClustalX-Programm durchgeführt. nt: die 16S-rDNA-Sequenz dieses Stammes wurde nicht bestimmt; identisch: die Plasmide zeigen gleiche Restriktionsmuster; große Übereinstimmung: die Restriktionsmuster der Plasmide sind bis auf einige Banden identisch; verschieden: die Restriktionsmuster der Plasmide zeigen keine gleichen DNA-Banden.

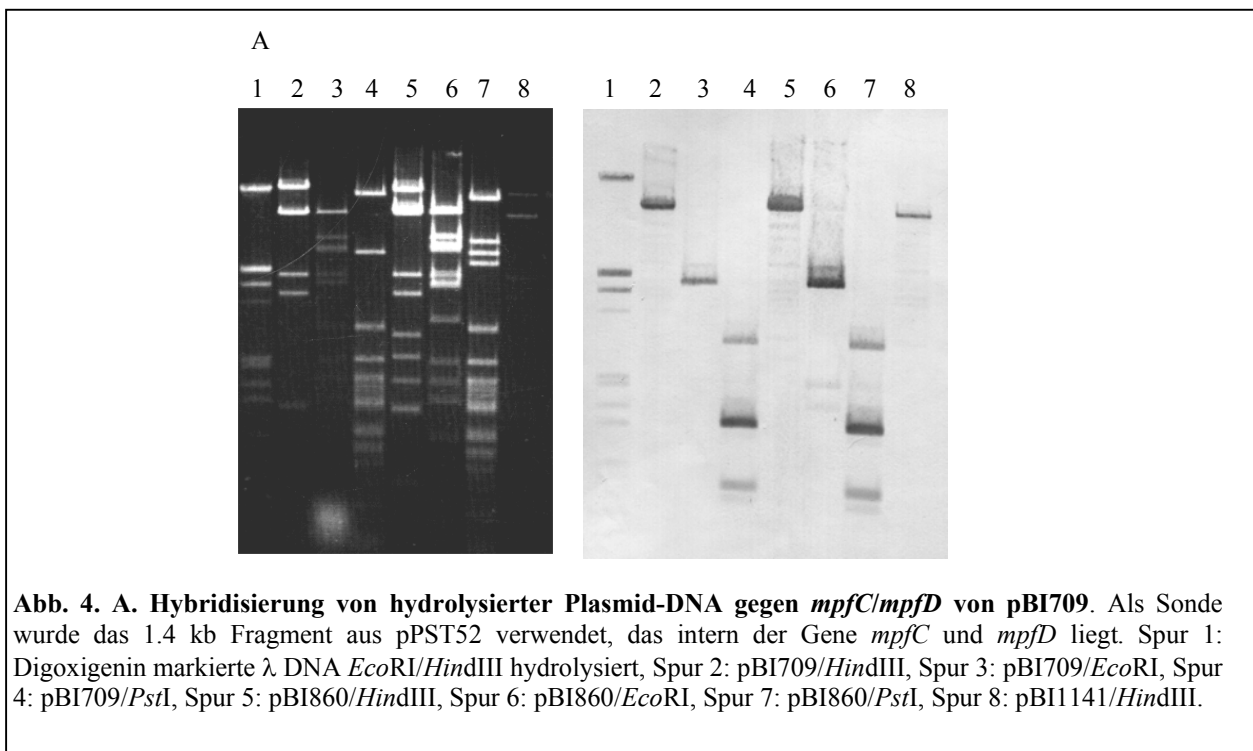
D.2.2.1 Ist pBI709 ein Deletionsderivat von pBI860 bzw. pBI860 ein Integrationsderivat von pBI709?

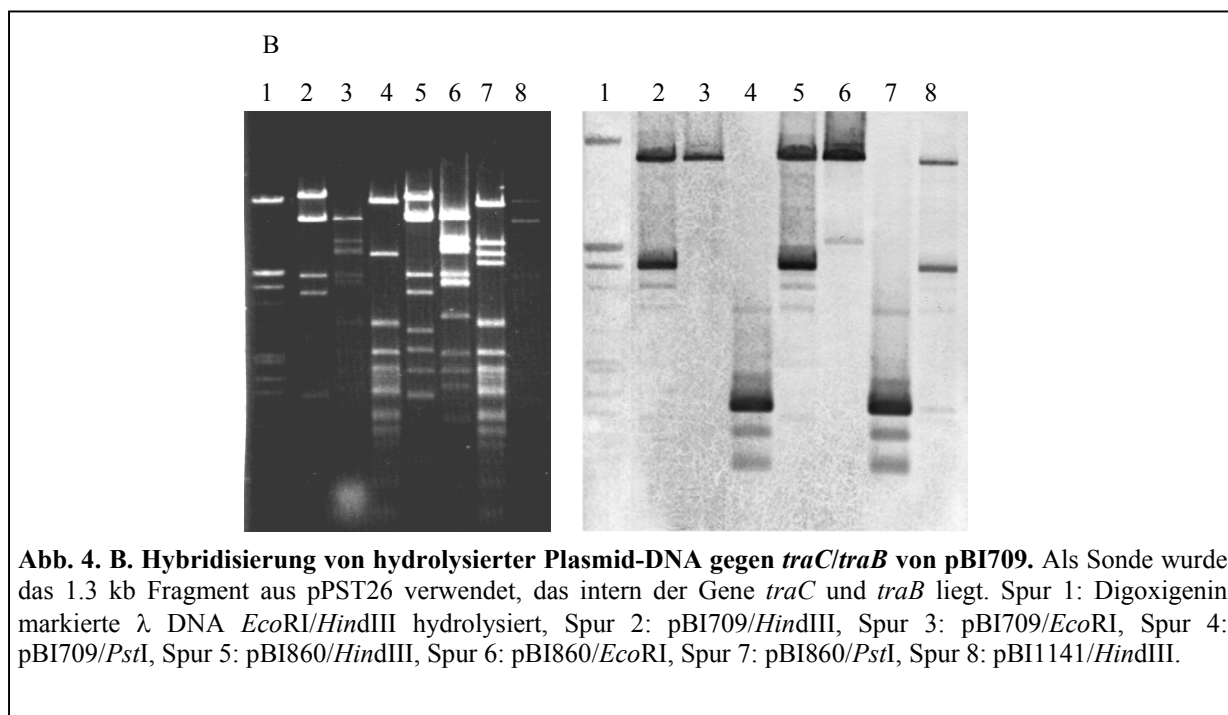
D.2.2.1.1 Hybridisierungsanalysen

Weitere Hinweise darauf, dass pBI709, pBI860 und pBI1141 durch Deletion oder Integration auseinander hervorgegangen sind, liefern Hybridisierungsexperimente mit verschiedenen Sonden. Die drei *Pseudomonas*-Bodenisolate Bi709, Bi860 und Bi1141 ergaben mit dem *merA*-Primerpaar (siehe Abschnitt D.2.3.2) ein Amplifikat. Eine *merA*-Sonde wurde gegen *Hind*III-hydrolysierte pBI860, pBI1141 und pBI709 DNA hybridisiert (siehe Abb. 3). In allen drei Plasmiden gab es ein Signal mit dem 12 kb Fragment, zusätzlich konnte bei pBI860 und pBI1141 ein Signal mit dem 2.5 kb *Hind*III-Fragment detektiert werden, das in Restriktionsspaltungen von pBI709 nicht vorkommt (siehe Abb. 2 A).



Hybridisierungen mit *mpfC/mpfD* (*mating-pair-formation*-Gene aus der Transferregion von pBI709) und *traC/traB* (*dtr*-Gene aus der Transferregion von pBI709) als Sonden gegen mit *Hind*III, *Eco*RI oder *Pst*I hydrolysierte Plasmid-DNA von pBI709, pBI860 und pBI1141 zeigten einheitliche Signalmuster (siehe Abb. 4 A und B). Das bedeutet, die Plasmide pBI860 und pBI1141 besitzen hypothetische Transferegene, die sehr ähnlich oder identisch zu denen von pBI709 sind. Die identischen Signalmuster der Hybridisierung lassen vermuten, dass diese Gene auf allen drei Plasmiden gleich organisiert sind.





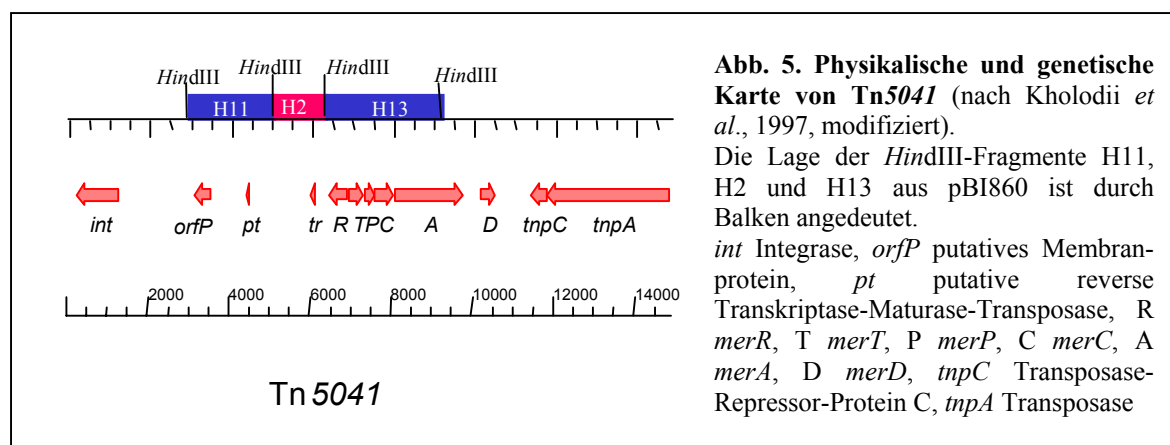
D.2.2.1.2 Welche zusätzliche Genfracht tragen die Plasmide pBI860 und pBI1141?

Der Vergleich der *HindIII*-Restriktionsspaltungen von pBI709, pBI860 und pBI1141 hat gezeigt, dass bei pBI709 drei Fragmente von 2.5 kb, 2.1 kb und 1.6 kb fehlen. Da pBI860 und pBI1141 in allen Restriktionsanalysen und Hybridisierungen identische Ergebnisse zeigten, wurde davon ausgegangen, dass diese Plasmide identisch sind.

Die *HindIII*-Fragmente von pBI860, die in pBI709 nicht auftraten, wurden in pUC13 kloniert und mit den *universal* und *reverse* M13 Primern sequenziert. Die sequenzierten DNA-Bereiche sind auf DNA-Ebene bis zu 99 % identisch zu den Transposons *Tn5041* (Kholodii *et al.*, 1997) (Acc.-Nummer X98999) und *Tn5041D* (Acc.-Nummer Y18978). In Tab. 6 sind die einzelnen Übereinstimmungen aufgeführt und die Abb. 5 zeigt die Lage der pBI860 *HindIII*-Klone in Bezug zum *Tn5041*.

Tabelle 6. Übersicht der Sequenzanalyse des *mer*-Operons auf pBI860.

Hybridplasmid	Fragmentgröße (bp)	seq. Bereich/ Primer	Bereiche/Übereinstimmung (%) BlastN	Identität/Ähnlichkeit (%) BlastX
p860H11	2100	600 bp/ rev	<i>Tn5041</i> : 3220-3817 bp (99)	mögl. Porin (100)
		600 bp/ uni	<i>Tn5041</i> : 4730-5282 bp (99)	–
p860H2	1600	600 bp/ uni	<i>Tn5041</i> : 5306-5906 bp (99)	–
		600 bp/ rev	<i>Tn5041</i> : 6545-5945 bp (98)	MerR (100/100)
p860H13	2500	600 bp/ uni	<i>Tn5041</i> : 6549-7086 bp (95)	MerR (98/98) MerT (100)
		600 bp/ rev	<i>Tn5041D</i> : 735-136 bp (99)	MerA (98/98)



Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der sequenzierten Bereiche sind homolog zu der Quecksilberreduktase MerA, dem Regulatorprotein MerR, dem Quecksilbertransportprotein MerT und zu einem möglichen Porin von Tn5041. Die Bereiche der Hybridplasmide, die keine offenen Leseraster zeigen, sind homolog zu den entsprechenden nicht kodierenden Bereichen von Tn5041 (siehe Tab. 6).

Die drei *Hind*III-Fragmente des Plasmides pBI860 sind ähnlich einem Teil eines Transposons, das Quecksilberresistenzgene trägt. Bei pBI709 fehlen diese DNA-Bereiche des Tn5041 ähnlichen Transposons, so dass es sich bei pBI860 und pBI1141 wahrscheinlich um Derivate von pBI709 handelt, in die ein Tn5041 ähnliches Transposon integriert ist.

Zusammenfassung:

Mit Hilfe von Restriktionsanalysen konnten die folgenden Plasmide aus Pseudomonaden als identisch eingestuft werden: **1.)** pBI113 und pBI156, **2.)** pKI169 und pKI202 und **3.)** die 135 kb und die 10 kb Plasmide aus den Isolaten Bi251, Bi1418, Bi1436, Bi1506, Bi1509. Bei keinem dieser Plasmide konnte schon durch die 16S-rDNA-Sequenzanalyse ein Plasmidtransfer nachgewiesen werden. Allerdings ist die 16S-rDNA-Analyse allein nicht ausreichend, um eine taxonomische Artbestimmung durchführen zu können. So zeigen z. B. *Bacillus psychrophilus* und *Bacillus globisporus* auf 16S-rDNA-Ebene 99.8 % Übereinstimmung, aber nur 23 % Identität in DNA-Hybridisierungs-Analysen (Busse *et al.*, 1996). Die Identität der 16S-rDNA-Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Bodenisolat ist kein Beweis dafür, dass es sich notwendigerweise um gleiche Arten handelt. Bei Bodenisolaten mit identischen 16S-rRNA-Genen und gleichen Plasmiden könnte es sich um zwei unterschiedliche Bakterien-Arten handeln, die gleiche Plasmide über Gentransfer erworben haben. Eindeutige Beweise für einen solchen Gentransfer können nur durch weitere taxonomische Analysen, wie

z. B. durch DNA-DNA- oder DNA-RNA-Hybridisierungen, Fettsäureanalysen, Bestimmung der 23S-rDNA-Sequenz, Bestimmung der β -Untereinheit der ATP-Synthase, Analyse von Zuckern, Analyse der Lipopolysaccharidzusammensetzung u. a. (Busse *et al.*, 1996) erfolgen, bei denen gezeigt wird, dass die Bodenisolat zu verschiedenen Arten gehören.

Die Plasmide pBI860 und pBI1141 (beide aus *Pseudomonas*-Stämmen) sind anscheinend identisch. Es handelt sich bei beiden um Transposon-Integrationsderivate des Plasmides pBI709 (aus einem *Pseudomonas*-Stamm). Auf allen drei Plasmiden konnten Quecksilberresistenz- und Transferegene detektiert werden.

Die beiden Plasmide pBI1063 und pBI1098 sind identisch und auch die 16S-rDNA-Analysen der Wirtsstämme ergaben 100 % Sequenzübereinstimmung, so dass es auch hier bisher keine Hinweise auf einen im Boden erfolgten Plasmid-Transfer gibt.

D.2.3 Antibiotikaresistenzen und Schwermetallresistenzen

Die in Tab. 3 aufgeführten Plasmide sollten auf ihre Fähigkeit zur Konjugation getestet werden. Um den Plasmidtransfer nachweisen zu können, müssen die Plasmide ein Markergen (z. B. eine Antibiotikaresistenz oder eine Schwermetallresistenz) tragen, auf das selektioniert werden kann. Zusätzlich müssen die Antibiogramme der Kreuzungspartner bekannt sein, um Rezipienten und Donoren (Bodenisolate) unterscheiden zu können.

Die folgenden Tests sollten einen Hinweis darauf geben, ob die Plasmide Antibiotika- und/oder Schwermetallresistenzgene tragen.

D.2.3.1 Antibiotikaresistenztest

Die Antibiotikaresistenztests wurden mit Antibiotikatestplättchen der Firma Oxoid oder mit ½ TBX-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum durchgeführt. Es wurden folgende Antibiotikakonzentrationen getestet: Nalidixinsäure (30/50 $\mu\text{g/ml}$), Streptomycin (25/100 $\mu\text{g/ml}$), Gentamicin (30 $\mu\text{g/ml}$), Chloramphenicol (30/50 $\mu\text{g/ml}$), Kanamycin (30/50 $\mu\text{g/ml}$), Tetracyclin (10 $\mu\text{g/ml}$) und Rifampicin (100 $\mu\text{g/ml}$).

Zeigte sich auf den Antibiotikaplatten ein Bakterienrasen, so wurde dies als Resistenz (+) gewertet. Bodenisolat, die nur bei der geringsten getesteten Antibiotikakonzentration wuchsen, sind in der Tab. 7 mit (+) bezeichnet. In den Plättchentests wurde das Fehlen eines Hemmhofes um das Antibiotikaplättchen als Zeichen einer Resistenz angesehen. Wuchsen in dem Hemmhof um die Antibiotikaplättchen vereinzelte Kolonien, so wurden diese Bakterienstämme auf Antibiotikaplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Zeigten

sich auch hier nur vereinzelte Kolonien, so wurde dies als sensitiv gewertet.

In Tab. 7 sind die Antibiogramme der Bodenisolatate zusammengefasst. Zusätzlich zu den plasmidhaltigen Isolataten wurden auch plasmidfreie Bodenisolatate getestet (Daten nicht gezeigt). Die plasmidfreien Bodenisolatate einer ARDRA-Gruppe zeigten die gleichen Antibiogramme wie ihre plasmidhaltigen Gruppenmitglieder. So sind z. B. die isolierten Vertreter der Xanthomonaden Tetracyclin- und Ampicillin-resistent, Agrobakterien der ARDRA-Gruppe 2 sind Nalidixinsäure- und Kanamycin-resistent und viele Pseudomonaden sind Ampicillin-resistent. Anhand dieser Daten konnte keine Korrelation zwischen Antibiotikaresistenz und Plasmidgehalt einzelner Bodenisolatate ermittelt werden.

Tabelle 7. Antibiogramme der plasmidhaltigen Bodenisolatate.

Stamm	ARDRA	Gattung	Nx	Gm	Cm	Km	Ap	Sm	Rif	Tc
Ki173	19	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Ki239	19		-	-	-	-	-	-	-	-
Bi1189	19		-	-	(+)	-	+	-	-	-
Bi113	19		-	-	+	-	+	-	-	-
Bi156	19		-	-	+	-	+	-	-	-
Bi173	19		-	-	-	-	+	-	-	-
Bi251	19		-	-	-	-	+	-	-	-
Bi1418	19		-	-	-	-	+	-	-	-
Bi1436	19		-	-	-	-	+	-	-	-
Bi1506	19		-	-	-	-	+	-	-	-
Bi1509	19		-	-	-	-	+	-	-	-
Bi746	19		(+)	-	+	-	+	-	-	-
Bi860	19		-	-	+	-	+	-	-	-
Bi569	19		-	-	-	-	+	-	-	-
Bi1141	19		-	-	+	-	+	-	-	-
Bi1185	19		-	-	+	-	+	-	-	-
Bi64	19		-	-	+	-	+	-	-	-
Bi382	19		-	-	+	-	+	-	-	-
Bi709	23		-	-	+	-	+	-	-	-
Ki169	65		(+)	-	+	-	+	-	-	-
Ki202	65	(+)	-	+	-	+	-	-	-	
Bi1063	17	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
Bi1098	17		-	-	-	-	+	-	-	+
Bi1363	17		-	-	-	-	+	-	-	+
Bi147	6	<i>Alcaligenes sp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	-
Bi203	6		+	-	-	-	+	-	-	-
Ki163a	76	<i>Citrobacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Ki163b	76		-	-	-	-	-	-	-	-
Bi563	2	<i>A. tumefaciens</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
Bi1087	1		-	-	-	-	-	-	-	-

+ resistent, (+) resistent bei der niedrigsten getesteten Antibiotikakonzentration, - sensitiv.

Fortsetzung Tabelle 7.

Stamm	ARDRA	Gattung	Nx	Gm	Cm	Km	Ap	Sm	Rif	Tc
O11	57	<i>Paracoccus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
O18	57		+	-	-	-	-	-	-	-
O124	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi144	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi161	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi165	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi237	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi271	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi1058	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi1094	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi1099	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi1590	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi1663	57		+	-	-	-	-	-	-	-
Bi1664	57		+	-	-	-	-	-	-	-

+ resistent, (+) resistent bei der niedrigsten getesteten Antibiotikakonzentration, – sensitiv.

D.2.3.2 Schwermetallresistenztest

Die Bodenisolat wurden auf Resistenzen gegen Kobalt, Nickel, Kupfer, Zink und Quecksilber getestet. Der Test auf das Vorhandensein einer Quecksilberresistenz erfolgte mittels PCR mit *merA*-spezifischen Primern (Liebert *et al.* 1997). Nur bei den Bodenisolaten Bi709, Bi860 und Bi1141, die zu der Gattung *Pseudomonas* gehören, wurde ein *merA*-Amplifikat erhalten. Gegen eine *merA*-Sonde hybridisierten bei pBI860 und pBI1141 jeweils zwei *Hind*III-Restriktionsfragmente, während bei pBI709 nur ein Signal detektiert wurde (siehe Abb. 3). Dies könnte bedeuten, dass pBI860 bzw. pBI1141 zwei *merA*-Gene besitzen, während pBI709 nur ein *merA* besitzt, oder dass pBI709 in seinem *merA*-Gen keine *Hind*III-Schnittstelle besitzt, die bei den *merA*-Genen von pBI860 und pBI1141 vorhanden ist. Bei pBI860 und pBI1141 scheint es sich um Integrationsderivate von pBI709, in die ein Tn5041 bzw. ein Tn5041 verwandtes Transposon integriert ist, zu handeln (siehe Abschnitt D.2.2.1.2). Da diese Transposons Quecksilberresistenzgene tragen (Kholodii *et al.*, 1997), könnte durch die Transposon-Integration ein zweites *merA*-Gen hinzugekommen sein.

Die Untersuchung zur Resistenz gegen die anderen Schwermetalle wurde auf CoCl₂ (0.6 mM), CdCl₂ (0.8 mM), NiCl₂ (0.6 mM) und ZnCl₂ (1 mM) haltigen Minimalmedien durchgeführt. Die meisten Bodenisolat zeigten auf dem verwendeten Minimalmedium ein geringes Wachstum, so konnte in einigen Fällen kaum zwischen Sensitivität gegen das entsprechende Schwermetall oder geringem Wachstum aufgrund des Minimalmediums unterschieden werden. Die Bodenisolat wurden deshalb immer parallel auf Minimalmedium ohne

Schwermetall und auf Minimalmedien mit den zu testenden Schwermetallen ausplattiert. Bodenisolat, die einen Rasen auf den entsprechenden Schwermetallmedien bildeten, wurden als resistent bezeichnet. In Tab. 8 sind die Bodenisolat aufgeführt, für die eine eindeutige Resistenz ermittelt werden konnte. Hybridisierungen mit einer *merA*-Sonde haben gezeigt, dass die Quecksilberresistenz der Bodenisolat Bi709, Bi860 und Bi1141 plasmidkodiert ist. Bei Kreuzungen mit dem Nickel-resistenten plasmidhaltigen Bodenisolat Bi709 und dem Nickel-sensitiven *Pseudomonas putida* PaW340 konnten keine Transkonjuganten gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Konjugationsexperimente mit einer Transposonmutante des Plasmides pBI709 und *Pseudomonas putida* PaW340 (siehe Abschnitt D.2.5.3) haben gezeigt, dass pBI709 konjugativ ist. Die Transkonjuganten *Pseudomonas putida* PaW340 (pBI709) wuchsen nicht auf nickelhaltigem Medium. Dies könnte bedeuten, dass entweder die Nickelresistenz nicht auf pBI709 lokalisiert ist, oder dass die Nickelresistenz in *Pseudomonas putida* PaW340 nicht ausgeprägt wird. Viele Schwermetallresistenzoperons sind induzierbar, so wird z. B. die Nickelresistenz von pMOL28 (aus *Alcaligenes eutrophus*) gegen 3 mM Nickel durch 0.5 mM Nickel während des Wachstums erworben (Siddiqui *et al.*, 1988) und die Cadmium- und Kobaltresistenz von *A. eutrophus* CH34 konnte nur beobachtet werden, wenn der Stamm mit Zink induziert wurde (Diels *et al.*, 1995). Solch eine fehlende Induktion könnte auch bei den hier getesteten Bodeninsolaten der Grund für das geringe Wachstum auf den Schwermetallmedien und bei einigen Bodenisolaten für eine nicht ermittelte Resistenz sein. Da aus Zeitgründen nicht für alle 54 Bodenisolat und die dazugehörigen plasmidfreien Rezipientenstämme das geeignete Minimalmedium und die eventuell notwendigen Induktoren zur Ausprägung der Schwermetallresistenz ermittelt werden konnten, wurde auf weitere Experimente zur Ermittlung plasmidkodierter Schwermetallresistenzen und zur Konjugation möglicher Schwermetallresistenzplasmide verzichtet.

Tabelle 8. Schwermetallresistenzen der Bodenisolat.

Schwermetall	<i>Citrobacter</i>		<i>Agrobacterium</i>		<i>Alcaligenes</i>		<i>Pseudomonas</i>						<i>Paracoccus</i>										
	Ki163a	Ki163b	Bi1087	Bi563	Bi147	Bi203	Bi709	Bi860	Bi1141	Bi251	Bi1418	Bi1436	Bi1506	Bi1509	Bi169	Bi237	Bi271	Bi1058	Bi1094	Bi1590	Bi1663	Bi1664	
Co	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cd	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ni	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hg	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Es wurden alle 54 Bodenisolat auf Kobalt, Kupfer, Nickel, Zink und Quecksilber getestet. In der Tabelle sind nur diejenigen aufgeföhrt, die eine Resistenz zeigen.

D.2.4 Zuordnung der Plasmide zu bekannten Inkompatibilitätsgruppen (Inc-Gruppen)

Für die Detektion von IncN-, IncW-, IncP- und IncQ-Plasmiden wurden die von Götz *et al.* (1996) entwickelten PCR-Primer verwendet. Mit den IncN-, IncW- und IncP- spezifischen Primern konnte mit keinem Plasmid ein eindeutiges Amplifikat der richtigen Größe erhalten werden. Auch die PCR mit den IncQ-spezifischen Primern *repB* und *oriT* lieferte kein PCR-Produkt. Nur mit dem IncQ-spezifischen *oriV*-Primerpaar wurde mit den Bodenisolaten O111, O118, Bi144 und Bi1094 (alle Stämme gehören zur Gattung *Paracoccus*) ein Amplifikat der richtigen Größe erhalten. Bei der Hybridisierung von ungespaltener Plasmid-DNA der Bodenisolat O111, O118, Bi144 und Bi1094, die nach der Methode von Ramos-Gonzales *et al.* (1991) isoliert wurde, gegen eine Sonde des IncQ *oriV*-Amplifikates von O111, konnten bei allen vier Bodenisolaten Signale mit einem etwa 140 kb großen Plasmid detektiert werden. Da bisher so große IncQ-ähnliche Plasmide nicht bekannt sind (Rawlings und Tietze, 2001), wurden diese vier Paracocccen-Isolate zusätzlich mit dem IncQ-spezifischen *repC*-Primerpaar (E. Tietze, Wernigerode) in einer erneuten PCR getestet. Allerdings war in diesen vier Stämmen das *repC*-Gen von IncQ-ähnlichen Plasmiden nicht nachweisbar.

Die Sequenzierung der IncQ *oriV*-PCR-Produkte und anschließende Analyse ergab, dass alle vier PCR-Produkte identisch sind (repräsentativ ist die Sequenz des Bodenisolates O111 im

Anhang I, Seite 6 dargestellt). Die erhaltenen DNA-Sequenzen zeigten auf DNA-Ebene keine Übereinstimmungen mit IncQ-ähnlichen Sequenzen. In allen Sequenzen konnte das gleiche offene Leseraster gefunden werden, das Ähnlichkeiten zu Sensor-Histidin-Kinasen (Identität 38 % / Ähnlichkeit 54 %) zeigt (Daten nicht gezeigt). Solche Histidin-Kinasen sind Bestandteil von Zwei-Komponenten-Systemen und regulieren z. B. die Sporulation in *Bacillus*.

Da nur einer von vier IncQ-spezifischen PCR-Primern ein Amplifikat ergab und die Sequenz dieses Amplifikates keine Ähnlichkeiten zu IncQ-ähnlichen Sequenzen zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass die Bodenisolat O111, O118, Bi144 und Bi1094 kein IncQ-Plasmid enthalten.

Zur Zeit stehen 20 verschiedene Inc-spezifische Hybridisierungssonden zur Verfügung (Couturier *et al.*, 1988). In Hybridisierungen konnten mit ausgewählten Sonden zur Detektion von IncK-, T-, X-, W-, P-, Q-, Y-Gruppen keine positiven Signale mit den Bodenisolaten detektiert werden. In der Literatur wurde auch für andere Plasmide aus Umweltisolaten beschrieben, dass die meisten von ihnen keiner der bekannten Inc-Gruppen zugeordnet werden konnten (Dahlberg *et al.*, 1997; Drønen *et al.*, 1999).

Zusammenfassung:

Bei den 91 untersuchten Plasmiden konnten nur für die zwei (drei) Plasmide pBI860/pBI1141 und pBI709 Quecksilberresistenzgene detektiert werden, alle anderen getesteten Schwermetallresistenzen konnten nicht eindeutig einem Plasmid zugeordnet werden. Bei keinem der Bodenisolat konnte eindeutig eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz detektiert werden. Auch konnten die Plasmide der Bodenisolat keiner der bisher bekannten Inc-Gruppen zugeordnet werden und scheinen bisher noch nicht charakterisierte Inc-Gruppen zu repräsentieren.

D.2.5 Bestimmung des Gentransferpotentials

Zum Nachweis von Transfergenen auf den Bodenplasmiden wurden ausgewählte Boden-
isolate auf ihre Fähigkeit zur Konjugation und zur Mobilisierung von IncQ-Plasmiden über-
prüft. Die Experimente sind in den Abschnitten D.2.5.1 und D.2.5.3 beschrieben.

D.2.5.1 Mobilisierung von pSunny durch Plasmide aus Bodenisolaten

Ein indirekter Test auf das Vorhandensein konjugativer Plasmide in den Bodenisolaten er-
folgte durch die Mobilisierung eines RSF1010-Derivates (pSunny). Da nicht bekannt ist, in
welchen Rezipienten die Bodenplasmide replizieren können, kann durch die Mobilisierung
des *broad-host-range* Plasmides pSunny ein breiteres Spektrum an Rezipienten abgedeckt
werden. Außerdem können mit dieser Methode auch integrierte Plasmide mit Gentransfer-
potential nachgewiesen werden. Bei RSF1010 (Derbyshire *et al.*, 1987) und seinen Derivaten
handelt es sich um nicht-konjugative *broad-host-range* Plasmide der Inkompatibilitätsgruppe
Q. Bei Koexistenz mit konjugativen Plasmiden können RSF1010 und seine Derivate mobili-
siert werden. Das mobilisierbare Plasmid besitzt *mob*-Gene, die für Proteine des Relaxosoms
kodieren. Die weiteren zum Transfer benötigten Proteine werden vom konjugativen Plasmid
zur Verfügung gestellt. pSunny besitzt die Replikations- und Mobilisierungsfunktionen von
RSF1010, ein Kanamycin- und Streptomycinresistenzgen und ein modifiziertes *gfp*, das
konstitutiv exprimiert wird (Güttler, 1998). pSunny liegt in *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983)
vor und wird durch Mobilisierung in die Bodenisolate transferiert. In Tab. 9 sind nur die
Bodenisolate aufgelistet, für die diese Mobilisierung erfolgreich war.

Logarithmisch wachsende Kulturen der Bodenisolate (Titer $1-3 \times 10^8$ /ml) wurden mit log-
arithmisch wachsenden Kulturen von *E. coli* S17-1 (pSunny) im Verhältnis 1:1 vermischt und
zusammen auf einem Cellulose-Nitrat-Filter über Nacht bei 28 °C bebrütet. Die Filterkulturen
werden auf geeigneten Selektionsmedien ausplattiert (siehe Tab. 9; vgl. D 2.3.1, Tab. 7).

Tabelle 9. Übersicht der verwendeten Selektionsmedien bei der Mobilisierung von pSunny in die Bodenbakterien.

Stamm x pSunny	Gattung	Transkonjuganten-Selektionsmedium ½ TBY mit
O111	<i>Paracoccus</i> sp.	Nalidixinsäure 50 µg/ml + Kanamycin 50 µg/ml
O118		
O124		
Bi144		
Bi237		
Bi1094		
Ki163a*	<i>Citrobacter</i> sp.	
Bi147	<i>Alcaligenes</i> sp.	
Bi709	<i>Pseudomonas</i> sp.	Chloramphenicol 50 µg/ml + Kanamycin 50 µg/ml
Bi860		
Bi156		
Bi64		
Bi251		
Bi382		
Ki202		
Bi563	<i>Agrobacterium</i> sp.	Chloramphenicol 50 µg/ml + Streptomycin 100µg/ml
Ki173**	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rifampicin 100 µg/ml + Kanamycin 50 µg/ml
Bi1098	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Ampicillin 150 µg/ml + Kanamycin 50 µg/ml
Bi1363		

* Nalidixinsäure-resistente Mutante von Ki163a, ** Rifampicin-resistente Mutante von Ki173.

Für die in Tab. 9 aufgelisteten Bodenisolat war der Transfer von pSunny in das Bodenisolat erfolgreich. Transkonjuganten können durch das konstitutiv exprimierte *gfp* des pSunny-Plasmides unter UV-Licht an der grünfluoreszierenden Farbe erkannt werden. Zusätzlich wurden die Bodenisolat mit der Plasmidisolierungsmethode nach Ramos-Gonzales *et al.* (1991) auf das Vorhandensein von pSunny untersucht.

Welche Bodenisolat in der Lage sind, pSunny zu mobilisieren, wurde durch Kreuzungen von pSunny-haltigen Bodenisolaten mit verschiedenen Rezipienten (die stabile Etablierung von pSunny in den Rezipienten wurde in Vorversuchen getestet) auf Cellulose-Nitrat-Filter überprüft (Durchführung der Kreuzungen siehe vorherigen Abschnitt). Die Ergebnisse sind in Tab. 10 dargestellt, eine Mobilisierung von pSunny wurde durch mindestens zwei unabhängige Kreuzungen bestätigt. Ein nicht detektierter Transfer von pSunny ist das Ergebnis von mindestens fünf unabhängigen Kreuzungen.

Teilweise wurden zwei Rezipienten einer Gattung getestet, da mit beiden Rezipienten das gleiche Ergebnis erzielt wurde, sind die Daten der Einzelkreuzungen in Tab. 10 zusammen aufgeführt.

Tabelle 10. Ergebnisse der Mobilisierung von pSunny (pS) durch verschiedene Bodenisolat.

Donor	Plasmidgrößen (kb)	Gattung/ Proteobakterien- Gruppe	Rezipient							
			Proteobakteriengruppe			α	β	γ		
			<i>Paracoccus aminophilus</i>	<i>Agrobacterium</i> (Bi850 + Bi1696)	<i>Alcaligenes</i>	<i>P. putida</i> PaW340	<i>E. coli</i> (C600 + Ec294)	<i>Xanthomonas</i> (Bi903 + Bi1062)	<i>Stenotrophomonas</i>	
Ol11 pS	140, 115, 20	<i>Paracoccus/</i> α	–	nt	nt	–	–	nt	nt	
Ol18 pS	140, 20		–	nt	nt	–	–	nt	nt	
Ol24 pS	140, 110, 80, 40, 20		–	–	–	–	nt	–	nt	
Bi144 pS	140, 125, 60, 20, 7.5		–	nt	nt	–	nt	nt	nt	
Bi237 pS	140, 20		nt	nt	–	–	nt	–	nt	
Bi1094 pS	140, 105, 20		–	nt	nt	+	nt	nt	nt	
Bi563 pS	110	<i>Agrobacterium/α</i>	–	–	–	–	–	nt	nt	
Bi147 pS	7	<i>Alcaligenes/β</i>	nt	–	+	+	–	–	–	
Bi709 pS	60	<i>Pseudomonas/</i> γ	–	nt	nt	+	+	nt	nt	
Bi860 pS	70		–	–	nt	+	+	nt	nt	
Ki173 pS	105		–	–	nt	+	+	nt	nt	
Bi156 pS	48		nt	–	–	–	–	nt	–	
Ki239 pS	42		nt	–	nt	–	–	nt	–	
Bi64 pS	125		–	nt	nt	–	–	nt	nt	
Bi382 pS	22		nt	nt	nt	–	–	nt	nt	
Bi251 pS	135, 10		nt	–	–	+	–	nt	nt	
Ki202 pS	130		nt	nt	nt	–	–	nt	nt	
Bi1098 pS	68	<i>Stenotrophomonas/γ</i>	nt	nt	nt	–	–	–	nt	
Bi1363 pS	125		nt	nt	–	–	–	–	nt	
Ki163a pS	140, 125, 110, 50, 2.5	<i>Citrobacter/γ</i>	nt	nt	nt	–	–	nt	nt	

Im Einzelnen wurden die folgenden Rezipienten eingesetzt. *E. coli*: Ec294 Rif^r, C600 Rif^r; *Xanthomonas*: Bi903, Bi1062 (Selektion Rif/Sm), *Alcaligenes*: Bi809, *Agrobacterium*: Bi850 (Selektion Rif/Sm), Bi1696. Die Selektion erfolgte, wenn nicht anders angegeben, auf ½ TBY mit Rifampicin 100 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml.

Von allen getesteten Paracoccen konnte nur das Bodenisolat Bi1094 pSunny mobilisieren. Die Mobilisierung konnte nur mit *Pseudomonas putida* PaW340 als Rezipienten nachgewiesen werden, zusätzlich zu pSunny konnte auch das 20 kb Plasmid pBI109420 in *P. putida* PaW340 detektiert werden. Hier erfolgte ein Transfer von pSunny und dem Plasmid pBI109420 aus einem Donorbakterium der α-Proteobakterien-Gruppe in einen Rezipienten der γ-Proteobakterien-Gruppe, d. h. bei dem Plasmid pBI109420 handelt es sich um ein *broad-host-range* Plasmid.

Der Transfer von pSunny durch die plasmidhaltigen *Pseudomonas*-Bodenisolate Bi709, Bi860 und Ki173 konnte nur mit Rezipienten, die ebenfalls zu der γ-Proteobakterien-Gruppe (*Pseudomonas putida* PaW340 und *E. coli* C600 und EC294) gehören, nachgewiesen werden.

In keinem der Rezipienten wurde außer pSunny eines der Plasmide aus den Bodenisolaten detektiert. Das Bodenisolat Bi251 mobilisierte pSunny nur in den *Pseudomonas putida* PaW340-Stamm, mit allen anderen Rezipienten konnte kein Transfer beobachtet werden. Da alle Donorstämme plasmidhaltig waren, können die Plasmide pBI709, pBI860 und pKI173 für die Mobilisierung von pSunny verantwortlich sein. Das Bodenisolat Bi251 besitzt zwei Plasmide (135 kb und 10 kb), von denen das 10 kb Plasmid zu klein ist, um für ein funktionelles konjugatives Transfersystem zu kodieren. Deshalb wird vermutet, dass auf dem 135 kb Plasmid ein Konjugationssystem lokalisiert ist. Allerdings kann auch bei den plasmidhaltigen Bodenisolaten nicht ausgeschlossen werden, dass integrierte Plasmide vorhanden sind, die Gentransferpotential besitzen.

In dem zu der Gattung *Alcaligenes* (β -Proteobakterien-Gruppe) gehörenden Bodenisolat Bi147 konnte nur ein ca. 7 kb großes Plasmid detektiert werden, das aber zu klein ist, um für ein vollständiges Konjugationssystem zu kodieren. Da auch dieser Stamm in der Lage war, pSunny zu mobilisieren, enthält dieser Stamm entweder ein nicht-detektiertes konjugatives Megaplasmid oder ein chromosomalkodiertes Konjugationssystem. Ein Transfer von pSunny aus Bi147 konnte mit Rezipienten der β - und γ -Proteobakterien-Gruppe nachgewiesen werden.

Exemplarisch wurden die Mobilisierungsfrequenzen von Ki173 pS und Bi709 pS bestimmt (Tab. 11). Die Mobilisierungsrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten (Rezipient + pS) pro Anzahl der Rezipienten berechnet.

Tabelle 11. Mobilisierungsraten von Ki173 pS und Bi709 pS.

Donor	Gattung	Rezipient		
		<i>E. coli</i> Ec294 Mob.-Rate	<i>E. coli</i> C600 Mob.-Rate	<i>P. putida</i> PaW340 Mob.-Rate
Ki173 pS	<i>Pseudomonas</i> sp.	2.2×10^{-3}	4.3×10^{-5}	6.9×10^{-8}
Bi709 pS	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.7×10^{-6}	2.2×10^{-5}	5.3×10^{-8}

Die Mobilisierungsraten von mobilisierbaren Plasmiden (wie z. B. RSF1010, ColE1) durch ein bestimmtes Konjugationssystem hängen von der Interaktion des Relaxosoms des mobilisierbaren Plasmides und des *coupling*-Proteins des konjugativen Plasmides ab. Wie Cabezón *et al.* (1997) zeigen konnten, werden verschiedene mobilisierbare Plasmide durch das gleiche Konjugationssystem mit unterschiedlichen Frequenzen transferiert. Die ermittelten Mobilisierungsraten für Ki173 und Bi709 sind somit spezifisch für pSunny unter den oben

beschriebenen Versuchsbedingungen. Mit anderen mobilisierbaren Plasmiden könnten höhere oder auch niedrigere Mobilisierungsraten ermittelt werden.

Außerdem muss bei allen Transferexperimenten berücksichtigt werden, dass die Effizienz eines Transferereignisses (die Frequenz eines Ereignisses pro Zeitspanne, per Donor oder per Rezipient) von der Wahl des Rezipienten (siehe Tab. 11) und den Bedingungen, unter denen der Transfer stattfinden soll, beeinflusst wird (Waters, 1999). Diese Frequenz wird durch die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines *mating-pairs*, die Stabilität des *mating-pairs*, biotische und abiotische Faktoren, wie z. B. Temperatur, Art des Mediums, pH-Wert, Wachstumsphase des Donors und Faktoren, die durch eine Derepression der Transfergene die Transferfrequenz erhöhen können (z. B. bei F durch die Piluserkennung eines speziellen Rezeptors des Rezipienten) (Waters, 1999), beeinflusst. Die Mobilisierungsrate von pSunny durch die einzelnen Plasmide variiert in Abhängigkeit vom Rezipienten um bis zu vier bis fünf Zehnerpotenzen (Tab. 11). Die ermittelten Mobilisierungsfrequenzen von Ki173 und Bi709 könnten mit anderen Rezipienten und/oder anderen Versuchsbedingungen ganz andere Werte annehmen. Die Mobilisierungsfrequenzen von Ki173 und Bi709 (beide *Pseudomonas*-Stämme) unterscheiden sich mit den γ -Proteobakterien *E. coli* C600 und *Pseudomonas putida* PaW340 als Rezipienten kaum voneinander. Nur mit *E. coli* Ec294 weichen die Transferraten der beiden Bodenisolat um drei Zehnerpotenzen voneinander ab und innerhalb der Mobilisierungsreihen von Ki173 um fünf Zehnerpotenzen. Da die Versuchsbedingungen (Temperatur, Medium, Kreuzungsdauer usw.) gleich waren und für alle Kreuzungen die gleichen Donor- bzw. Rezipientenkulturen verwendet wurden, sollte der Grund bei dem Rezipienten liegen. Da es sich bei *E. coli* Ec294 um einen Restriktions-negativen Stamm handelt, könnte dies der Grund für die höheren Mobilisierungsraten sein.

Zusammenfassung:

Eine Mobilisierung von pSunny erfolgte durch die Bodenisolat Bi709, Bi860, Bi251, Bi147, Ki173 und Bi1094. Diese Bodenisolat enthalten demnach ein DNA-Transfersystem mit dem pSunny transferiert werden kann. Ein Transfer von pSunny kann nur erfolgen, wenn das *coupling*-Protein des Konjugationssystems (plasmid- oder chromosomalkodiert) der Bodenisolat mit dem pSunny-Relaxosom-Komplex interagieren kann. Bodenisolat, für die kein pSunny-Transfer nachgewiesen werden konnte, sind entweder ohne konjugatives Gentransferpotential oder ein Transfer von pSunny konnte nicht nachgewiesen werden, weil die *coupling*-Protein-Relaxosom-Interaktion nicht bzw. nur schwach erfolgt. Da außerdem die

Wahl des Rezipienten (siehe oben), die Versuchsbedingungen und eventuell unbekannte Faktoren (die das Transfersystem dereprimieren) die Transferrate entscheidend beeinflussen, kann für die Bodenisolat, für die ein Transfer von pSunny nicht nachgewiesen wurde, ein konjugatives Gentransferpotential nicht ausgeschlossen werden.

Nachdem für einige Plasmide die Fähigkeit zur Mobilisierung gezeigt wurde, sollten die Plasmide dieser Isolate auf ihre Fähigkeit zum Selbsttransfer untersucht werden.

D.2.5.2 Transposonmutagenese zur Markierung der Plasmide

Um die Konjugationsfähigkeit von Plasmiden untersuchen zu können, muss eine Möglichkeit, auf das Plasmid zu selektionieren, vorhanden sein. Da den Bodenplasmiden keine Antibiotikaresistenzgene zugeordnet werden konnten (siehe Abschnitt D.2.3.1), wurde eine ungerichtete Transposonmutagenese mit pAG408 (Suarez *et al.*, 1997) durchgeführt. pAG408 ist ein *suicide*-Vektor mit dem *oriV* aus R6K, der nur in Zellen repliziert, die das λ Pir-Protein enthalten. Auf dem Vektor ist ein MiniTn5 lokalisiert, das Resistenzen gegen Kanamycin und Gentamicin vermittelt. Außerdem trägt das Transposon ein promotorloses *gfp*-Gen, das nach Insertion hinter einen Promotor die Bakterienzelle grün fluoreszieren lässt. pAG408 besitzt den Transferorigin *oriT* von RP4 und kann so z. B. durch *E. coli* S17-1 in andere Bakterienstämme mobilisiert werden.

Zur Transposonmutagenese wurden logarithmisch wachsende Kulturen (Titer $1-3 \times 10^8$) der Bodenisolat zusammen mit logarithmisch wachsenden Kulturen von *E. coli* S17-1 λ *pir* pAG408 im Verhältnis 1:1 auf einen Cellulose-Nitrat-Filter getropft und über Nacht bei 28 °C bebrütet. Nach Inkubation der beiden Konjugationspartner wird auf das Bodenisolat und das Transposon selektioniert. Der große Nachteil dieser ungerichteten Methode war der hohe Zeitaufwand, da von allen Mutanten Plasmid-DNA isoliert werden musste. Diese Plasmide wurden geblottet und gegen eine Sonde aus dem Transposon hybridisiert (Daten nicht gezeigt). Nur so war es möglich, Mutanten, die das Transposon im Plasmid trugen, von solchen, bei denen das Transposon im Chromosom integriert war, zu unterscheiden. Im Schnitt mussten 150 Mutanten getestet werden, um eine Mutante mit einem im Plasmid integrierten Transposon zu finden.

Nur für die folgenden Bodenisolat konnten z. T. verschiedene transposontragende Plasmide erhalten werden:

Stamm	Mutanten	Resistenz der Mutante
Bi860	Bi860.75/ Bi860.105/ Bi860.110/ Bi860.182	Cm, Km, Gm
Bi709	Bi709.20/ Bi709.31	Cm, Km, Gm
Ki173	Ki173.38/ Ki173.125/ Ki173.128/ Ki173.233/ Ki173.259	Rif, Km, Gm
Ki202	Ki202.35/ Ki202.38	Cm, Km, Gm
Ol18	Ol18.31 das Transposon ist im 20 kb Plasmid integriert	Nx, Km, Gm
Ol24	Ol24.99/ Ol24.111/ Ol24.118, das Transposon ist in allen Mutanten im 20 kb Plasmid integriert	Nx, Km, Gm
Bi161	Bi161.6/ Bi161.8, das Transposon ist in allen Mutanten im 78 kb Plasmid integriert	Nx, Km, Gm
Bi144	Bi144.18 das Transposon ist im 60 kb Plasmid integriert	Nx, Km, Gm
Bi1663	1663.9 das Transposon ist im 14 kb Plasmid integriert 1663.19 das Transposon ist im 110 kb Plasmid integriert 1663.3/ 1663.6/ 1663.7/ 1663.18 das Transposon ist in allen Mutanten im 140 kb Plasmid integriert	Nx, Km, Gm Nx, Km, Gm Nx, Km, Gm
Bi1664	1664.2 das Transposon ist im 110 kb Plasmid integriert	Nx, Km, Gm
Ki163a	163a.4/ 163a.5/ 163a.6 das Transposon ist in allen Mutanten im 140 kb Plasmid integriert	Rif, Km, Gm
Bi1063	Bi1063.14/ Bi1063.58	Rif, Km, Gm

Mit diesen Mutanten wurden dann die im nächsten Abschnitt beschriebenen Konjugationsexperimente durchgeführt.

D.2.5.3 Konjugation

Zur Kreuzung wurden logarithmisch wachsende Kulturen der Mutanten mit logarithmisch wachsenden Kulturen der Rezipienten (siehe Tab. 12) auf einem Cellulose-Nitrat-Filter gemischt und bei 28 °C über Nacht bebrütet. Die Selektion auf Transkonjuganten erfolgte 48 h bei 28 °C für Rezipienten, die zu den Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* und *Sinorhizobium* gehören. Die Selektion auf *E. coli*-Transkonjuganten erfolgte immer bei 28 °C und bei 37 °C, da bekannt ist, dass sowohl die Konjugation als auch die Plasmidreplikation einiger Plasmide temperaturabhängig sein können (Taylor und Levine, 1980; Greated *et al.*, 2000). Mit der Isolierungsmethode nach Ramos-Gonzales *et al.* (1991) wurden die Transkonjuganten auf das Vorhandensein des Plasmides überprüft. Mittels des ARDRA-Musters wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem Transkonjuganten auch wirklich

um den Rezipienten und nicht um den Donor handelt. Die Ergebnisse der Konjugationsexperimente sind in Tab. 12 zusammengefasst. Wie auch bei den Mobilisierungsexperimenten wurden die Kreuzungen bei einem positiven Ergebnis mindestens zweimal, wenn kein Plasmidtransfer beobachtet werden konnte, mindestens fünfmal wiederholt.

Tabelle 12. Ergebnisse der Konjugation von Plasmiden aus Bodenisolaten mit verschiedenen Rezipienten.

Proteobakteriengruppe		Rezipient							
		γ					α	β	α
Selektion ½ TBY		Sm/Km	Rif/Km	Rif/Km	Rif/Km ¹	Rif/Km ¹	Rif/Km	Rif/Km	Sm/Km ^o
Donor	Gattung/ Proteobakterien- gruppe	<i>P. putida</i> PaW340	<i>P. putida</i> KT 2440	<i>P. stutzeri</i>	C600	Ec294 **	<i>Paracoccus</i> <i>aminophilus</i>	<i>Alcaligenes</i> Bi747	<i>S. meliloti</i>
O118.31	<i>Paracoccus</i> / α	-	-	nt	nt	-	-	-	-
O124.99		-	-	nt	nt	-	-	-	-
O124.111		-	-	nt	nt	-	-	-	-
O124.118		-	-	nt	nt	-	-	-	-
Bi144.18		-	-	nt	nt	-	-	-	-
Bi161.6		-	-	nt	nt	-	-	-*	-
Bi161.8		-	-	nt	nt	-	-	-	-
Bi1663.3		-	nt	nt	nt	nt	-	nt	-
Bi1663.6		-	nt	nt	nt	nt	-	nt	-
Bi1663.7		-	nt	nt	nt	nt	-	nt	-
Bi1663.9		-	nt	nt	nt	nt	-	nt	-
Bi1663.18		-	nt	nt	nt	nt	-	nt	-
Bi1664.2		-	nt	nt	nt	nt	-	nt	-
Ki173.38		<i>Pseudomonas</i> / γ	+	nt	nt	nt	-*	nt	-*
Ki173.125	-		nt	nt	nt	-*	nt	nt	nt
Ki173.233	-		nt	nt	nt	-*	nt	nt	nt
Ki173.259	-		nt	nt	nt	-*	nt	nt	nt
Ki202.35	+		nt	+	-	-	nt	-	-
Ki202.38	+		nt	+	-	-	nt	-	-
Bi709.20	+		+	+	+	+	-	-	-
Bi709.31	+		+	+	+	+	-	-	-
Bi860.75	+		+	+	+	+	-	-	-
Bi860.105	-		-	-	-	-	-	-	-
Bi860.110	+		+	+	+	+	-	-	-
Bi860.182	+	+	+	+	+	-	-	-	
Ki163a.4	<i>Citrobacter</i> / γ	-	nt	nt	-	-*	nt	nt	nt
Ki163a.5		-	nt	nt	-	-*	nt	nt	nt
Ki163a.6		-	nt	nt	-	-*	nt	nt	nt
Bi1063.14	<i>Stenotropho-</i> <i>monas</i> /γ	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt
Bi1063.58		-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt

Wenn nicht anders angegeben, wurde ½ TBY Fest Medium verwendet. ** es wurde eine Rifampicin- und eine Nalidixin-Säure-resistente Mutante von Ec294 verwendet. * Selektion mit Nalidixinsäure (50 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml), ° TY Medium mit Streptomycin (800 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml), ¹ TBY Fest Medium, Rif = Rifampicin (100 µg/ml), Km = Kanamycin (50 µg/ml), Sm = Streptomycin (100 µg/ml).

Zusätzlich zu den in der Tab. 12 aufgeführten Kreuzungen wurde auch der Transfer der Plasmide pBI709 und pBI860 mit einem *Pseudomonas putida*-Rezipienten, der das SAL Plasmid (IncP-9) enthielt, getestet. Es konnte kein Transfer von pBI709 und pBI860 nachgewiesen werden. Die Plasmide aus den Paracoccen OI18, OI24, Bi144, Bi161, Bi1663 und Bi1664 zeigten mit verschiedenen Rezipienten ebenfalls keinen Transfer. Auch das 140 kb Plasmid aus dem *Citrobacter* sp. Ki163a erwies sich in den durchgeführten Kreuzungen als Transfer-negativ. Es muss natürlich auch mit der Integration des Transposons in ein essentielles Transfergen gerechnet werden, da aber von fast allen Plasmiden mehrere Mutanten vorliegen, ist dieses für den Transfer-negativen Phänotyp dieser Plasmide vermutlich nicht die Ursache.

Unter den oben angegebenen Konjugationsbedingungen und mit den in der Tab. 12 angegebenen Rezipienten konnte für die vier aus *Pseudomonas*-Bodenisolaten stammenden Plasmide pBI709, pBI860, pKI173 und pKI202 Transfer durch Konjugation gezeigt werden. Bei allen Plasmiden handelt es sich anscheinend um *narrow-host-range* Plasmide, da nur ein Plasmidtransfer innerhalb der γ -Proteobakteriengruppe beobachtet werden konnte. Allerdings können auch die Wahl der Rezipienten, eventuell nicht optimale Konjugationsbedingungen und ein reprimiertes Transfersystem dafür verantwortlich sein, dass die Transfereffizienz dieser Plasmide so gering ist, dass ein *broad-host-range* Phänotyp nicht detektiert wurde.

Eine Mutante des Stammes Bi860 erwies sich als nicht-konjugativ, bei dieser Mutante könnte das Transposon in einem essentiellen Transfergen inseriert sein (nähere Untersuchungen zu dieser Mutante siehe Abschnitt D.2.5.4).

Der Transfer des Plasmides pKI202 war kaum nachweisbar, die Konjugation wurde insgesamt zehnmal wiederholt. Nur bei jedem dritten Konjugationsansatz konnten, wenn der gesamte Konjugationsansatz auf Selektionsmedien ausplattiert wurde, höchstens vier Transkonjuganten detektiert werden. Deshalb wurden nur für die Plasmide pKI173, pBI709 und pBI860 die Konjugationsraten bestimmt. Da es keine Möglichkeit gab, nur auf den Donor zu selektionieren, wurden die Konjugationsraten als Anzahl der Transkonjuganten pro Anzahl der Rezipienten berechnet.

Tabelle 13. Die Konjugationsraten verschiedener Plasmide.

Donor	Rezipient		
	<i>P. putida</i> PaW340	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. putida</i> KT2440
Bi860.75	2×10^{-6}	2×10^{-4}	$< 10^{-8}$
Bi860.105	$< 10^{-8}$	3×10^{-7}	$< 10^{-8}$
Bi860.110	2×10^{-4}	1×10^{-4}	2×10^{-7}
Bi860.182	2×10^{-4}	2×10^{-4}	4×10^{-7}
Bi709.20	1×10^{-3}	nt	nt
Bi709.31	2×10^{-3}	nt	nt
Ki173.38	1.7×10^{-7}	nt	nt

Die Konjugationsraten der Mutanten vom Stamm Bi860 sind mit verschiedenen Rezipienten der *Pseudomonas*-Gruppe sehr unterschiedlich. Mit *P. putida* PaW340 und *P. stutzeri* liegen die Raten bei 10^{-4} , mit *Pseudomonas putida* KT2440 als Rezipienten sind die Transferereignisse kaum nachweisbar (Raten bei 10^{-7} bzw. $< 10^{-8}$). Bei beiden *Pseudomonas putida*-Stämmen handelt es sich um plasmidfreie Stämme. Im Gegensatz zum *P. putida* PaW340 ist der *P. putida* KT 2440 Restriktions-negativ (*hsdR*), besitzt aber eventuell andere Restriktionssysteme (*mcr* oder *mrr*), die der Grund für die geringeren detektierten Konjugationsraten sind. Auch die Konjugation von pKI173.38 mit *P. putida* PaW340 liegt mit einer Rate von 1.7×10^{-7} nahe der Nachweisgrenze. Für die anderen Mutanten von Ki173 konnte der Plasmidtransfer nicht gezeigt werden, was aber eventuell an der sehr niedrigen Konjugationsfrequenz des Plasmides mit *P. putida* liegen könnte.

Wie schon bei den Mobilisierungsexperimenten erwähnt, beeinflussen mehrere Faktoren die Effizienz des DNA-Transfers. Neben der Wahl des Rezipienten sind abiotische und biotische Faktoren sowie Faktoren, die zur Aktivierung eventuell reprimierter Transfergene beitragen, entscheidend dafür, ob und mit welcher Frequenz ein konjugativer DNA-Transfer stattfindet. Ein Konjugations-negativer Phänotyp wird auch beobachtet, wenn ein Transfer eines konjugativen Plasmides erfolgt, dieses aber nicht im Rezipienten replizieren kann oder im Rezipienten restringiert wird. Eindeutig als konjugativ konnten die aus *Pseudomonas*-Bodenisolaten stammenden Plasmide pBI709, pBI860, pKI173 und pKI202 identifiziert werden. Für alle anderen untersuchten Plasmide kann der Besitz eines konjugativen DNA-Transfersystems nicht ausgeschlossen werden.

Wie die Sequenzierungen des Plasmides pBI1063 aus *Stenotrophomonas* gezeigt haben, besitzt dieses Plasmid ein Konjugationssystem (siehe Abschnitt D.3.1). Die Konjugation dieses Plasmides konnte jedoch weder mit den *Pseudomonas putida*-Rezipienten PaW340 und KT 2240, den *E. coli*-Rezipienten C600 und EC294, noch mit einem plasmidfreien Bodenisolat

(Bi1130), das zu der gleichen ARDRA-Gruppe wie Bi1063 gehört, nachgewiesen werden. Die Konjugationen wurden mehrfach wiederholt, wobei die Konjugationsansätze und die Selektion auf Transkonjuganten entweder bei 20 °C, bei 25 °C oder bei 28 °C inkubiert wurden. Selbst mit einer Herabsetzung der Kanamycinkonzentration (Selektion auf das Transposon) von 50 µg/ml auf 30 bzw. 15 µg/ml konnte kein Transfer des Plasmides pBI1063 detektiert werden. Restriktionsspaltungen der Transposon tragenden Plasmide gaben keinen Hinweis auf die Integration des Transposons in die Transferregion (Daten nicht gezeigt). Unter der Voraussetzung, dass das bei pBI1063 gefundene Konjugationssystem intakt ist, könnte dieses Plasmid ein Beispiel dafür sein, wie die oben beschriebenen konjugationsbeeinflussenden Parameter und/oder die Nicht-Replizierbarkeit des Plasmides oder eine Restriktion des Plasmides in den gewählten Rezipienten einen nicht-konjugativen Phänotyp vermitteln.

Mit Hilfe der Mobilisierungs- und der Konjugationsexperimente konnten für die folgenden Bodenisolat ein Gentransferpotential nachgewiesen werden: Bi709 (*Pseudomonas* sp.), Bi860 (*Pseudomonas* sp.), Ki173 (*Pseudomonas* sp.), Ki202 (*Pseudomonas* sp.), Bi147 (*Alcaligenes* sp.), Bi251 (*Pseudomonas* sp.) und Bi1094 (*Paracoccus* sp.). Bei der Mobilisierung wurden 20 Isolate getestet und ein Transfer von pSunny erfolgte durch sechs Isolate (30 %). Auf ihre Konjugationsfähigkeit wurden 14 Plasmide untersucht, 28.6 % (vier Plasmide) waren konjugativ. Insgesamt wurden 22 unterschiedliche Isolate auf ihr Gentransferpotential untersucht, für sieben Isolate konnte ein solches Potential nachgewiesen werden, dies entspricht einem Anteil von 32 %.

D.2.5.4 Sequenzierung der Transposon-Integrationsstelle von pBI860.105

Von den vier verschiedenen Transposonmutanten des Plasmides pBI860 hatte eine Mutante einen Transfer-negativen Phänotyp (Bi860.105). Diese Mutante war auch nicht in der Lage, pSunny zu mobilisieren (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob dieser Phänotyp durch Insertion des Transposons in ein essentielles Transfergen entstanden ist, sollte die Umgebung des Integrationsortes sequenziert werden. Dazu wurde das Plasmid pBI860.105 mit *SphI* bzw. mit *PstI* hydrolysiert, mit pUC18 ligiert und nach *E. coli* transformiert. Da das Transposon Kanamycin- und Gentamicinresistenzgene trägt, die keine *SphI*- bzw. *PstI*-Schnittstelle enthalten, erfolgte nach Transformation die Selektion auf Selektionsmedien mit diesen beiden Antibiotika. Die erhaltenen *SphI*-Subklone hatten eine Größe von ca. 7 kb, die *PstI*-Subklone eine Größe von ca. 9 kb (*gfp*, *aphA-3*, *Gm^r* umfassen ca. 2 kb). Dass es wahrscheinlich nur

eine Insertion des Transposons in das Plasmid pBI860.105 gab, zeigte sich dadurch, dass von jeweils 16 untersuchten *SphI*- bzw. *PstI*-Subklonen alle ein Fragment gleicher Größe trugen und identische Restriktionsmuster aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Southern Hybridisierungen mit dem Transposon als Sonde ergaben mit hydrolysierte Gesamt-DNA der Bi860 Mutanten und mit Plasmid-DNA dieser Mutanten ebenfalls nur Signale, die darauf hindeuten, dass es nur eine Insertion des Transposons gegeben hat (Daten nicht gezeigt). Außerdem zeigten vergleichende Restriktionsspaltungen der Mutante und des Plasmides pBI860, dass bis auf den Integrationsort des Transposons die Plasmide physikalisch identisch sind (Daten nicht gezeigt).

Um die das Transposon flankierenden DNA-Regionen zu sequenzieren, wurde das Hybridplasmid pSPH105 (enthält das *SphI*-Insert) mit den M13 *universal* und *reverse* Primern und mit dem Primer I-2, der im I-Ende des Transposons bindet, partiell sequenziert. Das Hybridplasmid pPST105 (enthält das *PstI*-Insert) wurde nur mit den *universal* und *reverse* Primern ansequenziert.

Die partielle Sequenzierung von pPST105 hat gezeigt, dass sich vor dem *gfp*-Gen des Transposons eine in der Literatur nicht angegebene *PstI*-Schnittstelle befindet. Um die auf dieser Seite des Transposon angrenzenden DNA-Bereiche des Plasmides zu sequenzieren, wurde das Hybridplasmid pPST105 als Sonde gegen *PstI*-hydrolysierte Wildtyp pBI860 DNA hybridisiert. Ein ca. 10 kb *PstI* Fragment (pPST1610) hybridisierte mit der Sonde und wurde mit den M13 *universal* und *reverse* Primern sequenziert.

Datenbankanalysen haben gezeigt, dass die partiell sequenzierten Bereiche von pPST1610, pPST105 und pSPH105 homolog zu Quecksilberresistenzgenen und zu dem Transposon Tn5041 bzw. Tn5041D sind.

Bei den Sequenzierungen von *HindIII*-Fragmenten des Plasmides pBI860 (siehe Abschnitt D.2.2.1.2), wurden ebenfalls Homologien zu Quecksilberresistenzgenen und dem Transposon Tn5041 gefunden. Da die schon vorhandenen Sequenzen der *HindIII*-Klone von pBI860 mit denen des Plasmides pBI860.105 überlappen (siehe Abb. 6), konnten diese Sequenzen zu Kontigs zusammengefügt werden. Die Kontig-Sequenzen 860A-D und die Einzelsequenzen PST1610 uni und 860H11 uni sind im Anhang II dargestellt.

Die Ergebnisse der Datenbankabfragen dieser Kontig-Sequenzen sind in Tab. 14 zusammengefasst. Bei Sequenzbereichen, in denen keine vollständigen offenen Leseraster gefunden wurden, sind die entsprechenden homologen Bereiche des Tn5041 bzw. des Tn5041D angegeben. Die Sequenzen 860A und 860D sind auf DNA-Ebene zu 99 % identisch zu Tn5041D,

während die übrigen Sequenzen identisch zu Tn5041 sind (860B 99 % Identität; 860C 99 % Identität; PST1610uni 97 % Identität und 860H11uni 99 % Identität).

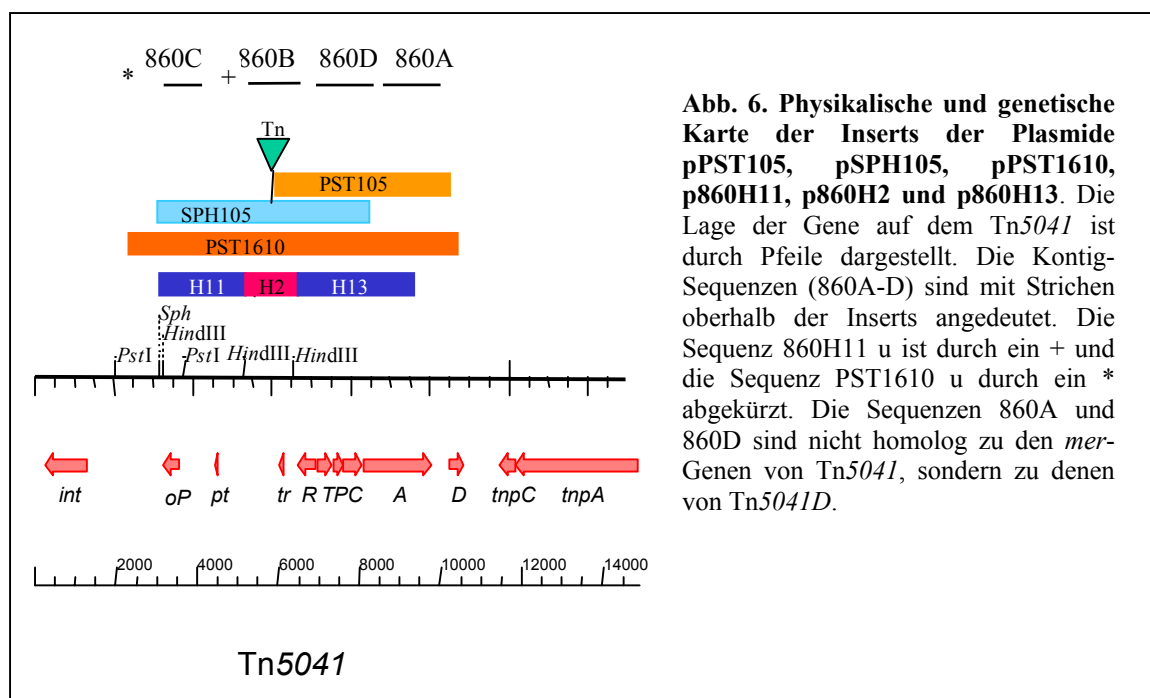


Abb. 6. Physikalische und genetische Karte der Inserts der Plasmide pPST105, pSPH105, pPST1610, p860H11, p860H2 und p860H13. Die Lage der Gene auf dem Tn5041 ist durch Pfeile dargestellt. Die Kontig-Sequenzen (860A-D) sind mit Strichen oberhalb der Inserts angedeutet. Die Sequenz 860H11 u ist durch ein + und die Sequenz PST1610 u durch ein * abgekürzt. Die Sequenzen 860A und 860D sind nicht homolog zu den mer-Genen von Tn5041, sondern zu denen von Tn5041D.

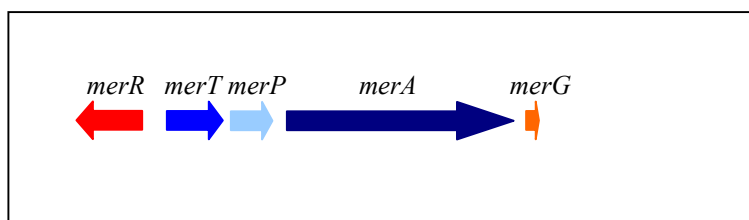
Tabelle 14. Sequenzauswertung von pBI860.

Kontig-Sequenz (bp)	Einzelsequenzen	Übereinstimmung (Identität/Ähnlichkeit %) (Acc.-Nummer)
860A (1024)	pPST1610 rev pPST105 uni p860H13 rev	MerG (91/95) (CAB81564) MerA (97/97) (CAB81563)
860B (1240)	p860H2 uni p860H2 rev pSPH105 I-2	5306-6546 Tn5041 (99) MerR (100/100)
860C (1112)	pSPH105 rev p860H11 rev	3129-4241 Tn5041 (99)
860D (1554)	pSPH105 uni p860H13 uni	MerA (99/99) (CAD10785) MerP (100/100) (AF120976) MerT (79/79) (CAB65940) MerR (98/98) (CAA67447)
PST1610 u (700)	pPST1610 uni	2035-2726 bp Tn5041 (97)
860H11 u (552 bp)	p860H11 uni	4730-5282 bp Tn5041 (99)

Die Quecksilberresistenzgene des Plasmides pBI860 sind in der gleichen Reihenfolge angeordnet wie in Tn5041 und vielen anderen Quecksilberresistenzoperons (Silver und Phung, 1996) (Abb. 7). Das Operon beginnt mit dem regulatorischen Gen *merR*, dessen Genprodukt in Abwesenheit von Quecksilberionen (Hg^{2+}) an den *mer*-Operator/Promotor Bereich bindet und so die Transkription der Quecksilbertransportproteine und der Reduktase oder Lyase un

terbindet (Summers, 1986; Nucifora *et al.*, 1989). Dem Regulatorgen folgen Gene, deren Produkte in die Aufnahme der Quecksilberionen involviert sind. Bei pBI860 sind dies *merT* und *merP*. MerP ist ein periplasmatisches Protein, das Quecksilberionen bindet und diese über einen Redox-Austauschmechanismus zu dem in der inneren Membran lokalisierten MerT transferiert. Von der periplasmatischen Seite des MerT wird das Quecksilberion auf die cytoplasmatische Seite transportiert und von MerA, der Quecksilberreduktase, gebunden. In einer NADH-abhängigen Reaktion wird Hg^{2+} zu nicht toxischem Hg^0 reduziert (Osborn *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu dem Quecksilberresistenzoperon von pBI860 oder denen von Tn501, pMR26, pDU1358 und pPB2, bei denen nach dem *merP*-Gen direkt das *merA*-Gen folgt, gibt es in einigen Quecksilberresistenzoperons, z. B. bei Tn21, Tn5041, pMER610, ein weiteres Gen (*merC*), dessen Genprodukt ein Quecksilbertransportprotein der inneren Membran ist. Wenn *merP* und *merT* vorhanden sind, wird *merC* zur Ausprägung der Quecksilberresistenz nicht benötigt (Liebert *et al.*, 2000). Nach den Transportgenen folgt das Gen für die Quecksilberreduktase *merA*, und das Gen *merG*, das für ein Protein von 24 Aminosäuren kodiert, dessen Funktion unbekannt ist.

Abb. 7. Genetische Organisation des Quecksilberresistenzoperons von pBI860.



Der Transfer-negative Phänotyp der Transposonmutante Bi860.105 lässt sich nicht durch die Insertion des Transposons in dieser Region erklären. Die Abb. 6 verdeutlicht, dass das Transposon auf dem Plasmid pBI860.105 in einer Region inseriert ist, die Homologien zum Transposon Tn5041 zeigt, in der aber keine Transferegene liegen. Da auch die umgebenden Bereiche keine Übereinstimmungen zu Transfergenen zeigen, ist die Möglichkeit eines polaren Effekts der Transposoninsertion auf entfernt liegende Transferegene sehr unwahrscheinlich. Die Plasmid-DNA der Mutante pBI860.105 wurde mit *SphI* (keine *SphI*-Schnittstelle im Transposon) hydrolysiert, um so zu überprüfen, ob die Mutante bis auf den Integrationsort des Transposons mit dem Wildtyp-Plasmid pBI860 physikalisch identisch ist. Ein 5 kb Fragment fehlt bei der Mutante pBI860.105, dafür gibt es ein zusätzliches ca. 7 kb großes Fragment, das dem 5 kb Fragment plus einer Insertion von ca. 2 kb durch das Transposon entspricht (Daten nicht gezeigt). Die Restriktionsanalyse gab auch keinen Hinweis auf eine Deletion oder

Rearrangements des Plasmides pBI860.105. Der Grund für den Transfer-negativen Phänotyp könnte durch eine Mutation in einem essentiellen Transfergen hervorgerufen worden sein. Eine Mutation im *oriT* ist nicht anzunehmen, da das Plasmid pBI860.105 durch das Plasmid pKI173 in einer triparentalen Kreuzung nach *Pseudomonas putida* PaW304 transferiert wurde (Daten nicht gezeigt). Nur durch Sequenzierungen oder Komplementationsanalysen könnte die Ursache für den Konjugations-negativen Phänotyp aufgeklärt werden.

Nachdem die Konjugation bzw. die Fähigkeit zur Mobilisierung von pSunny für einige Plasmide gezeigt werden konnte, galt das Interesse den Transfergenen dieser Plasmide. Die zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Sequenzdaten von Transfergenen kamen hauptsächlich von Resistenzplasmiden klinischer Isolate.

Die Transferproteine dieser R-Plasmide zeigen zum Teil große Übereinstimmungen (Kado, 1994; Christie, 2001; Zechner *et al.*, 2000) zueinander; ob sich diese Übereinstimmungen auch bei den Transferproteinen von Plasmiden aus Bodenisolaten widerspiegeln, sollten die Sequenzierungen zeigen.

D.3 Sequenzierung von Plasmiden aus Bodenbakterien

Wie sich herausgestellt hatte, waren die degenerierten PCR-Primer nicht geeignet, *trbB*- oder *traG*- homologe Sequenzen in den Bodenisolaten zu detektieren. Da auch die Plasmide nicht mit *trbB*- und *traG*-Sonden (z. B. von RP4) hybridisierten (Daten nicht gezeigt), gab es keine Möglichkeit, die Transfergene auf den Plasmiden näher zu lokalisieren. Deshalb wurden Shotgun-Klonierungen einzelner Bodenplasmide durchgeführt. Partiiell sequenziert wurden die aus *Pseudomonas*-Stämmen isolierten konjugativen Plasmide pBI709, pKI173 und pKI202.

Da die Bodenisolate Bi113, Ki239 (beide aus *Pseudomonas* sp.) und Bi1063 (aus *Stenotrophomonas* sp.) nur jeweils ein Plasmid enthalten, das sich gut isolieren ließ, wurden sie ebenfalls partiell sequenziert, obwohl für sie kein konjugativer Gentransfer nachgewiesen werden konnte.

Eine sehr auffällige Gruppe sind die Bodenisolate der Gattung *Paracoccus*. Es konnte kein plasmidfreier Stamm detektiert werden und alle enthielten entweder ein 20 kb oder ein 14 kb Plasmid (siehe Tab. 3). Aus diesem Grund wurde auch das 20 kb Plasmid pOL1820 aus dem Bodenisolat O118 partiell sequenziert.

Die jeweiligen Hybridplasmide wurden zuerst von beiden Seiten mit dem *universal* und *reverse* Primer sequenziert. Zeigten die erhaltenen Sequenzen in Datenbankvergleichen Übereinstimmungen zu Transfergenen, wurde die Nukleotidsequenz des Hybridplasmides über "Primer-Walking" vervollständigt. Auf den konjugativen Plasmiden pBI709, pKI173 und pKI202 und dem Plasmid pBI1063, für das kein Transfer nachgewiesen wurde, konnten mögliche Transfergene detektiert werden. Für das 105 kb große Plasmid pKI173 konnten fünf hypothetische Transfergene gefunden werden (siehe Abschnitt D.3.5). Diese lagen auf kleinen Restriktionsfragmenten (max. 1,5 kb), so dass kein "Primer-Walking" möglich war, um eventuell angrenzende Transfergene zu detektieren. Für pKI202 konnte nur ein mögliches Transfergen ermittelt werden (siehe Abschnitt D.3.6). Aus Kostengründen wurde bei diesen beiden über 100 kb großen Plasmiden von weiteren Sequenzierungen abgesehen. Bei der partiellen Sequenzierung und der anschließenden Analyse von z. T. über 5 kb großen Plasmidfragmenten des 60 kb Plasmides pBI709 und des 68 kb Plasmides pBI1063 wurden mehrere putative Transfergene detektiert. Daher erschienen weitere Sequenzierungen dieser beiden Plasmide, um die Transferregionen komplett zu sequenzieren, erfolgversprechend.

D.3.1 Die Transferregionen von pBI709 und pBI1063

Das konjugative Plasmid pBI709 hat eine Größe von 60 kb und wurde in einem *Pseudomonas*-Bodenisolat detektiert. Das 68 kb große Plasmid pBI1063 stammt aus dem Bodenisolat Bi1063 (*Stenotrophomonas maltophilia*).

Datenbankabfragen der ersten Sequenzierungen dieser Plasmide zeigten, dass auf beiden Plasmiden Gene lokalisiert sind, deren abgeleitete Genprodukte homolog zu Transferproteinen sind. Anschließend wurden die Transferregionen fast vollständig sequenziert.

D.3.1.1 Die Transferregion von pBI709 besitzt die gleiche Organisation wie die von pWW0

Erste partielle Sequenzierungen der Enden von zwei ca. 12 kb großen *HindIII*-Fragmenten haben gezeigt, dass dort weitere Transfergene liegen könnten. Deshalb wurden zusätzlich *PstI*-Hybridplasmide dieser beiden *HindIII*-Hybridplasmide und *EcoRI*- und *SphI*-Hybridplasmide des gesamten Plasmides kloniert und sequenziert. Ausgehend von diesen Sequenzen wurde die Sequenzierung mit "Primer-Walking" fortgeführt. Eine physikalische und genetische Karte der Transferregion ist in Abb. 21 (Seite 128) dargestellt.

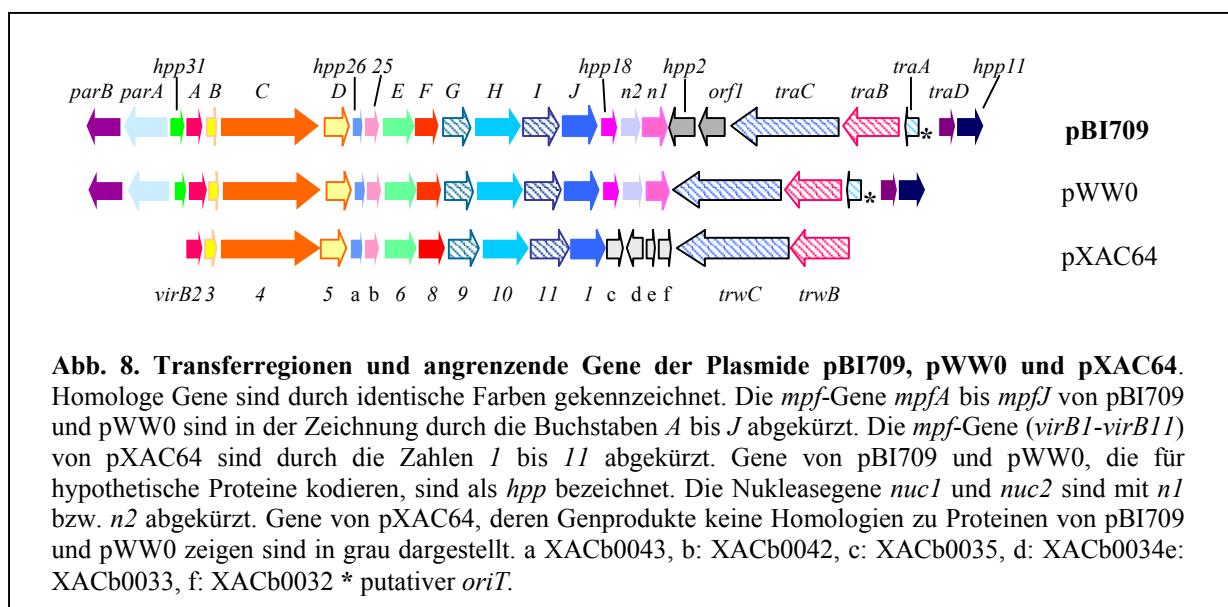
Regionen, deren abgeleitete Aminosäuresequenz keine Übereinstimmungen zu Transferproteinen aufwies, wurden nicht weiter bearbeitet. Diese Daten sind im Abschnitt D.3.4.2

dargestellt.

Insgesamt konnte die Transferregion auf einer 22.8 kb großen Region lokalisiert werden. Diese Region wurde komplett sequenziert und ist im Anhang III dargestellt.

Wie Abb. 8 verdeutlicht, sind die Transferregion von pBI709, pWW0 (Acc.-Nummer NC_003350) und pXAC64 (Acc.-Nummer NC_003922) ähnlich organisiert. Die abgeleiteten Proteine von pBI709 sind homolog zu Proteinen von pWW0 und erhielten deshalb die gleiche Bezeichnung. Die Sequenzen von pWW0 und pXAC64 sind bisher nicht publiziert, sondern nur der Datenbank zu entnehmen. Bei pWW0 (116,58 kb) handelt es sich um ein konjugatives Plasmid aus *Pseudomonas putida*. Dieses Plasmid gehört zur IncP-9 Gruppe und trägt u. a. Gene, deren Genprodukte den Toluol-Abbau ermöglichen (Williams und Murray, 1974; Downing und Broda, 1979). Das Plasmid pXAC64 hat eine Größe von 64,92 kb und stammt aus dem Pflanzenpathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306. pXAC64 kodiert für keine Antibiotika- und Schwermetallresistenzproteine oder Proteine des Aromatenabbaus, es konnten aber drei mögliche Virulenzgene auf diesem Plasmid detektiert werden.

Die Gene von pBI709 und die entsprechenden homologen Proteine sind in Tab. 16 zusammengefasst. Während sich bei pBI709 und pWW0 die Übereinstimmung auch auf DNA-Ebene widerspiegelt, beschränkt sich die Ähnlichkeit zum Transfersystem des *Xanthomonas axonopodis* Plasmides pXAC64 hauptsächlich auf die Organisation der Transfergene.



Die Gene, die für Proteine des Mpf, *mating pair formation*, (*A-J*) kodieren, sind bei pWW0 durch die Gene für zwei putative Nukleasen (*nuc1* und *nuc2*) von den Genen des Dtr, *DNA transfer and replication*, (*traB* und *traC*) getrennt. Auch in der Transferregion von pBI709

sind diese beiden Nukleasegene vorhanden, zusätzlich findet man bei pBI709 zwischen dem Gen *nuc1* und dem Gen *traC* zwei weitere *orfs* (*hpp2* und *orf1*). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *hpp2* zeigt Übereinstimmungen zu einem hypothetischen Protein von pWW0 (Acc.-Nummer NP_542802) (siehe Tab. 16). Bei pWW0 liegt das für NP_542802 kodierende Gen zwischen einem Gen, das für ein putatives Transmembranprotein kodiert und einem verkürzten *merB*, ca. 8.5 kb stromabwärts von *traD*. Für *orf1* konnte auf pWW0 kein homologes Gen gefunden werden. Der *oriT* wird in der Region der *dtr*-Gene vermutet und die ihn flankierenden Gene *traA* und *traD* sind divergent angeordnet. Diese Anordnung ist auch von Transfersystemen anderer Plasmide beschrieben worden, z. B. bei RP4 aus der IncP-Gruppe (Ziegelin *et al.*, 1991), bei pKM101 aus der IncN-Gruppe (Paterson *et al.*, 1999) und bei R27 aus der IncH1-Gruppe (Lawley *et al.*, 2002). Die Gene der *mpf*-Region und die zwei Gene *hpp26* und *hpp25*, die für hypothetische Proteine kodieren, sind in den Transferregionen von pBI709, pWW0 und pXAC64 kollinear angeordnet. Die sequenzierte Region von pBI709, von *parB* bis *hpp11*, ist bis auf die zwei zusätzlichen Gene, *hpp2* und *orf1*, identisch mit der Genorganisation des Inc-P9 Plasmides pWW0 und deutet auf eine Verwandtschaft dieser Plasmide hin.

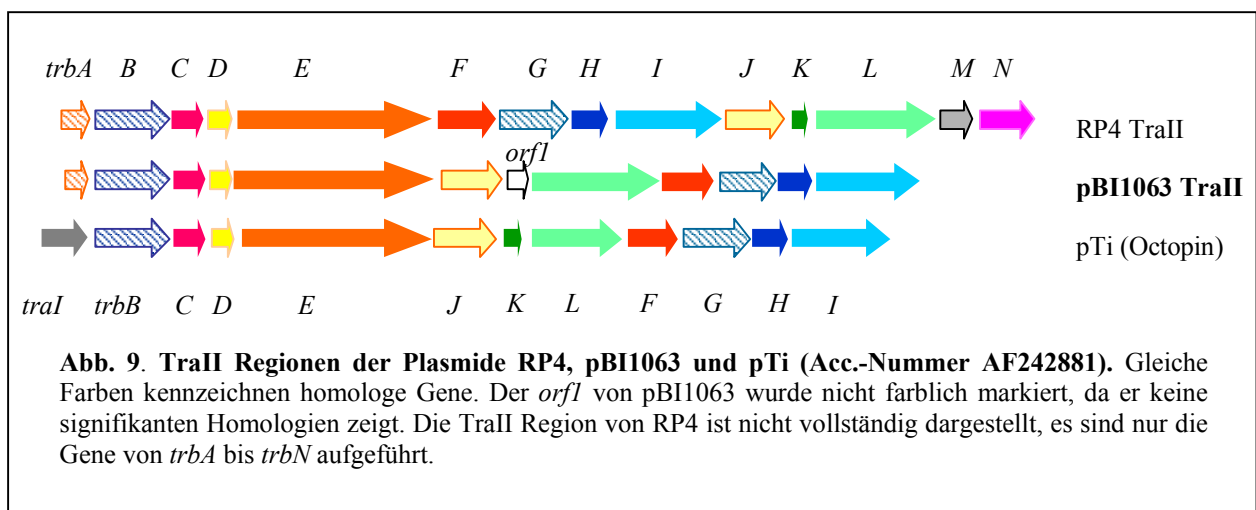
D.3.1.2 Die Transferregion von pBI1063

Ausgangspunkte für die Sequenzierung von pBI1063 waren *HindIII*- und *SphI*- Hybridplasmide, die mit den M13 *universal* und *reverse* Primern ansequenziert wurden. Die weitere Bestimmung der DNA-Sequenz erfolgte durch "Primer-Walking". Die Transferregion von pBI1063 umfasst ca. 26 kb und wurde doppelsträngig sequenziert. Eine physikalische und genetische Karte dieser Region zeigt Abb. 22 (Seite 129). Die DNA-Sequenz mit den abgeleiteten Proteinen ist im Anhang IV dargestellt. Die Homologien der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von putativen Transfergenen sind in Tab. 17 zusammengefasst. Die Benennung der abgeleiteten Proteine der putativen Transfergene von pBI1063 erfolgte in Anlehnung an das Protein mit dem höchsten Ähnlichkeitsgrad der Datenbankabfragen. Bei diesem Plasmid handelt es sich um die Vir-Proteine des Ti-Plasmides und die Tra- und Trb-Proteine von RP4/R751.

Wie bei RP4 und pTi liegen auch bei pBI1063 die Gene für die Bildung des Mpf (*mpf*-Region/*trb*-Region oder TraII Region) und die Gene des Dtr (*dtr*-Region/*tra*-Region oder TraI Region) getrennt in zwei Regionen vor (Abb. 9). Die Genanordnung der TraII Region von

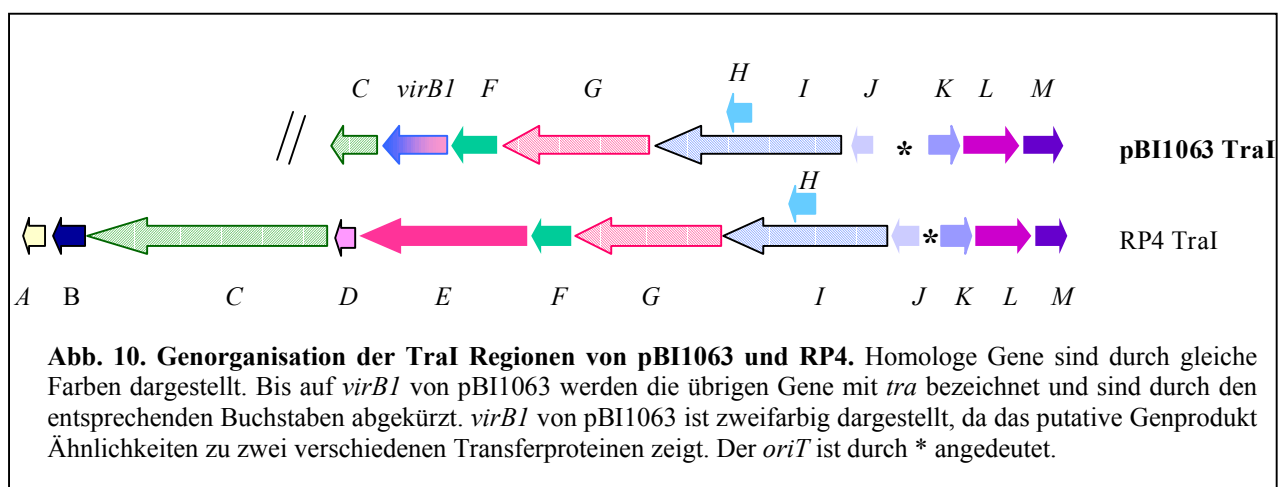
pBI1063 ist bis auf *orf1*, zu dem keine signifikanten Homologien gefunden wurden, identisch mit der *mpf*-Region eines Octopin Ti-Plasmides (Acc.-Nummer AF242881) (Alt-Mörbe *et al.*, 1996). Die Organisation der *mpf*-Gene von pBI1063 und pTi ähnelt der TraII Region von IncP-Transfersystemen, wie z. B. der von RP4 (Lessl *et al.*, 1992). Bei den IncP-Systemen ist das Genmodul *trbF*, *trbG*, *trbH* und *trbI* an anderer Position innerhalb der *mpf*-Region lokalisiert, wobei die Genreihenfolge von *trbF*, *trbG*, *trbH* und *trbI* bei den in Abb. 9 gezeigten Transferregionen gleich ist. Zu Beginn der TraII Region liegen bei RP4 (*trbA*) und pBI1063 (*trbA*) Regulatorgene, die für eine Regulation der Expression dieser *trb*-Gene sorgen. Das TrbA von RP4 ist ein Regulator für die *tra*- und die *trb*-Gene (Zatyka und Thomas, 1998). Bei RP4 liegen die *trb*-Gene in einem Operon vor, das durch TrbA reprimiert wird. Die *tra*-Gene von RP4 liegen in zwei Transkriptionseinheiten vor, *traJ-traA* und *traK-traM*. TrbA koordiniert durch Reprimierung die Expression dieser beiden Transfergen-Cluster (Zatyka und Thomas, 1998). Beim Tra-System des Ti-Plasmides liegt dagegen vor dem *trb*-Cluster das *traI*-Gen. Das verantwortlich für die Synthese des Autoinducers von *Agrobacterium tumefaciens* N-(3-oxo-octanoyl)-L-Homoserin-Lakton (AAI) ist (Hwang *et al.*, 1994). TraI und AAI gehören zum Quorum-sensing-System des Ti-Plasmides und koppeln so den Konjugationsvorgang an hohe Donorzellichten (Zatyka und Thomas, 1998). Da auch die Plasmidkopiezahl durch das Quorum-sensing-System reguliert wird, liegt wahrscheinlich auch hier wie z. B. bei IncP-Plasmiden eine Koregulation von Konjugation und vegetativer Replikation vor (Li und Farrand, 2000).

In Abb. 9 sind die drei TraII Regionen vergleichend dargestellt, homologe Gene sind durch gleiche Farben gekennzeichnet.



Wie aus Abb. 10 deutlich wird, sind die Gene der TraI Region von pBI1063 ähnlich ange

ordnet wie die Gene der TraI Region des IncP-Plasmides RP4 (Ziegelin *et al.*, 1991; Pansegrau *et al.*, 1994b). Bei pBI1063 sind wie bei RP4 die Gene um den vermutlichen *oriT* divergent angeordnet und auch das *traH*-ähnliche Gen von pBI1063 überlappt vollständig mit dem *traI*-Gen. Die *tra*-Gene *traF* bis *traM* sind in beiden Regionen kolinear angeordnet. Aufgrund von Sequenzierungsschwierigkeiten wurde die TraI Region von pBI1063 nicht vollständig sequenziert. Die Sequenz endet innerhalb des *traC*-Gens. Ein *traE*-homologes Gen konnte in dem bisher sequenzierten Bereich von pBI1063 nicht gefunden werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *virB1* (pBI1063) zeigt Ähnlichkeiten zu dem TraD von RP4, dessen Funktion noch unbekannt ist, und zu VirB1 von pTi. VirB1 besitzt die konservierten Sequenzmotive lytischer Transglykosylasen (Koonin und Rudd, 1994; Mushegian *et al.*, 1996; Dijkstra und Keck, 1996). Für VirB1 (pTi) wird eine Funktion bei der lokalen Auflösung der Peptidoglukanschicht vermutet (Bayer *et al.*, 1995; Baron *et al.*, 1997a; Llosa *et al.*, 2000). Da VirB1 (pTi) und TraD (RP4) nicht homolog sind, könnte das VirB1 von pBI1063 ein bifunktionelles Protein sein. Eine Übersicht der TraI und TraII Regionen von pBI1063 und ihre relative Lage zueinander sowie die Organisation der dazwischen liegenden Gene wird in Abb. 22 (Seite 129) dargestellt.



Im folgenden Abschnitt werden die potentiellen Genprodukte von pBI709 und pBI1063 im einzelnen diskutiert. Wie die Abb. 8, 9 und 10 verdeutlichen, zeigen die beiden Plasmide pBI709 und pBI1063 Unterschiede in der Organisation ihrer Transferregionen. Während die Genanordnung in der Transferregion von pBI709 fast identisch ist mit der des IncP-9 Plasmides pWW0, ist die TraII Region von pBI1063 in ihrer Organisation sehr ähnlich der des Ti-Plasmides, und die TraI Region ähnelt der TraI Region des Plasmides RP4 (IncP bzw.

IncP-1). Trotz struktureller Unterschiede in der Genorganisation von Transferregionen gibt es einen grundlegenden Transfer-Mechanismus, in dem homologe Proteine gleiche oder ähnliche Funktionen ausüben. Deshalb werden die potentiellen Transferproteine von pBI709 und pBI1063 gemeinsam im folgenden Abschnitt diskutiert.

Neben der Analyse dieser Genprodukte auf mögliche Signalsequenzen, Transmembrandomänen und Proteinmotive, werden die Proteine mit bekannten Transferproteinen verglichen. Durch diese Homologievergleiche können Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion der putativen Transferproteine von pBI709 und pBI1063 gezogen werden. Die Proteine von pBI1063 zeigen u. a. Ähnlichkeiten zu Transferproteinen von RP4/R751. Den höchsten Ähnlichkeitsgrad zeigen die Proteine von pBI709 zu denen von pWW0, über die es aber bislang keine Publikation gibt. Deutliche Homologien gibt es aber auch z. B. zu den VirB-Proteinen des Ti-Plasmides, die eine Membranpore bilden (Abb. 11) und deren Funktion zumindest teilweise bekannt ist (Beijersbergen *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1996; Baron *et al.*, 1997b; Das und Xie, 1998; Das und Xie, 2000) (Tab. 15).

Tab. 15. Funktion der VirB-Proteine und der homologen IncP-Transferproteine.

Funktion/ Lokalisation	VirB	IncP
Pilus	VirB2	TrbC
Pilus?	VirB3	TrbD
ATPase	VirB4	TrbE
Pilus	VirB5	TrbJ
Pore/ Regulator?	VirB6	TrbL
Porenkomplex	VirB7	TrbK
Porenkomplex	VirB8	TrbF
Porenkomplex	VirB9	TrbG
Porenkomplex	VirB10	TrbI
ATPase	VirB11	TrbB

Die Funktion der Proteine wird im Abschnitt D.5.2 genauer diskutiert.

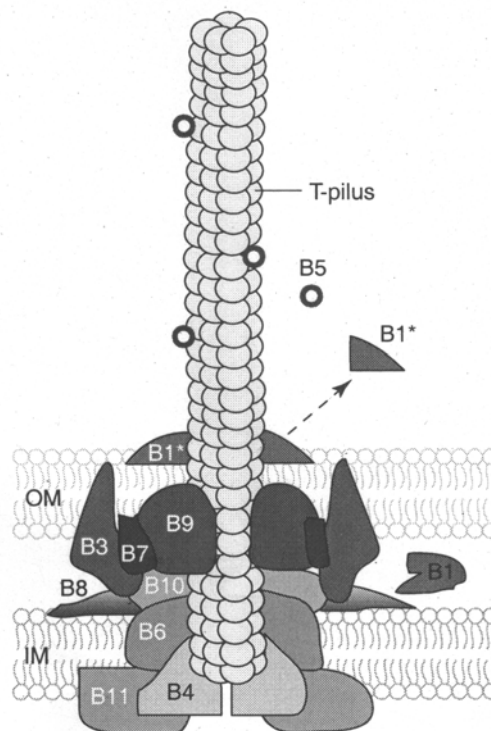


Abb. 11 Modell des VirB-Membranporenkomplexes (Lai und Kado, 2000). VirB5 ist Pilus assoziiert, aber die genaue Lokalisation ist noch nicht eindeutig geklärt. OM äußere Membran, IM innere Membran.

Tabelle 16. Sequenzanalyse von pBI709.

Gen	kodierende Region (Start – Ende)	AS des Genproduktes	Eigenschaften , Domänen, Proteinfamilie (Position)	Homologe Proteine (Identität/Ähnlichkeit in %) (Acc.-Nummer)/mögliche Funktion
<i>parB</i>	1045 – 122	307	ParB-Nukleasedomäne (33 – 129)	hyp. ParB pWW0 (58/72) (NP_542933) Repressor <i>Xylella fastidiosa</i> (NP_297354) (45/66) Partitioning
<i>parA</i>	2177 – 1056 1997 – 1056 1823 – 1056	373 313 255	ParA-Familie ATPase (201 – 309)	hyp. ParA pWW0 (72/83) (NP_542932) Plasmid Rep.-Protein XFa0060 (40/57) (NP_061715) Partitioning
<i>hpp31</i>	2437 – 2784	115	Signalpeptid	hyp. Protein pWW0 (73/79) (NP_542931) hyp. Protein <i>Xanthomonas axonopodis</i> (48/68) (NP_644776)
<i>mpfA</i>	2803 – 3264	153	3 Transmembrandomänen	hyp. MpfA pWW0 (58/76) (NP_542930) VirB2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (23/38) (NP_066735) Pilusuntereinheit
<i>mpfB</i>	3261 – 3558	99	2 Transmembrandomänen	hyp. MpfB pWW0 (74/89) (NP_542929) VirB3 <i>Xanthomonas axonopodis</i> (53/67) (NP_644774) Komponente des Pilus?
<i>mpfC</i>	3547 – 6231	894	CagE-, TrbE-, VirB-Familie (251 – 467)	hyp. MpfC pWW0 (75/85) (NP_542928) VirB4 <i>Rickettsia conorii</i> (30/49) (NP_359778) Komponente des Transferapparates
<i>mpfD</i>	6231 – 6917	228	Signalpeptid	hyp. MpfD pWW0 (76/86) (NP_542927) TraC pKM101 (20/36) (I79268) Komponente des Pilus?
<i>hpp26</i>	6947 – 7157	70	1 Transmembrandomäne	hyp. Protein pWW0 (62/76) (NP_542926) hyp. Protein <i>Xanthomonas axonopodis</i> (38/54) (NP_644771)
<i>hpp25</i>	7152 – 7541	129	1 Transmembrandomäne	hyp. Protein (64/72) (NP_542925) hyp. Protein <i>Xanthomonas axonopodis</i> (31/43) (NP_644770)
<i>mpfE</i>	7529 – 8389	286	6 Transmembrandomänen	hyp. MpfE pWW0 (73/85) (NP_542924) VirB6 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (23/41) (NP_535541) Komponente der Pore/Regulator?
<i>mpfF</i>	8389 – 9054	221	1 Transmembrandomäne	hyp. MpfF pWW0 (62/73) (NP_542923) VirB8 <i>Sinorhizobium meliloti</i> (16/35) (NP_435958) Komponente der Pore

Fortsetzung Tabelle 16.

Gen	kodierende Region (Start – Ende)	AS des Genproduktes	Eigenschaften, Domänen, Proteinfamilie (Position)	Homologe Proteine (Identität/Ähnlichkeit in %) (Acc.-Nummer)/mögliche Funktion
<i>mpfG</i>	9080 – 9859	259	Signalpeptid	hyp. MpfG pWW0 (75/86) (NP_542922) TrbG <i>Mesorhizobium</i> sp. (35/51) (NP_085798) Komponente der Pore
<i>mpfH</i>	9862 – 11136	424	1 Transmembrandomäne	hyp. MpfH pWW0 (71/80) (NP_542921) konj. Protein <i>Xylella fastidiosa</i> (22/39) (NP_061670) Komponente der Pore
<i>mpfI</i>	11146 – 12174	342	Typ II/IV Sekretionssystem Protein GSPII_E (93 – 319)	hyp. MpfI pWW0 (76/87) (NP_542920) Protein des Typ IV-Sekretionssystems <i>Wolbachia</i> sp. wKueYO (40/58) (BAA97442) VirB11-homologe NTPase
<i>mpfJ</i>	12158 – 13102	314	Signalpeptid Transglykosylase SLT-Domäne (31 – 177)	hyp. MpfJ pWW0 (57/70) (NP_542919) TraA pSB102 (38/56) (NP_361052) Transglykosylase
<i>hpp18</i>	13133 – 13448	105	Signalpeptid	hyp. Protein pWW0 (58/65) (NP_542918) TrbM R751 (30/41) (NP_044251)
<i>nuc2</i>	13440 – 14012	190	Signalpeptid PLD-Domäne (124 – 151)	hyp. Nuklease pWW0 (69/78) (NP_542917) Endonuklease pKM101 (52/68) (I79276)
<i>nuc1</i>	14025 – 14654	209		hyp. Nuklease pWW0 (80/88) (NP_542916)
<i>hpp2</i>	15474 – 14731	247		hyp. Protein pWW0 (52/69) (NP_542802)
ORF1	16247 – 15536	248		nicht signifikant
<i>traC</i>	19615 – 16646	989		hyp. TraC pWW0 (75/85) (NP_542915) TrwC pXAC64 (67/80) (NP_644759) Nickase und Helikase
<i>traB</i>	21177 – 19627	516	TraG/TraD-Familie (107 – 506)	hyp. TraB pWW0 (80/87) (NP_542914) TrwB R388 (36/52) (S43877) coupling-Protein
<i>traA</i>	21563 – 21177	128		hyp. TraA pWW0 (64/81) (NP_542913)
<i>traD</i>	21995 – 22447	150		hyp. TraD pWW0 (59/71) (NP_542912) YciA <i>E.coli</i> (26/46) (NP_065329)
<i>hpp11*</i>	22444 – 22813	123		hyp. Protein pWW0 (73/82) (NP_542911) Protein pKM101 (39/60) (NP_065328)

* das Gen ist nur teilweise sequenziert

Tabelle 17. Sequenzanalyse von pBI1063.

Gen	kodierende Region (Start - Ende)	AS des Genproduktes	Eigenschaften, Domänen, Proteinfamilie (Position)	Homologe Proteine (Identität/Ähnlichkeit in %) (Acc.-Nummer)/mögliche Funktion
<i>traC*</i>	727 – 1	242		TraC nicht kultiviertes Bakterium (54/71) (NP_598165) TraC R751 (53/71) (NP_044265) DNA-Primase
<i>virB1</i>	1559 – 719	280	Transglykosylasedomäne (3-154)	TraL pKM101 (36/49) (I79263) Transglykosylase VirB1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (39/56) (BAA28695) TraD R751 (42/49) (NP_044268) Funktion unbekannt
<i>traF</i>	2157 – 1546	203	Signalpeptid	TraF <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (31/46) (NP_536246) TraF <i>Rhizobium</i> sp. (30/50) (NP_443827) Präpilin-Zyklisierung
<i>traG</i>	4082 – 2157	643	2 Transmembrandomänen TraG-Familie (114-618)	TraG nicht kultiviertes Bakterium (47/64) (CAD24394) TraG RP4 (46/63) (S22999) coupling-Protein
<i>traI</i>	6550 – 4079	823	Alanin-reiche Domäne (595-685) Relaxasedomäne (30-395)	TraI <i>Pseudomonas</i> sp. (25/39) (U66917) TraI RP4 (26/40) (S23001) Relaxase
<i>traH</i>	5967 – 5644	107		TraH RP4 (36/47) (S23000) Relaxosom
<i>traJ</i>	6921 – 6547	124		TraJ nicht kultiviertes Bakterium (44/58) (CAD24398) TraJ RP4 (45/58) (A34172) Relaxosom
<i>traK</i>	7444 – 7842	132		TraK nicht kultiviertes Bakterium (30/39) (CAD24399) oriT-bindendes Protein
<i>traL</i>	7880 – 8632	250		TraL nicht kultiviertes Bakterium (48/65) (NP_5981775) TraL RP4 (48/64) (S23004) Funktion unbekannt
<i>traM</i>	8650 – 9171	173	1 Transmembrandomäne	TraM <i>Legionella pneumophila</i> (23/52) (AAL25258) Funktion unbekannt
<i>orf6</i>	9514 – 9173	120		nicht signifikant
<i>orf3</i>	9603 – 9754	168		nicht signifikant
<i>orf21</i>	9757 – 10110	181		nicht signifikant
<i>orf4</i>	10574 – 10187	128		nicht signifikant

* Gen nicht vollständig sequenziert

Fortsetzung Tabelle 17.

Gen	kodierende Region (Start – Ende)	AS des Genproduktes	Eigenschaften, Domänen, Proteinfamilie (Position)	Homologe Proteine (Identität/Ähnlichkeit in %) (Acc.-Nummer)/mögliche Funktion
<i>kfrA</i>	10722 – 11396	224		TlpA <i>Salmonella enterica</i> (40/57) (NP_073266) KfrA R751 (27/41) (AAC64418) Regulation
<i>orf11</i>	11530 – 12080	183		nicht signifikant
<i>par</i>	12739 – 13212	157		ParBc <i>Bacillus anthracis</i> (31/56) (NP_653946) ParB <i>Pseudomonas putida</i> (32/51) (S18098) Partitioning
<i>repA</i>	14170 – 13202	322		Replikations Initiationsprotein nicht kultiviertes Bakterium (39/55) (CAC93881.1) RepA pIPO2T (39/55) (NP_444546) Replikation
<i>trbA</i>	14263 – 14559	98	HTH (42-96)	Transkriptionsregulator <i>Xylella fastidiosa</i> (48/61) (NP_061657) Transkriptionsregulator <i>E. coli</i> (39/59) (NP_313279) Regulation
<i>trbB</i>	14749 – 15741	330	T2SP_E (222-236) ATP/GTP-Motiv A (156-174) GSPII_E (60-292)	TrbB RP4 (51/70) (AAA26428) TrbB <i>Pseudomonas</i> sp. (50/67) (AAK50319) VirB11-homologe NTPase
<i>trbC</i>	15738 – 16157	139	Signalpeptid 2 Transmembrandomänen	TrbC unbekanntes Bakterium (34/59) (NP_598144) TrbC R751 (33/58) (NP_044241) Pilusuntereinheit
<i>trbD</i>	16164 – 16451	95	1 Transmembrandomäne	TrbD <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (38/56) (BAB47265) TrbD R751 (41/58) (NP_044242) Komponente des Transferapparates
<i>trbE</i>	16501 – 18963	882	CageE/TrbE (201-423)	TrbE nicht kultiviertes Bakterium (45/63) (NP_598146) TrbE R751 (45/63) (NP_044243) Komponente des Transferapparates
<i>trbJ</i>	18960 – 19757	265	Glutamin-reiche Region Signalpeptid	TrbJ <i>Rhizobium</i> sp. (26/49) (NP_443810) TrbJ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (27/51) (NP_053253) Komponente des Pilus?

Fortsetzung Tabelle 17.

Gen	kodierender Region (Start-Ende)	AS des Genproduktes	Eigenschaften, Domänen, Proteinfamilie (Position)	Homologe Proteine (Identität/Ähnlichkeit in %) (Acc.-Nummer)/mögliche Funktion
<i>orf2</i>	19757 - 20023	88		nicht signifikant
<i>trbL</i>	20023 – 21705	560	Signalpeptid 7 Transmembrandomänen Glycin-reiche Region (286-521) Alanin-reiche Region (303-387)	TrbL RP4 (32/45) (AAA26438) TrbL <i>Pseudomonas</i> sp. (30/43) (AAK50309.1) Komponente der Pore/Regulator?
<i>trbF</i>	21826 – 22450	226	1 Transmembrandomäne	TrbF <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (25/51) (NP_059753) TrbF <i>Rhizobium rhizogenes</i> (27/52) (NP_066704) Komponente der Pore
<i>trbG</i>	22699 – 23439	246		TrbG R751 (40/60) (NP_044245) TrbG <i>Pseudomonas</i> sp. (40/60) (AAK50314) Komponente der Pore
<i>trbH</i>	23439 – 23894	151	Signalpeptid	TrbH nicht kultiviertes Bakterium (23/42) (CAD24374.1) Funktion unbekannt
<i>trbI</i>	23899 - 25281	460	1 Transmembrandomäne	TrbI <i>Pseudomonas</i> sp. (34/52) (AAK50312) TrbI R751 (34/52) (NP_044247) Komponente der Pore
<i>pilB</i>		481	GSPII_E (58-366)	HofB <i>E. coli</i> (30/46) (BAB33534) PilB <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (30/46) (AAC36924) Sekretion?
<i>pilC</i>		352		PilC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (20/41) (B35384) TapC <i>Aeromonas salmonicida</i> (19/41) (AAC23568) Sekretion?
<i>meth</i>		310	DNA-Methylase (7-308)	5-Methylcytosin Methyltransferase <i>N. gonorrhoeae</i> (25/37) (AAC45838) Methylase <i>Lactococcus lactis</i> (24/40) (CAA73243) Methylase

Bei den Genen *pilC*, *pilB* und *meth* ist die kodierende Region nicht angegeben, da sie nicht im sequenzierten Bereich der Transferregion liegen.

Bei der Analyse der Transferproteine von pBI709 und pBI1063 wird auf die einzelnen VirB-Komponenten genauer eingegangen. Die Abb. 11 dient nur der Veranschaulichung des DNA-Membrankomplexes und der möglichen Funktion der einzelnen Proteine in diesem System.

D.3.2 Analyse der putativen Transferproteine von pBI709 und pBI1063

MpfJ (pBI709) und VirB1(pBI1063):

Datenbankabfragen haben gezeigt, dass MpfJ (314 AS) von pBI709 zu der Gruppe der VirB1- verwandten Proteine (z. B. VirB1 pTi 245 AS) gehört. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *virB1* (pBI1063) ergibt ein Protein von 280 Aminosäuren, von denen die ersten 202 Aminosäuren ebenfalls homolog zu Proteinen der VirB1-Familie sind. Ab Aminosäure 238 zeigt das hypothetische VirB1 von pBI1063 Übereinstimmungen zu TraD (129 AS) von R751, über dessen Funktion noch nichts bekannt ist. Aufgrund der Homologie von VirB1 (pBI1063) zu zwei verschiedenen Transferproteinen, könnte VirB1 ein bifunktionelles Protein sein.

Die VirB1-Protein-Familie besitzt im N-Terminus drei konservierte Sequenzmotive lytischer Transglykosylasen (Koonin und Rudd, 1994; Mushegian *et al.*, 1996; Dijkstra und Keck, 1996). In Abb. 12 sind die konservierten Domänen aus dem Alignment von MpfJ (pBI709), VirB1 (pBI1063) und den VirB1-homologen Proteinen TraL (pKM101), MpfJ (pWW0) und VirB1 (pTi) gezeigt.

		Motiv I		Motiv II	
Konsensus		UxxxUUxxUxxxESxxxxxxxx...		xxxxxDxGLMQUxxxxxxxxxxxx	
MpfJ pBI709	34	LAAC CAPT VHQ R TLKSLIGN ES TYN P YAI... 89		EGQRFSV GIG QLLV T NMR AMG	
MpfJ pWW0	44	LAAC CAPT VHP S TLKALIGN ES TFN P YAI... 99		DGKRYAM G L G QLLV T NMR R AG	
TraL pKM101	33	LAQR CAP DV S PL TM AY I VGH ES SNG P YRI... 89		DNK S FDM G LAQ I NSNN L V G LG	
VirB1 pTi	33	FARE CAP SV S PS TL AA I AQ V ES RF D PLAV... 88		ARH S LD V GL M Q I NSRN F SV L LG	
VirB1 pBI1063	6	LLL M CA P Q V AP E TV Q HI I H V ES RG N PLAI... 66		AG Y SV D M G LM Q V N SH N L P KL G	

		Motiv III	
Konsensus		xxUxxYNxGxxx	
MpfJ pBI709	149	DS F SM Y YS G NR T	
MpfJ pWW0	159	KA F SM Y YS G N E L	
TraL pKM101	149	HA L SC Y NT G SL T	
VirB1 pTi	147	RA I S A Y N T G D F T	
VirB1 pBI1063	126	AS L S A Y N T G N F R	

Abb. 12. Multiples Alignment von VirB1-homologen Proteinen. U steht für eine hydrophobe Aminosäure (I, V, L, M, W, F). Aminosäuren, die in allen sechs Proteinen konserviert sind oder Aminosäuren, die der Konsensussequenz entsprechen, sind in fettgedruckten Buchstaben dargestellt. (Motive nach Mushegian *et al.*, 1996).

Der katalytisch aktive Rest von lytischen Transglykosylasen ist die im Motiv I befindliche Glutaminsäure. Die sie umgebenden konservierten Aminosäuren sind für die Struktur dieser aktiven Domäne essentiell (Dijkstra und Thunnissen, 1994). Sowohl das MpfJ Protein von pBI709 als auch das VirB1 von pBI1063 zeigen die für diesen Bereich konservierten Aminosäuren. Motiv II ist in MpfJ (pBI709) nicht sehr stark ausgeprägt, hier stimmen nur drei von sechs Aminosäuren mit der Konsensussequenz überein. Motiv III ist in MpfJ (pBI709) wieder stärker konserviert, das in die Substratbindung involvierte Tyrosin und zwei der drei konservierten Aminosäuren sind vorhanden. Die Motive II und III sind in VirB1 von pBI1063 sehr stark konserviert (100 % Übereinstimmung mit der Konsensussequenz).

Bakterielle lytische Transglykosylasen degradieren Murein, indem sie die β -1-4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglukosamin spalten. Für die VirB1-homologen Proteine konjugativer Plasmide wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der lokalen Auflösung der Peptidoglukanschicht spielen und so den Aufbau des Transmembrankanals erleichtern (Bayer *et al.*, 1995; Baron *et al.*, 1997a; Llosa *et al.*, 2000).

Aufgrund der Homologien lässt sich auch für die Proteine MpfJ (pBI709) und VirB1 (pBI1063) eine derartige Funktion vermuten.

MpfA (pBI709) und TrbC (pBI1063):

Das Protein MpfA (153 AS) von pBI709 ist homolog zu MpfA (153 AS) von pWW0 und zu VirB2 (121 AS) von *Agrobacterium tumefaciens*; TrbC (139 AS) von pBI1063 zeigt Übereinstimmungen zu TrbC (154 AS) von R751/RP4. Die reifen Proteine VirB2 und TrbC (R751/RP4) sind die zyklischen Hauptuntereinheiten der jeweiligen Pili (Lai und Kado, 1998; Lai *et al.*, 2000; Kurbanova *et al.*, 2001; Haase und Lanka, 1997; Eisenbrandt *et al.*, 1999). Die Propiline besitzen einen gut konservierten zentralen "core-Bereich", ein N-terminales Signalpeptid und eine Zyklisierungsstelle im Bereich des C-Terminus (siehe Abb. 13) (Lai und Kado, 2000; Eisenbrandt *et al.*, 1999; Eisenbrandt *et al.*, 2000). TrbC von pBI1063 enthält die Signalpeptidase-Erkennungssequenz $^{34}\text{VMA-SD}^{38}$. Für das Protein MpfA von pBI709 konnte keine Signalpeptidase-Erkennungssequenz gefunden werden. Sowohl MpfA (pBI709) als auch TrbC (pBI1063) zeigen im zentralen Bereich konservierte Aminosäuren.

Die Zyklisierung der Propiline erfolgt in mehreren Schritten. VirB2 (121 AS) vom Ti-Plasmid wird durch Abspaltung des Signalpeptides in das T-Pilin (74 AS) überführt und durch eine Peptidbindung zwischen Glutamin 48 und Glycin 121 zyklisiert ("head to tail"-Mechanismus) (Lai und Kado, 2000). MpfA von pBI709 und pWW0 besitzen wie VirB2 im C-Terminus ein

konserviertes Glycin, so dass eine Peptidbindung zu einer Aminosäure (Asparagin) des N-Terminus möglich wäre. Allerdings müssten sowohl MpfA von pBI709 als auch MpfA von pWW0 C-terminal prozessiert werden, damit die MpfA Proteine nach dem "head to tail"-Mechanismus zyklisiert werden können (siehe Abb. 13).

IncP-Propiline werden in drei Schritten prozessiert (siehe Abb. 13). Zuerst werden von einer noch unbekannt Protease 27 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt. LepB spaltet dann am N-Terminus das Leaderpeptid ab. Im letzten Schritt werden durch das Plasmid-kodierte Protein TraF vier Aminosäuren am C-Terminus entfernt, so dass es zur Zyklisierung des Proteins durch Peptidbindung zwischen Serin 37 und Glycin 114 kommt (Präpilin-Zyklisierung) (Eisenbrandt *et al.*, 2000). Das Protein TrbC von pBI1063 zeigt alle Merkmale für eine analoge Prozessierung und könnte durch eine unbekannte Protease am C-Terminus um 17 Aminosäuren gekürzt werden (siehe Abb. 13). TraF von pBI1063 könnte an der Sequenz ¹¹⁷SG-ASLP¹²² die vier unterstrichenen Aminosäuren abspalten und die Zyklisierung des Proteins könnte durch eine Peptidbindung zwischen Serin 37 und Glycin 118 erfolgen. Die Zyklisierungsstelle der meisten homologen TrbC Proteine lautet **G-AEIA**. An der entsprechenden Position im TrbC von pBI1063 (¹¹⁸**G-ASLP**¹²²) sind nur zwei dieser Aminosäuren konserviert.

TraF (pBI1063):

Das TraF-Protein von pBI1063 ist homolog zu TraF-Proteinen des Ti-Plasmides von *Agrobacterium tumefaciens* und IncP-Plasmiden. TraF von RP4 ist ein essentielles Transferprotein, das die Präpilin-Zyklisierung von TrbC (RP4) katalysiert. Als einziges Protein der TraI Region ist es zusammen mit Proteinen aus der TraII Region für die Bildung des Mpf-Komplexes verantwortlich. Auch auf dem Plasmid pBI1063 liegt das Gen für TraF nicht benachbart zu den Genen, die für putative Mpf-Proteine kodieren (siehe Abb. 10).

Die TraF-ähnlichen Proteine besitzen mehrere konservierte Bereiche. So sind z. B. zwei Cysteinreste hoch konserviert, bei TraF von pBI1063 an Position 61 und 81. Diese Cysteinreste können eine Disulfidbrücke bilden und somit für die Struktur von TraF wichtig sein. Mutationen in den entsprechenden Cysteinresten von TraF (RP4) beeinflussen die Zyklisierung von TrbC (RP4) erheblich (Eisenbrandt *et al.*, 2000). TraF-ähnliche Proteine und prokaryotische Signalpeptidasen des TypI besitzen zwei konservierte Aminosäuren (Serin und Lysin), in TraF von pBI1063 sind dies Serin 37 und Lysin 89, die für die katalytische Reaktion dieser Enzyme nach einem Serin-Lysin-Dyad Mechanismus verantwortlich scheinen

(Eisenbrandt *et al.*, 2000). Im C-terminalen Bereich der TraF-ähnlichen Proteine tritt die konservierte Region ¹⁵⁴SxDxRYFGP¹⁶² auf (die Positionsangaben beziehen sich auf TraF von pBI1063). Sie könnte ein wichtiges strukturelles Element sein, da Mutationen des Asparaginsäurerestes D155 in TraF von RP4 dazu führen, dass keine Pili mehr gebildet werden, keine pilusspezifische Phagenadsorption mehr erfolgt und die Konjugationsrate drastisch reduziert ist (Eisenbrandt *et al.*, 2000).

Das Plasmid pBI709 kodiert nicht für ein TraF-ähnliches Protein. Auch an der Prozessierung von VirB2 (pTi) ist kein plasmidkodiertes Protein beteiligt (Lai *et al.*, 2000). So könnte auch das MpfA von pBI709 durch ein chromosomalkodiertes Protein prozessiert werden.

MpfB (pBI709) und TrbD (pBI1063):

Den höchsten Homologiegrad zeigt das Protein MpfB (99 AS) von pBI709 zu dem putativen Transferprotein MpfB (98 AS) von pWW0 (74 % gleiche und 89 % ähnliche Aminosäuren). Etwas schwächere Übereinstimmungen weist MpfB (pBI709) zu den VirB3 (pTi)-homologen Proteinen auf: LvhB3 (93 AS) (*Legionella pneumophila*), VirB3 (99 AS) (*Xanthomonas axonopodis* Plasmid pXAC64) und dem putativen Typ IV-Sekretionsprotein B3 (94 AS) (*Caulobacter crescentus* CB15). Das TrbD-Protein (95 AS) von pBI1063 ist u. a. homolog zu den VirB3 (pTi)-ähnlichen Proteinen TrbD (99 AS) (*Agrobacterium tumefaciens*), TrbD (99 AS) (*Rhizobium rhizogenes*) und TrbD (103 AS) von R751.

Für TrbD von R751/RP4 und für VirB3 von pTi (108 AS) ist bekannt, dass es sich um essentielle Transfer-/Virulenzproteine handelt, die am Aufbau des Mpf-Komplexes beteiligt sind (Lessl *et al.*, 1992; Berger und Christie, 1994). Diese Proteine besitzen keine Signalsequenz, aber hydrophobe Bereiche, bei denen es sich um Transmembrandomänen handeln könnte. Auch die Proteine MpfB (pBI709) und TrbD (pBI1063) zeigen diese Merkmale. Konservierte Domänen sind von diesen Proteinen nicht bekannt. Die genaue Lokalisation der VirB3-homologen Proteine im Mpf-Komplex ist nicht eindeutig bestimmt. Nähere Untersuchungen zu VirB3 vom Ti-Plasmid haben gezeigt, dass VirB3 in Abwesenheit von VirB4 nur in der inneren Membran detektiert werden kann, in Anwesenheit von VirB4 findet man VirB3 sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran (Jones *et al.*, 1994).

Aufgrund der Homologie von MpfB (pBI709) und TrbD (pBI1063) zu essentiellen Proteinen des Mpf-Komplexes, kann auch für diese Proteine eine Beteiligung am Aufbau des Translokationsapparates oder des Pilus vermutet werden.

MpfC (pBI709) und TrbE (pBI1063):

Beide Proteine sind homolog zu VirB4-ähnlichen Proteinen (z. B. VirB4 von pTi 789 AS). MpfC (894 AS) von pBI709 und TrbE von pBI1063 (882 AS) besitzen beide eine Walker A ATP-Bindedomäne (⁵³²TGSGKTT⁵³⁸ in pBI709 bzw. ⁴⁶⁹GPTGGGKST⁴⁷⁷ in pBI1063), die bei allen VirB4-homologen Proteinen konserviert ist (Lessl *et al.*, 1992; Berger und Christie 1993; Cao und Saier, 2001). VirB4 liegt als Dimer oder Homo-Oligomer vor, da Mutanten mit einem Defekt in der Walker A Box einen dominant-negativen Phänotyp zeigen. Für TrbE von RP4 und für VirB4 von pTi konnte eine Lokalisation in der Cytoplasmamembran gezeigt werden (Grahn *et al.*, 2000; Dang und Christie, 1997).

Die Dimerisierung oder Homo-Oligomerisierung von VirB4 (pTi) ist eine wichtige Voraussetzung für den Zusammenbau des Transmembrankanals, d. h. VirB4 ist eine strukturelle Komponente des T-DNA-Transportkomplexes (Dang *et al.*, 1999). Da der Zusammenbau der Transmembranpore unabhängig von der VirB4 ATPase-Aktivität ist, wird vermutet, dass VirB4 ATP-induzierte Konformationsänderungen bewirkt und so den Exportprozess aktiviert (Dang *et al.*, 1999).

MpfD (pBI709) und TrbJ (pBI1063):

Das Protein MpfD von pBI709 (228 AS) ist homolog zu MpfD (229 AS) von pWW0 und TraC (237 AS) von pKM101. Biochemische und zellbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass TraC von pKM101 extrazellulär lokalisiert ist und mit anderen Proteinen Komplexe eingeht (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a). Für TraC von pKM101 werden zwei mögliche Funktionen diskutiert: 1. TraC ist eine Komponente des Pilus oder 2. TraC ist Teil eines Pilus-Assembly-Komplexes (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a). Das TraC (pKM101) homologe VirB5 (pTi) konnte in Fraktionen zusammen mit dem T-Pilus gereinigt werden, als Bestandteil des Pilus konnte es aber nicht nachgewiesen werden (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999b). TrbJ von pBI1063 (265 AS) zeigt Ähnlichkeiten zu den VirB5-homologen Proteinen TrbJ des Plasmides pNGR234a aus *Rhizobium* sp. NGR234 und eines Ti-Plasmides (pTi-Sakura) aus *Agrobacterium tumefaciens* (beide 267 AS). Wie die anderen VirB5-ähnlichen Proteine besitzen MpfD (pBI709) und TrbJ (pBI1063) eine N-terminale Signalsequenz und die prozessierte Form ist hydrophil.

MpfE (pBI709) und TrbL (pBI1063):

Das MpfE von pBI709 (286 AS) zeigt die beste Übereinstimmung zu dem putativen Transferprotein MpfE (287 AS) von pWW0 und schwache Übereinstimmung zu VirB6 (311 AS) von *Agrobacterium tumefaciens*. TrbL (560 AS) von pBI1063 zeigt zu dem VirB6 homologen Protein TrbL (528 AS) von RP4 die größten Ähnlichkeiten. Wie die VirB6-ähnlichen Proteine besitzen auch MpfE (pBI709) und TrbL (pBI1063) mehrere Transmembrandomänen, es konnten für MpfE sechs und für TrbL sieben mögliche Transmembrandurchgänge gefunden werden. Die Proteine TrbL (pBI1063) und TrbL (RP4) besitzen eine mögliche Proteinsignalsequenz und eine Glycin-reiche Region.

TrbL von RP4 ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert (Grahn *et al.*, 2000) und auch für VirB6 wird angenommen, dass es als polytopisches Protein in der inneren Membran sitzt (Hapfelmeier *et al.*, 2000). Durch Deletion von *virB6* werden die Agrobakterien-Stämme avirulent, die Mengen an VirB5 und VirB3 (Komponenten des T-Pilus oder Pilus-Assembly-Komplexes) sind reduziert und die T-Pili werden nicht gebildet. Durch direkte Interaktion mit VirB5 könnte VirB6 eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zusammenbaus des T-Pilus übernehmen (Hapfelmeier *et al.*, 2000).

MpfF (pBI709) und TrbF (pBI1063):

Diese Proteine gehören zu der Gruppe der VirB8 (pTi) ähnlichen Proteine, die zu den essentiellen DNA-Transportproteinen gehören (Dale *et al.*, 1993; Haase *et al.*, 1995). Wie die anderen Mitglieder der VirB8-Familie besitzen MpfF (221 AS) von pBI709 und TrbF (226 AS) von pBI1063 eine Transmembrandomäne. Untersuchungen an VirB8 (pTi) deuten darauf hin, dass VirB8 (223 AS) ein bitopisches Protein der inneren Membran ist, mit einem kurzen cytoplasmatischen N-Terminus und einer C-terminalen periplasmatischen Domäne (Thorstenson und Zambryski, 1994; Das und Xie, 1998). Für VirB8 (pTi) wird angenommen, dass es Teil des Transmembrankomplexes ist, und mit sich selbst, mit VirB9 und VirB10 interagiert (Das und Xie, 2000). Ein Glycinrest ist in allen VirB8-homologen Proteinen konserviert, in MpfF (pBI709) an Position 67 und in TrbF (pBI1063) an Position 75. Ein Austausch in dieser Aminosäure bei VirB8 (pTi) führt zu einem avirulenten Phänotyp (Kumar und Das, 2001).

MpfG (pBI709) und TrbG (pBI1063):

Beide Proteine sind homolog zu Proteinen der VirB9 (pTi) Familie. Ebenso wie für VirB8, wird auch für VirB9 (283 AS) eine Funktion als Strukturkomponente des Transmembrankomplexes postuliert. TrbG (297 AS) von RP4 und VirB9 (pTi) sind periplasmatische Proteine (Grahn *et al.*, 2000; Das und Xie, 1998), wobei VirB9 mit dem in der äußeren Membran verankerten VirB7 einen Komplex bildet (Baron *et al.*, 1997b). Interaktionen von VirB9 mit den in der inneren Membran lokalisierten Proteinen VirB8 und VirB10 konnten ebenfalls gezeigt werden (Das und Xie, 2000).

MpfH (pBI709) und TrbI (pBI1063):

MpfH (424 AS) von pBI709 und TrbI (460 AS) von pBI1063 sind homolog zu TrbI (473 AS) von R751 sowie TrbI (438 AS) und VirB10 (377 AS) beide vom Ti-Plasmid. VirB10 (pTi) ist ein monotopisches Protein der Cytoplasmamembran mit einer kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Domäne und einem langen periplasmatischen Teil (Ward *et al.*, 1990). Außer mit VirB8 und VirB9 ist VirB10 in der Lage, mit sich selbst einen Komplex zu bilden und ist vermutlich auch Teil des Translokationsapparates (Ward *et al.*, 1990b; Beaupré *et al.*, 1997; Das und Xie, 2000).

TrbH (pBI1063):

Das putative TrbH (151 AS) von pBI1063 hat eine Größe von 151 Aminosäuren und enthält die Signalpeptidase-Erkennungssequenz ¹¹ALA-LS¹⁵. Die N-terminale Hälfte dieses Proteines ist homolog zu dem putativen Konjugationsprotein TrbH (153 AS) eines nicht kultivierten Bakteriums (Acc.-Nummer CAD24374). Aufgrund der schwachen Übereinstimmungen kann über die Funktion dieses putativen TrbH (pBI1063) Proteins keine Aussage getroffen werden. Da das TrbH des nicht kultivierten Bakteriums homolog zu TrbH (162 AS) von R751 ist, wird auch das TrbH von pBI1063 in die Gruppe der TrbH-ähnlichen Proteine eingruppiert. TrbH von RP4 ist ein essentielles Transferprotein (Lessl *et al.*, 1993), das mit der äußeren Membran assoziiert sein könnte (Grahn *et al.*, 2000).

MpfI (pBI709) und TrbB (pBI1063):

Beide Proteine zeigen Homologien zu Mitgliedern der VirB11 (pTi) Familie. Mit z. Zt. ca. 89 homologen Proteinen ist diese Familie die größte unter den VirB-Familien (Cao und Saier, 2001). Während TrbB (319 AS) von RP4 ein cytoplasmatisches Protein zu sein scheint

(Grahn *et al.*, 2000), sind TrwD (358 AS) von R388 und VirB11 (343 AS) vom Ti-Plasmid mit der inneren Membran assoziiert (Ward *et al.*, 1990a; Stephens *et al.*, 1995; Machón *et al.*, 2002). Für VirB11 (pTi) wird eine Homomultimerbildung angenommen (Rashkova *et al.*, 2000), TrbB (RP4), TrwD (R388) und HP0525 (*Helicobacter pylori*) liegen als Hexamere vor (Krause *et al.*, 2000a und 2000b). TrbB (RP4), VirB11 (pTi) und TrwD (R388) sind essentielle Komponenten des konjugativen DNA-Transfersystems (Haase *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1990a; Rivas *et al.*, 1997). Die Mitglieder der VirB11-Familie besitzen NTP-Bindedomänen, die für den Transfer essentiell sind, dies konnte z. B. für VirB11 (pTi), TrwD (R388), XcpR (*Xanthomonas campestris*) und Pule (*E. coli*) gezeigt werden (Stephens *et al.*, 1995; Rivas *et al.*, 1997; Turner *et al.*, 1993; Possot und Pugsley, 1994). Neben den Nukleotid-Bindedomänen zeigen die VirB11-ähnlichen Proteine weitere konservierte Domänen. Auch die von pBI709 und pBI1063 kodierten Proteine Mpfl bzw. TrbB besitzen die für die VirB11-Familie charakteristischen Proteinmotive (siehe Abb. 14). Eine *in vitro* NTPase-Aktivität konnte für einige der VirB11-ähnlichen Proteine gezeigt werden, die Energie aus diesem Prozess wird vermutlich für den Zusammenbau des Transmembrankanals verwendet (Krause *et al.*, 2000b).

	Walker Box A	Aspartat Box
Motiv	GxxGxGKT	EDxxE
TrbB pBI1063	159 VVGGTGS GKTT LSNAIHAIHQEHPNDRILII	IEDT GELQC 198
TrbB R751	154 VI GGTGS GKTT LVNAINEMVIQDPTERVFI	IEDT GEIQC 193
Mpfl pBI709	180 IS AGTNA GKTT WLNGLQHI---DPHERIVT	IEDT REIRI 216
VirB11 pTi	167 LC GPTGS GKTT MSKTLISAIP---PQERLIT	IEDT LELVI 203
	Walker Box B	Histidin Box
	DxxxxGE	HxxxxxxxxH
TrbB pBI1063	221 SLRLR PDR ILV GE VRDGSALTLIEAWNT	GH PGGIATIHSD 260
TrbB R751	216 TLRMR PDR ILV GE VRGPEALDLLMAWNT	GH EGGAATLHAN 255
Mpfl pBI709	245 ILRLT PDR AIME GE IRGGEAFPFLELLNT	GH SGSLSSIHAD 284
VirB11 pTi	232 SLRMR PDR ILL GE MRDDAAWAYLSEVVSG	GH PGSISTIHGA 271

Abb. 14. Multiples Alignment von VirB11-homologen Proteinen. Aminosäuren, die mit dem Proteinmotiv übereinstimmen und Aminosäuren, die in allen gezeigten Proteinen konserviert sind, wurden mit fettgedruckten Buchstaben dargestellt. Die Walker B Box dieser Protein-Familie ist atypisch, da ein konserviertes D durch ein G ersetzt ist (Rivas *et al.*, 1997).

TraB (pBI709) und TraG (pBI1063):

Beide Proteine zeigen Übereinstimmungen zu der TraG-Protein Familie. Die TraG-ähnlichen Proteine sind essentielle Transferproteine der inneren Membran (Gomis-Rüth *et al.*, 2002). Diese Proteine werden auch als *coupling*-Proteine bezeichnet, da vermutet wird, dass sie das Relaxosom an den Translokationsapparat koppeln (Cabezón *et al.*, 1997). Die Interaktionen

von *coupling*-Proteinen mit Proteinen des Relaxosoms konnten bei verschiedenen Plasmiden gezeigt werden (Disqué-Kochem und Dreiseikelmann, 1997; Szpirer *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2002), ein Beweis für eine Interaktion der TraG-ähnlichen Proteine mit Komponenten der Membranpore steht noch aus. Die Proteine der TraG-Familie besitzen zwei konservierte Domänen (Schröder *et al.*, 2002). Zwei Protein-Motive ähneln den Walker A und B Boxen (siehe Abb. 15). Diese sind für den Transfer essentiell, da Mutanten mit einem Defekt in den Nukleotidbindestellen Transfer-negativ sind (Balzer *et al.*, 1994; Moncalián *et al.*, 1999). Die Nukleotidbindestellen sind auch in den TraG-homologen Proteinen TraB (pBI709) und TraG (pBI1063) vorhanden, allerdings zeigt TraG (pBI1063) wie z. B. auch TraG von RP4 einen Austausch in der Konsensussequenz der Walker A Box AxxxxGKG (die abweichende Aminosäure ist unterstrichen). Es könnte sich dennoch um ein funktionelles P-loop-Motiv handeln, da es mit der P-loop-Sequenz von Adenylat-Kinasen übereinstimmt (Saraste *et al.*, 1990).

	Walker Box A	Walker Box B
TraG pBI1063	162 VVA A PTRS GK GIS	431 LLLLF D ELPS
TraG RP4	179 TY A PTRS GK GVG	444 LLMML D EFPS
TraB pBI709	143 IC A SIG A G K SVS	364 LWLFL D ELQS
TrwB R388	128 VNGAT G T G KSVL	351 LWLFI D ELAS

Abb. 15. Ausschnitt aus einem multiplen Alignment von TraG-homologen Proteinen. Gezeigt sind die Nukleotidbindedomänen Walker Boxen A und B. Die mit der Konsensussequenz übereinstimmenden Aminosäuren sind durch fettgedruckte Buchstaben gekennzeichnet.

Schröder *et al.* (2002) favorisieren ein Modell, bei dem TraG (RP4) als Hexamer in der inneren Membran lokalisiert ist und eine Pore bildet, an die das Relaxosom bindet.

TraC (pBI709):

TraC (989 AS) von pBI709 ist homolog zu dem putativen Transferprotein TraC (978 AS) von pWW0 (978 AS), zu TrwC (991 AS) von pXAC64 und zu TrwC (966) von R388. TrwC (R388) ist ein bifunktionelles Enzym, es besitzt eine Relaxase-Aktivität und eine DNA-Helikase-Aktivität (Grandoso *et al.*, 1994; Llosa *et al.* 1995, 1996). Die N-terminalen 348 Aminosäuren von TrwC sind für die Katalyse der initialen Nicking-Reaktion an der *nic-site* des *oriT* und für die finale Re-Ligation des Plasmides ausreichend. Die Helikase-Aktivität ist in der C-terminalen Region von TrwC lokalisiert. Relaxasen, die beide Aktivitäten in einem Protein vereinen, sind auch vom F Plasmid (TraI), von R100 (TraI) und R46/pKM101 (TraI) bekannt. Andere Relaxasen z. B. TraI von RP4 oder VirD2 vom Ti-Plasmid haben keine Helikase-Aktivität. Bei diesen Relaxasen konnte ein konserviertes Tyrosin als aktive

Aminosäure für die Transesterifikation identifiziert werden. Auch bei TraI (F-Faktor u. R100), TrwC (R388), TraI (R46) und TraC (pBI709) treten konservierte Tyrosine auf (Abb. 16).

TrwC R388	18	YY EDGADD YYA	28
TraC pBI709	17	HY FSAADD YYA	27
TraI R46	18	YY SDAKDD YY S	28
TraI F	16	YY TD-KDN YY V	25

Abb. 16. Ausschnitt aus einem multiplen Alignment von Relaxasen/Helikasen. Die konservierten Tyrosine sind mit fettgedruckten Buchstaben gekennzeichnet.

Byrd und Matson (1997) vermuten, dass das Tyrosin 23 von TraI (F-Faktor) und das Tyrosin 26 von TrwC (R388) die katalytisch aktiven Aminosäuren sind. Bis auf TraC von pBI709 besitzen die anderen Relaxasen zwei konservierte Tyrosin-Cluster von jeweils zwei Tyrosinen. Zur Termination des Strang-Transfers nach dem *rolling-circle* Mechanismus werden zwei aktive Tyrosine benötigt. Diese können entweder durch ein Relaxase-Dimer bereitgestellt werden oder durch zwei aktive Tyrosine in einem Relaxasemolekül (Lanka und Wilkins, 1995; Byrd und Matson, 1997). Der zweitgenannte Mechanismus könnte z. B. von den Relaxasen der Plasmide F und R388, die zwei Cluster von zwei potentiell aktiven Tyrosine besitzen, benutzt werden (Byrd und Matson, 1997).

In der C-terminalen Region von TrwC (R388) sind sieben konservierte Motive von DNA-Helikasen zu finden (Llosa *et al.*, 1994). Auch TraC von pBI709 besitzt einige dieser konservierten Motive: I: ⁵⁰⁰IQGDAGTGKTY⁵¹¹, II: ⁵⁸⁰VLDEAGV⁵⁸⁶, III ⁶⁰⁴ARLVQLGDTKQTEAIEAG⁶²¹, V: ⁸⁷⁷TVHSAQGLTNDRV⁸⁸⁹ und VI: ⁹⁰⁴LFYVAISRAR¹⁰³. Die Helikase-Aktivität des C-terminalen Teils von TrwC (R388) ist vermutlich für die DNA-Strangtrennung, die für den konjugativen Transfer benötigt wird, verantwortlich. Weiterhin befindet sich in der C-terminalen Region die Dimerisierungs-Region von TrwC (Llosa *et al.*, 1996).

Aufgrund der Homologie zu TrwC kann auch für TraC von pBI709 eine Funktion als Nickase und Helikase vermutet werden.

TraA und TraD (pBI709):

TraA (128 AS) von pBI709 zeigt nur Homologien zu dem putativen Transferprotein TraA (127 AS) von pWW0. Für TraD (150 AS) von pBI709 konnten nur Homologien zu TraD (151 AS) von pWW0 und YciA (159 AS) von *E. coli* gefunden werden. Die Proteine TraA und TraD von pBI709 und pWW0 zeigen weder Signalpeptidase-Erkennungssequenzen noch

Proteinmotive oder Transmembrandomänen, die auf mögliche Funktionen der Proteine schließen lassen.

Hpp31, Hpp26, Hpp25, Hpp18, Hpp2 und Hpp11(pBI709):

Alle diese Proteine zeigen Homologien zu hypothetischen Proteinen von pWW0 und Proteinen unbekannter Funktion von *Xanthomonas* oder *Xylella fastidiosa* (Einzelheiten siehe Tab. 16). Konservierte Proteinmotive konnten für keines dieser Proteine gefunden werden. Hpp18 (105 AS) und Hpp31 (115 AS) werden möglicherweise mit einem Signalpeptid synthetisiert. Der N-terminale Teil von Hpp18 zeigt Homologien zu TrbM (196 AS) von R751, ebenso wie Hpp18 besitzt dieses Protein ein Signalpeptid. Die Funktion von TrbM (R751) ist jedoch unbekannt. Die hypothetischen Proteine Hpp26 (70 AS) und Hpp25 (129 AS) sind homolog zu den Proteinen NP_542926 (70 AS) und NP_542925 (130 AS) von pWW0 und den Proteinen NP_644771 (82 AS) und NP_644770 (131 AS) von pXAC64 und besitzen eine mögliche Transmembrandomäne. Auch auf den Plasmiden pWW0 und pXAC64 befinden sich die Gene dieser Proteine zwischen möglichen Transfergenen (siehe Abb. 8), deshalb ist eine Funktion dieser hypothetischen Proteine beim DNA-Transfer möglich.

ORF1 (pBI709):

Zwischen dem Gen *hpp2*, das für das hypothetische Protein Hpp2 kodiert und dem Transfergen *traC* liegt *orf1*, das für ein putatives Protein von 248 AS kodiert. Es konnten weder auf DNA- noch auf Protein-Ebene signifikante Übereinstimmungen gefunden werden.

Nuc1 und Nuc2 (pBI709):

Für die Proteine Nuc1 und Nuc2 konnten Übereinstimmungen zu hypothetischen Nukleasen von pWW0 gefunden werden. Die putative Nuklease Nuc2 zeigt auch Homologien zu einer Nuklease von pKM101. Diese periplasmatische Endonuklease von pKM101 kann einzel- und doppelsträngige DNA degradieren (Pohlman *et al.*, 1993). Nuc von pKM101, Nuc2 von pBI709 und die Nuklease NP_542917 von pWW0 besitzen ein Proteinmotiv, das bei Phospholipasen D, aber auch bei Endonukleasen von *E. coli* zu finden ist.

Bisher konnte die Funktion der Nuklease von pKM101 nicht geklärt werden. Da das Gen für diese Nuklease in der Transferregion von pKM101 liegt, wurde eine mögliche Funktion bei der Konjugation vermutet. Diese Hypothese konnte jedoch bislang nicht bestätigt werden (Winans und Walker, 1983; Pohlman *et al.*, 1993).

TrbA (pBI1063):

Zu Beginn des *trb*-Clusters liegt das Gen *trbA*, das für einen hypothetischen Transkriptionsregulator kodieren könnte. Das TrbA-Protein (98 AS) zeigt Ähnlichkeiten zu einem Transkriptionsregulator (86 AS) von *Xylella fastidiosa*, zu einem putativen Transkriptionsregulator (154 AS) vom *E. coli* Virulenzplasmid pO157:H7 und zu TrbA von RK2 (121 AS). TrbA von pBI1063 besitzt ein Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH) und scheint somit zu der Gruppe der DNA-bindenden Helix-Turn-Helix Proteine zu gehören. Bei IncP-Plasmiden wird die Expression der Gene für die Replikation, für die Stabilität und für den Transfer in einem komplexen Regulationsmechanismus koordiniert. Zu diesen Regulatorproteinen gehören KorA, KorB, KorC und TrbA (Zatyka *et al.*, 1994; Zatyka und Thomas, 1998). TrbA (RP4) reprimiert die Transkription von *trfA*, dessen Genprodukt für die vegetative Replikation essentiell ist, und die des essentiellen Transfersgens *trbB* (Jagura-Burdzy *et al.*, 1992). Außer der Regulation des *trb*-Operons wird auch die TraI Region von RP4 durch TrbA reguliert (Zatyka *et al.*, 1994) Die Ähnlichkeit von TrbA (pBI1063) zu Regulatorproteinen ist ein Hinweis auf ein reguliertes Konjugationssystem des Plasmides pBI1063. Ob auch bei pBI1063 eine Koregulation von konjugativen Transfer und Replikation, wie sie z. B. bei RP4 (Zatyka *et al.*, 1994) und dem Ti-Plasmid (Li und Farrand, 2000) beobachtet wurde, stattfindet, kann nicht beurteilt werden.

TraI, TraJ, TraH und TraK (pBI1063):

Aufgrund der Übereinstimmungen von TraH (107 AS), TraI (823 AS) und TraJ (124 AS) zu Proteinen des Relaxosoms von RP4 kann auch für diese Proteine eine derartige Funktion vermutet werden. Bei RP4 liegen *traI*, *traH* und *traJ* in dem Relaxaseoperon, wobei *traH* vollständig im Gen *traI* liegt (Ziegelin *et al.*, 1991). Die gleiche Genanordnung findet man auch bei pBI1063 (siehe Abb. 10). Die Bildung des Relaxosoms von RP4 beginnt mit der Bindung von TraJ an einen *inverted repeat* im *oriT*, TraI bindet anschließend spezifisch an den TraJ-*oriT*-Komplex. Von TraH wird vermutet, dass es diesen TraI-TraJ-*oriT*-Komplex stabilisiert, es ist aber kein essentielles Transferprotein (Lanka und Wilkins, 1995). Mehrere TraK-Moleküle binden ebenfalls an den *oriT*, wobei sich die TraK-Binderegion und die Erkennungssequenzen für die Relaxosombildung nicht überlappen (Ziegelin *et al.*, 1992). Die Funktion von TraK ist bisher nicht geklärt, es wird vermutet, dass TraK hilft, die Nachbarregionen der *nic-site* zu entwinden, indem es positive *supercoils* einführt (Lanka und Wilkins, 1995).

TraI von RP4 ist die Relaxase, sie öffnet einen Strang an der *nic-site* des *oriT* und bindet kovalent an das 5' Ende des DNA-Stranges (Pansegrau *et al.*, 1990b). DNA-Relaxasen zeigen drei konservierte Motive (Pansegrau *et al.*, 1994a), die auch im TraI von pBI1063 zu finden sind. Motiv I von TraI (pBI1063) ¹⁶**AKLVRYV**²² enthält das konservierte Tyrosin. In TraI (RP4) und VirD2 (pTi) ist diese Aminosäure essentiell für die Endonukleaseaktivität dieser Enzyme (Pansegrau *et al.*, 1994; Vogel und Das, 1992). Das Tyrosin 22 von TraI (RP4) wird über eine Transesterifikation kovalent an das 5' Ende der gespaltenen DNA gebunden. Das Motiv III von TraI (pBI1063) lautet: ¹²⁷**HIDTDHLHVHVAINK**¹⁴¹. Es wird vermutet, dass dieses Motiv zusammen mit Motiv I im gefalteten Protein Teil des katalytischen Zentrums ist. Die DNA-Erkennungsdomäne von TraI (pBI1063) könnte durch das Motiv II repräsentiert werden, ⁸⁶**TYHLVFSFPPE**⁹⁷ (Pansegrau *et al.*, 1994a).

TraL (pBI1063):

TraL (250 AS) von pBI1063 ist homolog zu TraL von RP4 (241 AS) und zu TraL (241 AS) von pADP-1 aus *Pseudomonas* sp. ADP. Wie seine homologen Proteine besitzt auch TraL von pBI1063 im N-Terminus eine Walker A Box (²¹**GKGGVGKS**²⁸). Bei RP4 gehört *traL* zusammen mit *traK* und *traM* zum *leader*-Operon, das als erstes Operon beim DNA-Transfer in den Rezipienten gelangt (Pansegrau *et al.*, 1990a). TraL (RP4) ist ein nicht essentielles Transferprotein, das Sequenzähnlichkeiten zu VirC1 vom Ti-Plasmid besitzt (Pansegrau *et al.*, 1994b; Balzer *et al.*, 1994). Die VirC Proteine stimulieren die Prozessierung der T-DNA.

TraM (pBI1063):

Das hypothetische TraM (173 AS) von pBI1063 besitzt eine C-terminale potentielle Transmembranregion und zeigt Ähnlichkeiten zu dem TraM (145 AS) von *Legionella pneumophila*, das homolog zu TraM (145 AS) von RP4 ist. Eine C-terminale Transmembranregion von TraM (RP4) könnte als Membrananker fungieren (Grahm *et al.*, 2000). Die Funktion der TraM-Proteine konnte noch nicht ermittelt werden.

TraC (pBI1063):

Das putative TraC von pBI1063 zeigt große Ähnlichkeiten zur Primase TraC2 (1448 AS) von R751. Das *traC* Gen von R751 besitzt drei weitere "*in frame*"-Translationsstarts und führt zu vier Polypeptiden unterschiedlicher Größe (TraC1, TraC2, TraC3 und TraC4) (Miele *et al.*, 1991). Am Beispiel von Collb-P9 und RP4/R751 wurde experimentell nachgewiesen, dass die

Primase beim konjugativen DNA-Transfer mit in den Rezipienten transferiert wird (Rees und Wilkins, 1990). Dort kann dann unabhängig von Wirtsenzymen die diskontinuierliche DNA-Synthese beginnen. Die Primasen besitzen ein konserviertes Proteinmotiv EGYATA, das Teil der Primasedomäne dieser Enzyme ist (Strack *et al.*, 1992). Das hypothetische *traC* von pBI1063 konnte aufgrund von Sequenzierungsschwierigkeiten nicht vollständig sequenziert werden. Das unvollständige TraC (pBI1063) hat eine Länge von 242 AS, das konservierte Proteinmotiv der Primasen ist in der bisher bekannten Proteinsequenz nicht vorhanden.

ORF2 (pBI1063): Dieses offene Leseraster kodiert für ein hypothetisches Protein von 88 Aminosäuren. Es wurden in den Datenbanken keine signifikanten Homologien gefunden. Da *orf2* zwischen *trbJ* und *trbL* liegt, könnte sein Genprodukt auch am konjugativen DNA-Transfer beteiligt sein.

Zusammenfassung:

Für Transferproteine konjugativer Systeme unterschiedlicher Inc-Gruppen konnte gezeigt werden, dass diese untereinander und zu den VirB-Proteinen des Ti-Plasmides homolog sind und die für einige Protein-Familien (VirB11-, TraG-, VirB2-, Relaxase-Familie) charakteristischen Proteinmotive zeigen (Christie und Vogel, 2000; Zechner *et al.*, 2000).

Auch die Transferproteine von pBI709 und pBI1063 zeigen Ähnlichkeiten zu Proteinen von IncP-Plasmiden, dem VirB-Operon und dem IncP-9 Plasmid pWW0.

Das Plasmid pBI709 aus *Pseudomonas* sp. zeigt auffällige Ähnlichkeiten zu pWW0, die sich sowohl in der Genorganisation der Transferregion und der angrenzenden Bereiche, als auch auf Proteinen-Ebene widerspiegeln. Diese Daten deuten auf eine nahe Verwandtschaft dieser beiden Plasmide bzw. ihres Transfersystems hin.

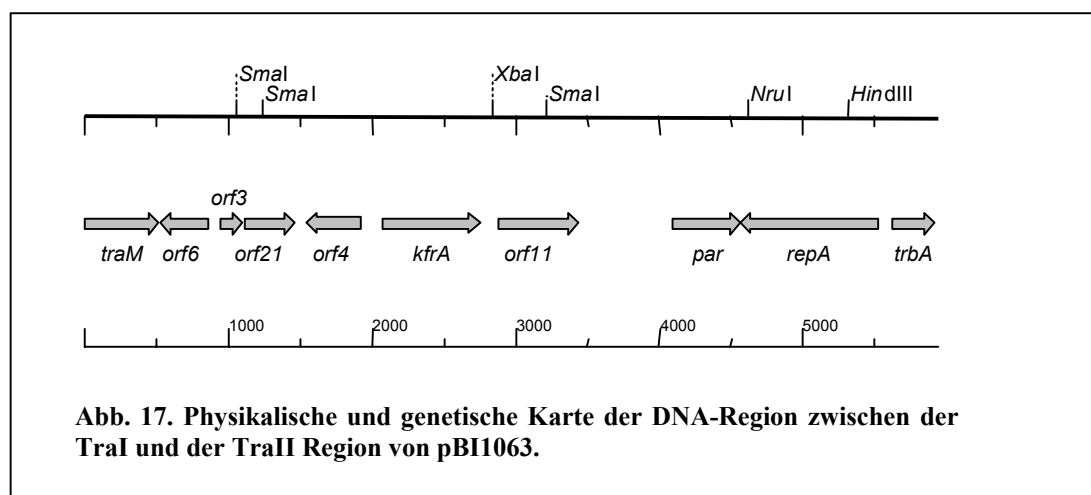
Während bei pBI709 alle Transferproteine die größten Ähnlichkeiten zu Transferproteinen von pWW0 zeigen, gibt es kein bekanntes Transfersystem zu dem alle Transferproteine von pBI1063 den höchsten Ähnlichkeitsgrad zeigen. So zeigen einige Proteine von pBI1063 die größten Ähnlichkeiten zu Transferproteinen von IncP-Plasmiden, während andere homolog zu Transferproteinen unbekannter oder nicht kultivierter Bakterien sind. Auch die Genorganisation der TraI Region und der TraII Region von pBI1063 ähneln verschiedenen Konjugationssystemen. Die TraII Region von pBI1063 ist in der Genorganisation der des Ti-Plasmides am ähnlichsten, die TraI Region von pBI1063 der von IncP-Plasmiden.

Die Sequenzierungen der Plasmide pBI709 und pBI1063 verdeutlichen, dass auch die

Plasmide unbekannter Inc-Gruppen aus Bodenisolaten Ähnlichkeiten zu den bekannten DNA-Transfersystemen wie z. B. den IncP-Systemen oder dem VirB-System zeigen. Aufgrund der großen Ähnlichkeit des Konjugationssystems von pBI709 zu dem von pWW0 liegt die Vermutung nahe, dass DNA-Transfersysteme von Plasmiden (gleicher Inc-Gruppen) aus Umweltisolaten näher miteinander verwandt sind als mit DNA-Transfersystemen konjugativer Plasmide aus klinischen Isolaten. Um zu überprüfen, inwieweit sich die Plasmide gleicher Inc-Gruppen aus Umweltisolaten ähneln, müsste die Diversität dieser Plasmide hinsichtlich ihres Replikationstypes bestimmt werden.

D.3.2.1 Der Bereich von pBI1063 zwischen der TraI und TraII Region enthält drei offene Leseraster mit signifikanten Homologien

Bei pBI1063 gibt es zwei Cluster von Transfergenen: die *tra*-Gene (TraI) und die *trb*-Gene (TraII). Der Bereich zwischen TraI und TraII umfasst 5092 bp (siehe Abb. 17). In diesem Bereich konnten drei offene Leseraster gefunden werden, für die signifikante Homologien gefunden wurden. Für alle möglichen offenen Leseraster in dem Bereich zwischen den Genen *traM* und *kfrA* und in dem Bereich zwischen den Genen *kfrA* und *par* konnten keine homologen Proteine entdeckt werden (siehe Abb.17).



KfrA (pBI1063):

Dieses Protein besitzt die größten Ähnlichkeiten zu den TlpA-Proteinen (371 AS) von *Salmonella enterica* und *Salmonella typhimurium* und zu KfrA (343 AS) von pADP-1 aus *Pseudomonas* sp. ADP und R751 (342 AS). KfrA (224 AS) von pBI1063 und seine homologen Proteine bestehen hauptsächlich aus α -Helices (Koski *et al.*, 1992; Jagura-Burdzy und Thomas, 1992). KfrA von R751 ist ein DNA-bindendes Protein, das als Transkriptions

repressor wirkt (Thorsted *et al.*, 1998; Macartney *et al.*, 1997). Das Gen ist in der zentralen Kontrollregion (*central control region: ctl*) dieses Plasmides lokalisiert. Außer *kfrA* gehören auch *korA*, *incC*, *korB*, *upf54.8* und *upf54.4* zu der *ctl*-Region (Macartney *et al.*, 1997; Thorsted *et al.*, 1998). Für IncC und KorB von R751 konnte gezeigt werden, dass sie Komponenten des Partitioning-Systems sind (Rosche *et al.*, 2000; Siddique und Figurski, 2002). KorA und KorB sind globale Transkriptionsrepressoren, die u. a. die Transkription von Operons des Transfers und der Replikation regulieren (Zatyka und Thomas, 1998; Zatyka *et al.*, 2001).

Par (pBI1063):

Das putative *par* Gen kodiert für ein Protein mit 157 Aminosäuren, das u. a. Homologien zu "Partitioning"-Proteinen aus *Bacillus anthracis* (283 AS) und *Pseudomonas putida* (290 AS) zeigt. Das hypothetische "Partitioning"-Protein Par von pBI1063 ist allerdings im Vergleich zu seinen homologen Proteinen N-terminal um ca. 150 Aminosäuren kürzer.

RepA (pBI1063):

Das mögliche Replikationsprotein RepA (322 AS) von pBI1063 ist homolog zu einem Replikationsinitiationsprotein (350 AS) eines nicht kultivierten Bakteriums (Acc.-Nummer CAC93881). Außerdem zeigt es Ähnlichkeiten zu einem Protein der Replikationsinitiation (462 AS) von pIPO2, einem kryptischen konjugativen *broad-host-range* Plasmid, das aus der Weizenrhizosphäre isoliert wurde (Tauch *et al.*, 2002) und zum RepA-Protein (484 AS) des konjugativen *broad-host-range* Quecksilberresistenzplasmides pSB102 (Schneiker *et al.*, 2001), wobei das RepA von pBI1063 N-terminal um ca. 160 Aminosäuren kürzer ist. In dem nicht kodierenden Bereich stromaufwärts von *repA* liegen einige *direct repeats*, die auf eine mögliche regulatorische Funktion dieser Region hindeuten könnten. Es wäre möglich, dass in dieser Region der *oriV* des Plasmides liegt.

D.3.3 Vermutliche *oriT*-Regionen der Plasmide pBI709 und pBI1063

Die Region auf einem konjugativen oder mobilisierbaren Plasmid, in der die Initiation des DNA-Transfers durch spezifische Einzelstrangspaltung erfolgt, wird als *origin of transfer*, *oriT*, bezeichnet.

Bei Plasmiden, wie z. B. RP4, pKM101, R388 liegen die *oriTs* in einem nicht kodierenden Bereich, der sich in der Nähe der *dtr*-Gene (z. B. *oriT*-bindende Proteine und Nickasen) be

findet. Die den *oriT* umgebenden Gene werden oft in divergenter Richtung transkribiert (z. B. bei R751/RP4, RSF1010). Der *oriT*-Bereich umfasst bis zu ca. 500 bp (z. B. RP4: 366 bp; R388: 402 bp) und enthält *inverted repeats* und *direct repeats*. Der AT-Gehalt der *oriT*-Region ist meist höher als in den flankierenden Bereichen.

Der *oriT* von pBI709 wird im Bereich zwischen den Genen *traA* und *traD* vermutet, auch für pWW0 wird angenommen, dass dort der *oriT* liegt (siehe Abb. 8). Der AT-Gehalt des hypothetischen *oriT*-Bereichs von pBI709 liegt mit 52.2 % über dem durchschnittlichen AT-Gehalt (42 %) der hypothetischen Transferegene. In der Region befinden sich keine offenen Leseraster und es sind einige *direct repeats* und *inverted repeats* vorhanden (Anhang V). Ein Vergleich der die *nic-sites* umgebenden Bereiche von R388, R46, R100, pED208 und dem F-Faktor hat ergeben, dass es einige konservierte Nukleotide gibt (Llosa *et al.*, 1995). Auch für pWW0 und pBI709 konnten diese konservierten Bereiche in der Nähe von *inverted repeats* gefunden werden. Bei diesen Regionen könnte es sich ebenfalls um die *nic-sites* dieser Plasmide handeln (siehe Abb. 18 A).

Für das Plasmid pBI1063 wird der *oriT* zwischen den divergent angeordneten Genen *traJ* und *traK* vermutet, diese Region (522 bp) enthält keine offenen Leseraster und ihr AT-Gehalt liegt mit 45 % über dem Durchschnitt (38.94 %) der umgebenden Transferegene. Die für die *oriT*-Regionen charakteristischen *inverted* oder *direct repeats* sind ebenfalls vorhanden (Anhang V). Die *oriT*-Sequenzen von RP4, R751, R64 und pTF-FC2 besitzen einige konservierte Nukleotide (Llosa *et al.*, 1995), die auch bei pBI1063 in der hypothetischen *oriT*-Region vorhanden sind (siehe Abb. 18 B).

A		B	
F	TTGCGTGGGGTGT /GGTGCT	RP4	TTCACCT ATCCTG /CCCGGC
R100	TTGCGTAGTGTGT GGTGCT	R751	TTCACAC ATCCTG /CCCGCC
pED208	TTGCGACGGGTGT GGGACT	R64	ATTGCAC ATCCTG /TCCCCT
R46	CTGCGTTAGGTGT ATAGCA	pTF-FC2	AACGGTC ATCCTG TATTGC
R388	GTGCGTATTGTCT /ATAGCC	pBI1063	ATCACAC ATCTTG TCATCT
pWW0	GTGCGTGTGTGT ATTGAT		
pBI709	GTGCGTGTGTGT ATTGAT		

Abb.18. Alignment der die *nic-sites* umgebenden Sequenzregionen verschiedener Plasmide. Die stark konservierten Bereiche sind fettgedruckt. Wenn die genaue Position der Strangspaltung bekannt ist, wird dies durch einen Schrägstrich (/) gekennzeichnet (Llosa *et al.*, 1995).

D.3.4 Beispiele für die Genfracht der Plasmide pBI709 und pBI1063

Bei der Sequenzierung der Hybridplasmide wurden auch Bereiche gefunden, deren abgeleitete Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeiten zu Transferproteinen aufwies. Da das Interesse

dieser Arbeit hauptsächlich den Transfergenen galt, wurden aus Zeit- und Kostengründen diese Restriktionsfragmente nicht weiter sequenziert. Diese Sequenzdaten sind im Schnitt ca. 600 bp lang. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen von pBI1063 sind in Tab. 17 und die DNA-Sequenzen und abgeleiteten Proteine sind im Anhang IV aufgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen von pBI709 sind in Tab. 18 und die DNA-Sequenzen im Anhang III dargestellt.

D.3.4.1 Proteine von pBI1063

Methylase (pBI1063):

Die putative Methylase von pBI1063 ähnelt 5-Methylcytosin-Methylasen (die DNA- und die Proteinsequenzen sind im Anhang IV auf Seite 51 dargestellt). Methylasen dieses Types sind Komponenten des Typ-II-Restriktions-Modifikations-Systems in Prokaryoten und einigen Bakteriophagen. Diese Enzyme erkennen spezifische DNA-Sequenzen und methylieren das C-5 von Cytosinen. Durch diese Methylierung sind DNA-Bereiche vor der Spaltung durch Typ-II-Restriktionsenzyme geschützt, die die gleiche DNA-Sequenz erkennen. C-5 Methylasen zeigen zehn konservierte Motive, von denen die Motive I, IV, VI, VIII, IX und X stark konserviert sind (Kumar *et al.*, 1994). Die mögliche Methylase von pBI1063 zeigt ebenfalls diese konservierten Motive: I. ¹¹**DLFAGLGG**¹⁹, IV. ⁷⁶**PACQGHSRARG**⁸⁶, VI ¹¹¹**PEAGLVENV**¹¹⁹, VIII. ¹⁴⁹**AADFGVPQHRKR**¹⁶⁰, IX. ²⁶⁰**RMLSVAEGRSAMGFP**²⁷⁴ und X. ²⁹¹**GNAVCPV**²⁹⁸. Die Methylase von pBI1063 könnte Teil eines Restriktions-Modifikations-Systems sein. Ein dazu gehöriges Restriktionsenzym konnte auf keinem der bisher sequenzierten Plasmidfragmente entdeckt werden, was daran liegen könnte, dass Typ II Endonukleasen nur schwache Übereinstimmungen zeigen (Bickle und Krüger, 1993).

PilC und PilB:

Ca. 7 kb stromabwärts von *trbI* liegen zwei offene Leseraster, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Übereinstimmungen zu PilC- bzw. PilB-homologen Proteinen zeigen (die Sequenzdaten sind im Anhang IV auf Seite 52 gezeigt). PilC (352 AS) von pBI1063 zeigt die größten Ähnlichkeiten zu PilC (406 AS) von *Pseudomonas aeruginosa*. Es besitzt vier mögliche Transmembrandomänen und scheint, da es keine Signalsequenz besitzt, ein polytopisches Protein der inneren Membran zu sein. Zusammen mit PilB (461 AS) ist PilC bei *Pseudomonas aeruginosa* am Zusammenbau der Typ IV-Fimbrien beteiligt (Nunn *et al.*, 1990; Hobbs und Mattick, 1993). Die PilB-ähnlichen Proteine sind im Cytoplasma lokalisiert

Tab. 18. Sequenzanalyse von pBI709.

Hybrid-plasmid	sequenzierter Bereich (bp)	abgeleitete Proteinsequenz (AS)	Proteindomänen	homologe Proteine (Identität/Ähnlichkeit in %) (Acc.-Nummer)
pS18+pE10	2888	TniB (242) TniQ (405) TniR (204) TniM (94)	Resolvasedomäne	TniB R751 (96/97) (NP_044263.1) TniQ <i>Pseudomonas</i> sp. ED23-33 (97/97) (CAC14709) TniR <i>Pseudomonas</i> sp. ED23-33 (97/98) (CAC14708) TniM <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (83/87) (CAA77326)
pS13	uni 642 rev 596	MerA (171) MerD (63) MerE (79) ORF1 (58)	PYR-Redox 2 Transmembrandomänen	MerA <i>Pseudomonas</i> sp. (94/96) (CAA6745) MerD <i>Pseudomonas</i> sp. (76/83) (CAA67453) MerE <i>Xanthomonas campestris</i> (70/78) (CAB65708) hyp. Protein <i>Xanthomonas campestris</i> (88/95) (CAB65709)
pS23	643	MerB (59) MerD 2 (148)		MerB2 <i>Pseudomonas</i> sp. K-62 (100/100) (BAA36432) MerD <i>Pseudomonas</i> sp ED23-33 (100/100) (CAC14705)
pE10B1	uni 459 rev 430	ORF2 (95) ORF3 (46) ORF4 (142)		hyp. Protein <i>Pseudomonas</i> sp. TW3 (96/99) (AAF23986) hyp. Transmembranprotein pWW0 (85/92) (NP_542901) hyp. Protein pWW0 (91/95) (NP_542819)
pH3r	825	ORF5 (41) ORF6 (82)		hyp. Protein pWW0 (52/74) (NP_542902.1) hyp. Protein pWW0 (47/55) (NP_542907.1)
pP31	1055	ORF7 (35) ORF8 (105) TniA (100)		hyp. Protein <i>Pseudomonas putida</i> (70/78) (NP_542820) hyp. Protein <i>Pseudomonas putida</i> (52/72) (NP_542821) TniA <i>Xanthomonas</i> sp. (90/91) (S70152)
pP28 pH3-6	+ 1513	ORF9 (267) ORF10 (69)		hyp. Protein pWW0 (75/86) (NP_542909) hyp. Protein pWW0 (55/66) (NP_542910)
pP36	1342	Rep (181) Res (26)		Replikationsprotein <i>Pseudomonas putida</i> (68/77) (NP_542798) put. Res pM3 (78/93) (AF078924)
pH6-9	586			nicht signifikant
pPN31	475	ORF11 (157)		hyp. Protein <i>Pseudomonas</i> sp. TW3 (92/95) (AAF23987)

und besitzen konservierte ATP-Bindemotive und zwei Aspartatboxen (Hobbs und Mattick, 1993; Possot und Pugsley, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den Walker A Boxen bei PilB und XcpR von *P. aeruginosa* und PulE von *Klebsiella oxytoca* dazu führen, dass es zu keiner Proteinsekretion bzw. zu keinem Piluszusammenbau kommt (Nunn *et al.*, 1993; Possot und Pugsley, 1994). Das hypothetische PilB (481 AS) von pBI1063 besitzt eine Walker A Box ²¹⁵GPMNSGKS²²² und zwei Aspartat-Boxen: ²⁴⁴SVEDPVE²⁵⁰ und ²⁸⁸RHDVNVFWIGEVRD³⁰¹. Das konservierte Motiv der Walker B Box konnte bei PilB von pBI1063 nicht ermittelt werden. PilB- und PilC-homologe Proteine wurden in verschiedenen Import-/Export-Systemen wie z. B. bei Proteinsekretionssystemen von *Pseudomonas aeruginosa* (XcpR und XcpS), von *Klebsiella oxytoca* (PulE und PulF) und von *Xanthomonas campestris* (XpsE und XpsF), bei dem Assembly-Komplex der Typ IV Fimbrien von *Vibrio cholerae* (TcpT und TcpE) und *P. aeruginosa* (PilB und PilC) und auch bei DNA-Transfer-systemen z. B. von *Bacillus subtilis* (ComG-1 und ComG-2) gefunden (Hobbs und Mattick, 1993). PilB und PilC von pBI1063 könnten, wie ihre homologen Proteine, Komponenten verwandter Import- oder Exportsysteme sein. Welches Substrat allerdings von diesem System transportiert werden könnte, lässt sich anhand der vorliegenden Sequenzdaten nicht ermitteln.

D.3.4.2 Resistenz-, Transpositions-, Replikations- und Partitioninggene von pBI709

D.3.4.2.1 Das Plasmid pBI709 trägt Quecksilberresistenzgene

Das Vorhandensein eines *merA*-Gens auf dem Plasmid haben die PCR mit *merA*-Primern und die Hybridisierung mit einer *merA*-Sonde gezeigt (siehe Abschnitt D.2.3.2 und D.2.2.1). Auch die Sequenzierung zeigten ein offenes Leseraster das Ähnlichkeiten zu *merA*-Genen besitzt. Außer diesem Quecksilberresistenzgen wurden auch *merB*-, *merE*- und zwei *merD*-Gene auf dem Plasmid pBI709 gefunden. Die Anordnung der *mer*-Gene ist im Anhang III (Seite 26) dargestellt. Dem Gen für die Quecksilberreduktase MerA folgen die Gene *merD*, das für ein regulatorisches Protein kodiert und *merE*, über dessen Funktion noch nichts bekannt ist. Ein zweites *merD* wurde auf einem anderen *SphI*-Fragment von pBI709 zusammen mit dem Gen für die Quecksilberlyase MerB gefunden. Quecksilberresistenzoperons, die ein *merB* enthalten, werden auch als "broad spectrum" *mer*-Operons bezeichnet, da sie sowohl Resistenz gegen anorganisches als auch organisches Quecksilber vermitteln. MerB spaltet die organischen Quecksilberverbindungen, wobei ein organischer Teil und ein Quecksilberion entstehen. Letzteres wird dann sofort von MerA reduziert.

D.3.4.2.2 Transpositionsgene

Auf dem Plasmid pBI709 wurden fünf putative Transpositionsgene gefunden (Anhang III, Seite 28), die Ähnlichkeiten zu den Transpositionsgenen *tniA*, *tniB*, *tniQ*, *tniR* und *tniM* zeigen. TniA von pBI709 ist am ähnlichsten der Transposase von Tn5053 und enthält das konservierte D,D (35)E Motiv (Kholodii *et al.*, 1995).

TniB von pBI709 besitzt zwei Sequenzmotive $^8\text{GPTNNGKS}^{15}$ und $^{88}\text{LLVIDE}^{93}$, die an der Bindung und Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten beteiligt sein könnten (Rådström *et al.*, 1994; Kholodii *et al.*, 1995). TniQ (pBI709) umfasst 405 Aminosäuren und ist zu 97 % identisch zu TniQ von Tn5058, einem Quecksilberresistenztransposon (Acc.-Nummer Y17897). Für Tn5053 konnte gezeigt werden, dass *tniA*, *tniB* und *tniQ* essentielle Transpositionsgene sind. Über die genaue Funktion des TniQ ist noch nichts bekannt (Kholodii *et al.*, 1995). TniR von pBI709 zeigt die größten Ähnlichkeiten zu dem TniR von Tn5058 (97/98 %) und hat ein für die Familie der Resolvasen/Integrasen typisches Sequenzmotiv (Aminosäuren 1-143). Die Transposition von Tn5053 verläuft über eine Kointegratbildung, die Auflösung des Kointegrates erfolgt durch TniR (Kholodii *et al.*, 1995). Die Transkription von *tniM* erfolgt divergent zu *tniR*, *tniQ* und *tniB*. Diese Genanordnung findet sich auch im Transposon Tn5058. TniM (pBI709) ist Orf2 eines Transposons von *Pseudomonas aeruginosa* am ähnlichsten.

D.3.4.2.3 Die mögliche Replikationsregion von pBI709

Das Plasmid pBI709 besitzt ein mögliches Replikationsprotein Rep, das Ähnlichkeiten zu dem putativen Rep-Protein des *Pseudomonas putida* Plasmides pWW0 zeigt. Es ist 181 Aminosäuren lang und zeigt ein schwach konserviertes *gntR*-Motiv, das charakteristisch für einige bakterielle Regulator-Proteine ist. Wie bei den IncP-9 Plasmiden pWW0 und pM3 liegt bei pBI709 stromaufwärts vom möglichen *rep*-Gen das hypothetische *res*-Gen, von dessen Sequenz nur 79 Nukleotide bestimmt wurden. Die bekannte Proteinsequenz (26 AS) von Res (pBI709) zeigt die höchsten Ähnlichkeiten zu dem Res-Protein (Resolvase) von pM3. Das hypothetische Res von pM3 ist homolog zu ParA von RK2. ParA ist eine Resolvase, die zusammen mit ParB (Nuklease) und ParC (Funktion nicht bekannt) eine Rolle in der Plasmid-maintenance spielen (Sobeckey *et al.*, 1996; Easter *et al.*, 1998). Eine Beteiligung dieser möglichen Resolvase von pM3 in der Auflösung von Plasmidmultimeren konnte allerdings nicht gezeigt werden (Greated *et al.*, 2000).

In dem Bereich zwischen *rep* und *res* werden für pWW0 und pM3 der *oriV* vermutet. Dieser Sequenzbereich von pWW0 zeigt mit dem entsprechenden Bereich von pBI709 56 %

Sequenzübereinstimmung. Bei pBI709 gibt es in der möglichen *oriV*-Region *direct repeats*, die auf eine regulatorische Funktion hindeuten könnten (siehe Anhang III, Seite 33). Die Nukleotidfolge TGA(G/T)CTAC kommt in dem vermutlichen *oriV*-Bereich achtmal vor, davon zweimal auf dem Gegenstrang. Auch in der *oriV*-Region von pWW0 kommt die Sequenz TGAGCTA mehrfach vor.

D.3.4.2.4 "Partitioning"-Region von pBI709

Stromaufwärts von der möglichen Transferregion liegen bei pBI709 die zwei Gene *parA* und *parB* (Abb. 8), deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologien zu "Partitioning"-Proteinen zeigen. Die besten Übereinstimmungen gibt es zu den Proteinen ParA und ParB von pWW0. Bei plasmidkodierten *par*-Genen sind drei Komponenten für die Plasmid-Segregation bei der Zellteilung involviert. Eine in *cis* wirkende Centromer-ähnliche Region und zwei in *trans* wirkende Proteine, die Nukleoproteinkomplexe bilden (Gerdes *et al.*, 2000).

Das *parA* von pBI709 besitzt drei mögliche "*in frame*"-Translationsstarts (siehe Tab. 16). Ein möglicher Translationsstart (²¹⁷⁷GTG²¹⁷⁹) führt zu einem Protein mit der Anzahl an Aminosäuren (373 AS) entsprechend dem homologen ParA von pWW0. Allerdings sind die N-terminalen 90 Aminosäuren nicht homolog. Ein anderer möglicher Translationsstart (¹⁸²³ATG¹⁸²⁵) führt zu einem Translationsprodukt, das in der Größe mit IncC2 von R751 aus *Enterobacter aerogenes* übereinstimmt (255 AS) und 35 % identische und 54 % ähnliche Aminosäuren zu IncC2 besitzt. Das *incC* von IncP-Plasmiden besitzt zwei Translationsstarts und führt zu zwei Polypeptiden (IncC und IncC2) unterschiedlicher Größe. Zusammen mit KorB spielt IncC eine Rolle bei dem "Partitioning"-Prozess des Plasmides RK2 (Williams *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass für diesen Prozess IncC2 ausreichend ist (Rosche *et al.*, 2000; Siddique und Figurski, 2002). IncC bzw. IncC2 (RK2) besitzen ATP-Binde-domänen, die bei allen ParA-homologen Proteinen vorkommen (Motallebi-Veshareh *et al.*, 1990). Für das putative ParA (373 AS) von pBI709 konnten drei mögliche ATP-Binde-domänen gefunden werden: Motiv A: ¹²⁸**KGGVGKT**¹³⁴, Motiv A' ¹⁴⁸**GKRVLVVDLD**¹⁵⁷ und Motiv B ²⁰⁵**DVPLLD**²¹⁰ (ATP-Bindedomänen nach Koonin, 1993). Bei den ParB-homologen Proteinen handelt es sich um DNA-bindende Proteine, die an der Centromer-ähnlichen Region binden. Für IncC und KorB von RK2 konnte gezeigt werden, dass sie physikalisch miteinander interagieren (Rosche *et al.*, 2000).

Tab. 19. Sequenzanalyse von pKI173.

Hybrid-plasmid	sequenzierter Bereich (bp)	abgeleitete Proteinsequenz (AS)	Proteindomänen, Eigenschaften	homologe Proteine (Identität/Ähnlichkeit in %) (Acc.-Nummer)
p173H2	1101	ParA (61) ParB (342)	ParB-Domäne	ParA <i>P. fluorescens</i> (56/84) (CAB60148) ParB <i>P. fluorescens</i> (41/58) (CAB60149)
p173H4	uni 723 rev 667	Rtr (296) ORF1 (61) ORF2 (155)		reverse Transkriptase <i>E. coli</i> (65/75) (NP_052642.1) unbek. Protein <i>P. syringae</i> (88/91) (NP_114204) kons. hyp. Protein <i>Deinococcus radiodurans</i> (34/50) (A75452)
p173H5	860	MobD (202) MobE (86)		MobD pTF-FC2 (69/81) (P22900) MobE pTF-FC2 (52/74) (P22901)
p173H7	534	KorA (59)		KorA <i>Burkholderia</i> sp. (51/56) (AAD04859.1)
p173H8	uni 701 rev 648	Adox (200) siehe p173H4 uni		Anthranilat Dioxygenase <i>P. aeruginosa</i> (48/69) (G833331) reverse Transkriptase <i>E. coli</i> (65/75) (NP_052642.1)
p173H9	uni 694 rev 528	Bdox (230) XylB (237)	NAD-Bindemotiv	Benzoat Dioxygenase (56/68) (AF279141) XylB <i>P. putida</i> (81/86) (AAA26024)
p173H13	715	Atp (95)		ATP-Bindeprotein Collb-P9 (41/62) (NP_052526)
p173H16	uni 649 rev 670	Lak (83) ORF3 (210)		Laktat Dehydrogenase <i>Mesorhizobium loti</i> (49/65) (NP_103064) ChrR <i>Mesorhizobium loti</i> (39/61) (NP_107458)
p173H19	601	Tnp1 (176)		put. Transposase <i>Azotobacter</i> sp. (33/47) (AF322366)
p173H28	uni 671 rev 1088	PyrD (195) RulB (206) siehe p173H2		Pyruvat Dehydrogenase <i>Zymomonas mobilis</i> (26/43) (T33723) RulB <i>P. syringae</i> (49/64) (AAC44639) ParB <i>P. fluorescens</i> (41/58) (CAB60149)
p173H29	uni 533 rev 613	Inv (169) TraC (204)		Invasionsportein <i>Shigella flexneri</i> (32/44) (NP_085309) TraC2 R751 (25/40) (NP_044265.1)
p173H33	uni 746 rev 328	XylN (402) siehe p173H9 rev		XylN <i>P. putida</i> (80/88) (BAA09665) XylB <i>P. putida</i> (81/86) (AAA26024)
p173H37	uni 671 rev 629	Tnp2 (73) siehe p173H33 uni		Transposase <i>P. putida</i> (90/95) (BAB59051) XylN <i>P. putida</i> (80/88) (BAA09665)
p173H39	773	TraE (257)	Topoisomerase	TraE R751 (37/61) (NP_044269)
p173H45	1575	TraN (35) TraO (444)	Glycin-reiche Region	TraN R64 (53/74) (BAA75158) TraO R64 (23/41) (BAA78003)

Des Weiteren wurden einige offene Leseraster gefunden, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologien zu hypothetischen Proteinen verschiedener Bakterien zeigen (siehe Tab. 18). Über die Funktion dieser möglichen Proteine gibt es keine Informationen.

D.3.5 Partielle Sequenzierung des Plasmides pKI173

Das konjugative Plasmid pKI173 hat eine Größe ca. 105 kb. Der Wirtstamm (Ki173) dieses Plasmides konnte in die ARDRA-Gruppe 19 (siehe Tab. 3) eingruppiert werden, zu der Bodenisolat der Gattung *Pseudomonas* sp. gehören. Die 16S-rDNA-Sequenzanalyse des Bodenisolates Ki173 ergab 100 % Übereinstimmung mit der 16S-rDNA eines bisher nicht näher klassifizierten Bakteriums (Acc.-Nummer AF078418), das zu der Gattung *Pseudomonas* gehört.

Von ca. 23 *Hind*III-Restriktionsfragmenten von pKI173 wurden 15-Fragmente kloniert und die Hybridplasmide von beiden Seiten mit dem M13 *universal* und *reverse* Primern ansequenziert. Insgesamt wurden 16.7 kb sequenziert, die Sequenzen sind im Anhang VI aufgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzauswertung sind in Tab. 19 dargestellt. Die Abbildungen im Anhang VI zeigen die Genanordnung auf den Restriktionsfragmenten und die relative Lage der Fragmente zueinander.

Insgesamt konnten sechs mögliche Transfergene identifiziert werden.

MobD (202 AS) und MobE (86 AS):

Diese hypothetischen Proteine zeigen Ähnlichkeiten zu den Mobilisierungsproteinen MobD (227 AS) bzw. MobE (213 AS) von pTF-FC2 aus *Thiobacillus ferrooxidans*. Bei MobD von pTF-FC2 handelt es sich um ein essentielles Mobilisierungsprotein, während MobE nicht essentiell ist und nur die Mobilisierungsfrequenzen beeinflusst (Rohrer und Rawlings, 1992). MobD von pTF-FC2 besitzt wie sein homologes Protein TraL von RP4 im N-Terminus eine ATP-Bindedomäne. Da der N-terminale Teil des hypothetischen MobD-Proteins von pKI173 nicht im sequenzierten Bereich liegt, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich auch bei MobD (pKI173) um ein Protein mit einer Nukleotidbindedomäne handelt.

TraN (35 AS) und TraO (444 AS):

Diese hypothetischen Proteine sind homolog zu den entsprechenden Transferproteinen von R64. TraN (327 AS) von R64 ist ein essentielles Transferprotein, das eine Signalsequenz besitzt und vermutlich in der äußeren Membran lokalisiert ist (Komano *et al.*, 2000). Von dem

putativen TraN pKI173 konnten nur die letzten C-terminalen 35 Aminosäuren ermittelt werden. Es ist nicht bekannt, ob auch der restliche Teil des Proteins zu TraN R64 homolog ist. Für TraO (429 AS) von R64 wird vermutet, dass es ein Protein der inneren Membran ist, dessen Funktion noch unbekannt ist (Komano *et al.*, 2000)

TraE (257 AS):

Das hypothetische TraE von pKI173 ist homolog zu den Aminosäuren 436 –609 von TraE (R751, 687 AS). Anfang und Ende des hypothetischen *traE* (pKI173) wurden nicht sequenziert. TraE von R751/RP4 ist ein nicht essentielles Transferprotein, das eine Topoisomerase-Aktivität besitzt (Li *et al.*, 1997; Thorsted *et al.*, 1998). Das hypothetische TraE besitzt eine Topoisomerase-Domäne und könnte ebenfalls an der Auflösung von Replikationsintermediaten bei dem konjugativen DNA-Transfer beteiligt sein.

TraC (204 AS):

Von dem hypothetischen *traC* konnten nur 600 bp sequenziert werden, die abgeleitete Aminosäuresequenz ist homolog zur Primase TraC von R751. Ob TraC von pKI173 ebenfalls das konservierte EGYATA Motiv der Primasen (Strack *et al.*, 1992) besitzt, konnte mit den bisherigen Sequenzdaten nicht ermittelt werden.

Die ermittelten Daten zu den Transfergenen von pKI173 reichen nicht aus, um die Organisation dieser Transferregion zu ermitteln. Die Verwandtschaft dieses Transfersystems zu anderen Systemen kann aufgrund von nur fünf partiell sequenzierten Genen nicht eindeutig bestimmt werden.

Außer den möglichen Transfergenen konnten auf dem Plasmid pKI173 Gene des Aromatenabbaus/Stoffwechsels gefunden werden. Die Lage dieser Gene ist im Anhang VI dargestellt. Das Genprodukt des *xyIN*-Gens zeigt Proteinsequenzmotive von Proteinen der äußeren Membran, die im Toluol-Katabolismus involviert sind, deren Funktion aber noch nicht ermittelt werden konnte. Stromaufwärts des *xyIN*-Gens befindet sich das Gen *xyIB*, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz homolog zu der Benzyl-Alkoholdehydrogenase XylB ist, eine NAD-Bindestelle besitzt und das für die Familie der Alkoholdehydrogenasen charakteristische Adh-Zink-Motiv zeigt. XylB ist ebenfalls ein Enzym des Toluol-Katabolismus. Ca. 4 kb stromabwärts vom *xyIN*-Gen liegt eine putative Transposase, was ein Hinweis darauf sein könnte,

dass die degradativen Gene auf einem Transposon lokalisiert sind. Etwa 7 kb stromaufwärts des *xykB*-Gens liegt ein Gen, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Homologien zu Dehydrogenasen zeigt. Das hypothetische Protein zeigt die größten Ähnlichkeiten zu Benzoat- und Anthranilat-Dehydrogenasen. Zusätzlich wurden zwei weitere putative Dehydrogenasen (Lak und PyrD) entdeckt, deren Substrate nicht festgelegt werden können.

Das Plasmid pKI173 trägt ein Gen, dessen Genprodukt homolog zu reversen Transkriptasen ist. Diese Transkriptasen wurden auch auf anderen Plasmiden gefunden, z. B. auf dem *E. coli* Virulenzplasmid pO157 (Burland *et al.*, 1998) und dem *Shigella* Virulenzplasmid pWR501 (Venkatesan *et al.*, 2001). Die mögliche reverse Transkriptase von pKI173 könnte Bestandteil eines Introns der Gruppe II sein. Diese Introns sind selbstsplicende RNAs. Einige von ihnen sind mobile genetische Elemente, die Gene enthalten, die für Proteine kodieren, die Ähnlichkeiten zu reversen Transkriptasen und Maturasen zeigen (Martínez-Abarca *et al.*, 1998). Diese Proteine besitzen drei Aktivitäten: eine reverse Transkriptaseaktivität zur Duplikation des Introns, eine Maturaseaktivität zum Splicen und eine DNA-Endonukleaseaktivität (Matsuura *et al.*, 2001). Introns der Gruppe II wurden u. a. in *E. coli*, Agrobakterien, Rhizobien und Pseudomonaden detektiert (Yeo *et al.*, 1997). Da diese Introns zusammen mit mobilen Elementen wie z. B. Insertionssequenzen, konjugativen Transposons oder Transfergenen gefunden wurden, wird vermutet, dass diese mobilen Elemente zur Verbreitung der Introns beitragen (Martínez-Abarca *et al.*, 1998).

Viele Plasmide besitzen Gene, die ihren Wirten eine erhöhte Überlebensfähigkeit nach UV-Bestrahlung verleihen. Auf dem Plasmid pKI173 konnte ein Gen lokalisiert werden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz homolog zu RulB von *Pseudomonas syringae* ist. Zusammen mit RulA ist RulB an der mutagenen DNA-Reparatur (MDR) beteiligt. *Pseudomonas syringae* Stämme, die das *rulAB* (*resistance to ultraviolet light*) Operon enthalten, überleben höhere UV-B Dosen (Kim und Sundin, 2000). Die Gene *rulA* und *rulB* von *Pseudomonas syringae* sind u. a. homolog zu *umuDC* von *E. coli* (Sundin *et al.*, 1996).

Von der "Partitioning"-Region des pKI173 konnten das hypothetische *parA* und *parB* sequenziert werden. Beide Par-Proteine von pKI173 haben die größte Ähnlichkeit zu den Par-Proteinen von *Pseudomonas fluorescens*. ParB pKI173 zeigt auch die für die ParB-Proteinfamilie typische ParB-Domäne.

In weiteren partiellen Sequenzierungen wurde die Nukleotidsequenz von Restriktionsfragmenten des konjugativen Plasmides pKI202 und der Plasmide pKI239 und pBI113, für die bisher kein Gentransferpotential gezeigt werden konnte, bestimmt. Die Ergebnisse der

Datenbankabfragen sind im Anhang VII zusammengefasst.

D.3.6 Partielle Sequenzierung des Plasmides pKI239

Das Plasmid pKI239 hat eine Größe von 42 kb und sein Wirtstamm gehört zu der Gattung *Pseudomonas* (siehe Tab. 3). Neun *EcoRI*-Hybridplasmide von pKI239 wurden von beiden Seiten ansequenziert. Insgesamt konnten 8,8 kb des Plasmides pKI239 sequenziert werden.

In dem ansequenzierten Bereich des Plasmides pKI239 konnten keine Transferegene identifiziert werden. Einige der abgeleiteten Leseraster zeigten zu Proteinen der Datenbanken keine signifikanten Homologien. Das Plasmid pKI239 kodiert für viele hypothetische Proteine, die Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen von *Xylella fastidiosa* haben. Die Sequenzbewertungen dieses Plasmides sind im Anhang VII (Seite 72) zusammengefasst.

D.3.7 Partielle Sequenzierung des Plasmides pBI113

Das Plasmid pBI113 (48 kb) wurde aus einem Bodenisolat der Gattung *Pseudomonas* isoliert. Das Plasmid wurde mit *EcoRI* hydrolysiert und mit pUC13 ligiert. Acht dieser Hybridplasmide wurden von beiden Seiten sequenziert, insgesamt konnten so 7.1 kb sequenziert werden. Die Sequenzen sind im Anhang VII dargestellt.

Auch auf diesem Plasmid konnten keine Gene detektiert werden, die an einem möglichen DNA-Transfer beteiligt sein könnten. Die Sequenzbewertungen sind im Anhang VII (Seite 72) dargestellt.

D.3.8 Partielle Sequenzierung des Plasmides pKI202

Von dem 130 kb großen Plasmid pKI202 aus *Pseudomonas* wurden fünf *HindIII*- und vier *EcoRI*-Restriktionsfragmente kloniert, und die Enden jeweils mit dem M13 *universal* und *reverse* Primern ansequenziert. Insgesamt konnte so eine Sequenz von 9.3 kb ermittelt werden. Für die meisten Fragmente konnte weder auf Protein- noch auf DNA-Ebene eine signifikante Homologie gefunden werden (siehe Anhang VII, Seite 73). Die Sequenzen von pKI202 sind im Anhang VII aufgeführt.

Nur für ein offenes Leseraster zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz eine Homologie zu einem Protein, das am DNA-Transport beteiligt ist. Das TraF-Protein (211 AS) von pKI202 zeigt Ähnlichkeit zu Pilusassembly- und Synthese-Proteinen von *Vibrio cholerae* (325 AS), *Providencia rettgeri* (314 AS), zu dem Plasmid pNL1 aus *Novosphingobium aromaticivorum* (270 AS) und zu TraF vom F Faktor (247 AS). TraF vom F Faktor ist ein essentielles Trans

ferprotein, das im Periplasma lokalisiert ist (Wu *et al.*, 1988).

D.3.9 Partielle Sequenzierung des Plasmides pOL1820

Das Plasmid pOL1820 ist ein ca. 20 kb großes Plasmid aus dem zu der Gattung *Paracoccus* gehörenden Bodenisolat O118. Auffallend war, dass alle in Tab. 3 aufgeführten Paracoccen neben weiteren Plasmiden entweder ein 20 kb Plasmid oder ein 14 kb Plasmid besitzen. Die Restriktionsmuster dieser Plasmide zeigen, dass die Plasmide ähnlich aber nicht identisch sind (Daten nicht gezeigt).

Interessant war, ob diese Plasmide eventuell essentielle Gene besitzen oder konjugativ bzw. mobilisierbar sind und deshalb in allen Paracoccen unserer Bodenprobe vorkommen.

Das Bodenisolat O118 enthält im Gegensatz zu den meisten anderen Paracoccen nur zwei Plasmide, ein 120 kb Plasmid und das 20 kb Plasmid pOL1820. Dieses erleichtert die Isolierung des 20 kb Plasmides und verringert die Verunreinigung der pOL1820-DNA durch andere kleinere Plasmide. Von pOL1820 wurden einige *Hind*III- und *Eco*RI-Restriktionsfragmente mit den M13 *universal* und *reverse* Primern ansequenziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 20 zusammengefasst, die Lage der einzelnen Gene und Hybridplasmide ist in Abb. 19 skizziert, und die Sequenzen sind im Anhang VIII aufgeführt.

Tabelle 20. Hypothetische Proteine und rRNA-Gene des Plasmides pOL1820.

Protein/rDNA von pOL1820	Übereinstimmung (Identität/Ähnlichkeit in %)
RepA (179 AS)	RepA aus <i>Francisella tularensis</i> (25/42)
ParA (247 AS)	RepA von pNL1 aus <i>Novosphingomonas aromaticivorans</i> (46/66)
ParB (344AS)	RepB von pNL1 aus <i>Novosphingomonas aromaticivorans</i> (38/60)
16S-rDNA	16S-rDNA <i>Paracoccus aminophilus</i> SMK735 (96)
t-RNA-Ile	t-RNA-Ile (100)
t-RNA-Ala	t-RNA-Ala (96)
23S-rDNA	23S-rDNA <i>Paracoccus denitrificans</i> (94)
KpsT (171 AS)	put. Polysaccharidexport-Protein <i>Sinorhizobium meliloti</i> (45/58)
KpsE (369 AS)	put. Polysaccharidexport-Protein <i>S. meliloti</i> (31/50)
Per (258 AS)	Polysaccharidexport Transport Permease <i>S. meliloti</i> (41/60)
Gly (148 AS)	Glykosyltransferase <i>Salmonella typhimurium</i> (43/62)

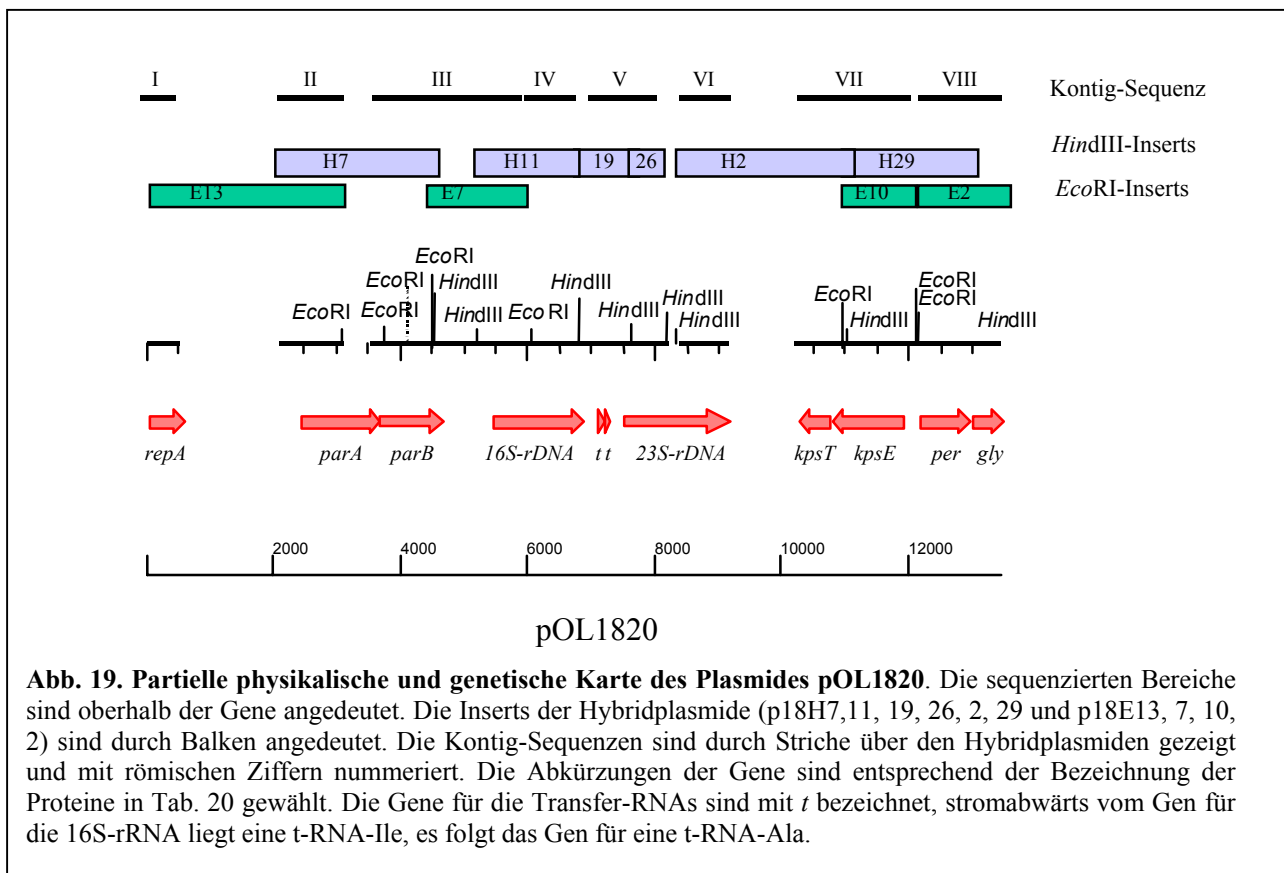


Abb. 19. Partielle physikalische und genetische Karte des Plasmides pOL1820. Die sequenzierten Bereiche sind oberhalb der Gene angedeutet. Die Inserts der Hybridplasmide (p18H7,11, 19, 26, 2, 29 und p18E13, 7, 10, 2) sind durch Balken angedeutet. Die Kontig-Sequenzen sind durch Striche über den Hybridplasmiden gezeigt und mit römischen Ziffern nummeriert. Die Abkürzungen der Gene sind entsprechend der Bezeichnung der Proteine in Tab. 20 gewählt. Die Gene für die Transfer-RNAs sind mit *t* bezeichnet, stromabwärts vom Gen für die 16S-rRNA liegt eine t-RNA-Ile, es folgt das Gen für eine t-RNA-Ala.

Auf dem Plasmid pOL1820 konnte ein Gen detektiert werden, das wahrscheinlich zur Replikationsregion des Plasmides gehört. Das RepA von pOL1820 ist homolog zu dem Replikationsprotein RepA aus *Francisella tularensis*. Stromabwärts von dem *repA*-Gen befinden sich zwei putative Gene, deren Genprodukte homolog zu "Partitioning"-Proteinen sind. ParA (pOL1820) zeigt Ähnlichkeiten zu dem RepA von pNL1 aus *Novosphingomonas aromaticivorans* und besitzt wie alle Mitglieder der ParA-Familie zwei ATP-Bindedomänen: Motiv A¹⁵⁴**KGGVGKS**¹⁶⁰ und Motiv A'¹⁷⁴**GYRVCVIECD**¹⁸³ (Koonin, 1993; Gerdes *et al.*, 2000).

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *parB* stimmt am besten mit einem SopB-ähnlichen Replikationsprotein von pNL1 überein. Das ParB-Protein von pOL1820 zeigt die charakteristische ParB-Domäne der ParB-Familie (Daten nicht gezeigt).

Vier hypothetische Proteine von pOL1820 zeigen Homologien zu Proteinen des Polysaccharidexports. Die putative Glykosyltransferase von pOL1820 ist homolog zu einer Glykosyltransferase von *Salmonella typhimurium* LT2. Die hypothetische Permease von pOL1820 besitzt wie seine homologen Proteine sechs Transmembrandomänen und das

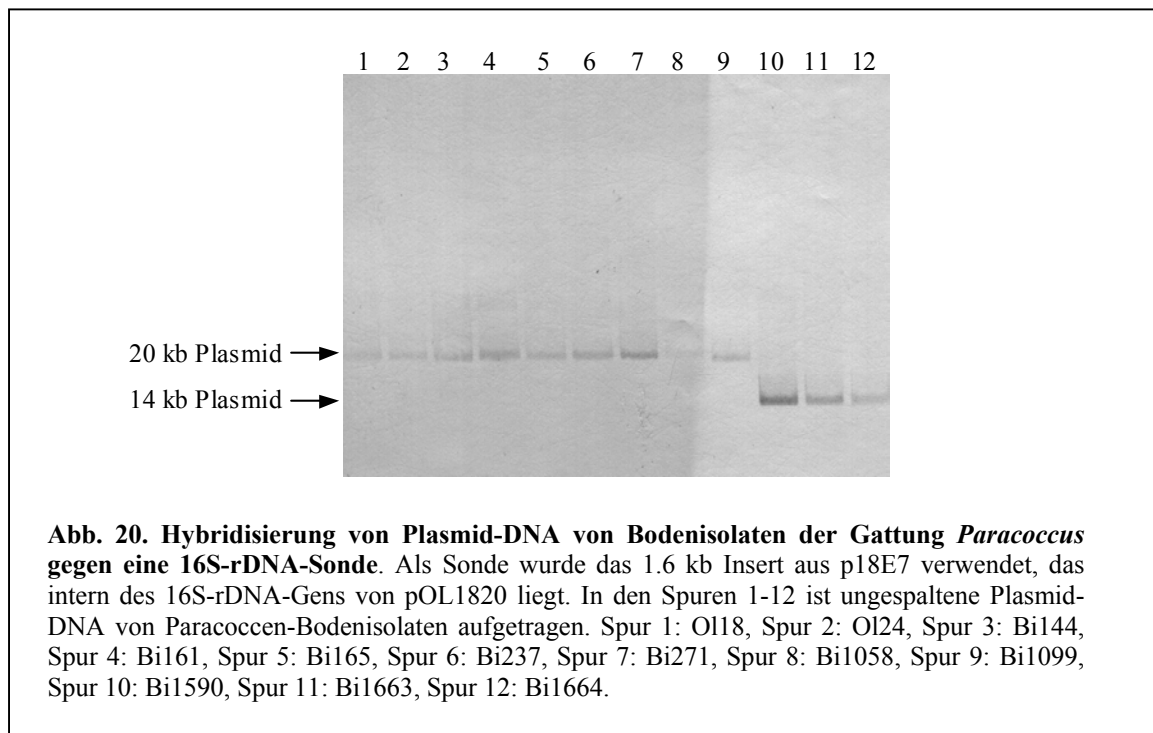
Proteinmotiv von integralen Membrankomponenten der ABC2-Transporter. Die Permease von pOL1820 weist große Ähnlichkeiten zu einer Polysaccharid-Permease eines ABC-Transporters von *Sinorhizobium meliloti* auf. Das Genprodukt von *kpsE* ist homolog zu einem putativen Polysaccharidexportprotein von *Sinorhizobium meliloti* und zu KpsE von *E. coli* (Russo *et al.*, 1998). Für KpsE von *E. coli* wird angenommen, dass es u. a. mit Proteinen des ABC-Transporters interagiert und so den Transport von großen Molekülen ermöglicht (Russo *et al.*, 1998). KpsE von pOL1820 besitzt eine mögliche Signalsequenz mit der Schnittstelle zwischen Aminosäure 24 und 25 (²²ISA-WY²⁶) und eine C-terminale Transmembrandomäne. Stromaufwärts von *kpsE* liegt *kpsT*, das nur teilweise sequenziert wurde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *kpsT* ist homolog zu einem Polysaccharidexportprotein von *Sinorhizobium meliloti* und zu KpsT von *E. coli*. In dem sequenzierten Teil des Genproduktes von *kpsT* (pOL1820) konnte eine Walker A Box (³⁸GRNGAGKS⁴⁵) gefunden werden. Wie auch seine homologen Proteine könnte KpsT von pOL1820 die ATP-bindende Komponente eines ABC-Transporters sein. Diese Proteine besitzen zwei ATP-Bindedomänen (Walker A und Walker B) und eine ABC-Signatur-Sequenz (Russo *et al.*, 1998). Da die vollständige DNA-Sequenz von *kpsT* (pOL1820) nicht vorliegt, kann nicht beurteilt werden, ob das abgeleitete Protein ebenfalls die Walker B Box und die ABC-Proteindomäne besitzt.

Den 14 kb Plasmiden der Bodenisolat Bi1590, Bi1663 und Bi1664 scheinen diese Gene des Polysaccharidexports zu fehlen, da bei Hybridisierungen mit einem *EcoRI*-Fragment (aus dem Hybridplasmid p18E2) als Sonde, auf dem das Gen für die Permease und ein Teil des Gens für die Glykosyltransferase liegt, nur Signale mit den 20 kb Plasmiden detektiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Neben diesen Genen der Replikation und des Polysaccharidexports wurden auf dem Plasmid pOL1820 auch Gene für die 16S- und 23S-rRNA und zwei tRNA-Gene gefunden. Das vermutliche *rrn*-Operon von pOL1820 ist nicht vollständig sequenziert, es beginnt mit dem Gen für die 16S-rRNA. Dieses Gen zeigt die größte Übereinstimmung zu dem 16S-rRNA Gen von *Paracoccus aminophilus* SMK 735. Am 3' Ende des Gens befindet sich die Anti-Shine-Dalgarno Sequenz ⁷⁵⁶GATCACCTCCTT⁷⁶⁷ (die Positionsangaben beziehen sich auf die Kontig-Sequenz IV im Anhang VIII, Seite 80). Das Plasmid pOL1820 besitzt in der Spacer-Region zwischen dem 16S-rRNA Gen und dem 23S-rRNA Gen zwei Gene für Transfer-RNAs, eine Isoleucin- und eine Alanin-tRNA, wie auch in dem nah verwandten *Rhodobacter sphaeroides* (Drydeb und Kaplan, 1990). Das 23S-rRNA Gen von pOL1820 zeigt die größten Übereinstimmungen zum 23S-rRNA-Gen von *Paracoccus denitrificans* (Acc.-Nummer

X87287). Ob sich das 5S-rRNA Gen, das normalerweise direkt auf das 23S-rRNA-Gen folgt, auf dem Plasmid befindet, konnte mit den bisherigen Sequenzierungen nicht ermittelt werden.

Das Vorkommen von *rrn*-Operons auf den Plasmiden der übrigen Paracocccen-Isolate wurde durch Hybridisierungen überprüft. Ein Teil des 16S-rDNA-Gens von pOL1820 wurde als Sonde eingesetzt und gegen ungespaltene Plasmid-DNA der Paracocccen hybridisiert. Wie Abb. 20 verdeutlicht, gibt es mit allen 20 kb und 14 kb Plasmiden ein Signal. Das gleiche Ergebnis wurde mit einer 23S-rDNA-Sonde erzielt (Daten nicht gezeigt).



Die Gene für rRNAs sind normalerweise nicht auf Plasmiden, sondern im Chromosom zu finden. Bisher ist das Vorkommen eines *rrn*-Operons auf Plasmiden nur für pBM400 aus *Bacillus megaterium* beschrieben (Kunnimalaiyaan *et al.*, 2001).

Rhodobacter sphaeroides besitzt zwei Chromosomen (CI und CII) von denen CI ein *rrn*-Operon und CII zwei *rrn*-Operons besitzt (Mackenzie *et al.*, 1999); das *E. coli* Genom enthält sieben *rrn*-Operons mit je drei rRNA-Genen (Asai *et al.*, 1999). Es ist anzunehmen, dass auch die Paracocccen multiple *rrn*-Operons im Chromosom besitzen.

Für *E. coli* konnte durch die Inaktivierung von einem bis zu sieben der *rrn*-Operons (wenn alle sieben *rrn*-Operons inaktiviert waren, erfolgte die Expression der rRNA-Gene von einem *multicopy*-Plasmid, das ein einziges *rrn*-Operon enthielt) gezeigt werden, dass diese Inaktivierung die Wachstumsrate der Bakterien negativ beeinflusst (Asai *et al.*, 1999). Wie Condon *et*

al. (1993) zeigen konnten, brauchen Bakterienstämme, die keine multiplen *rrn*-Operons besitzen, eine längere Zeitspanne, um auf umweltbedingte Veränderungen, die eine Erhöhung der Wachstumsrate erfordern, zu reagieren. Sollte es sich bei dem pOL1820 um ein Plasmid mit einem zusätzlichen funktionsfähigen *rrn*-Operon handeln, dann hätten Paracocci mit diesem Plasmid bei veränderten Umweltbedingungen einen Vorteil gegenüber Paracocci mit einer geringeren Anzahl von *rrn*-Operons.

Die Transferregion von pBI709

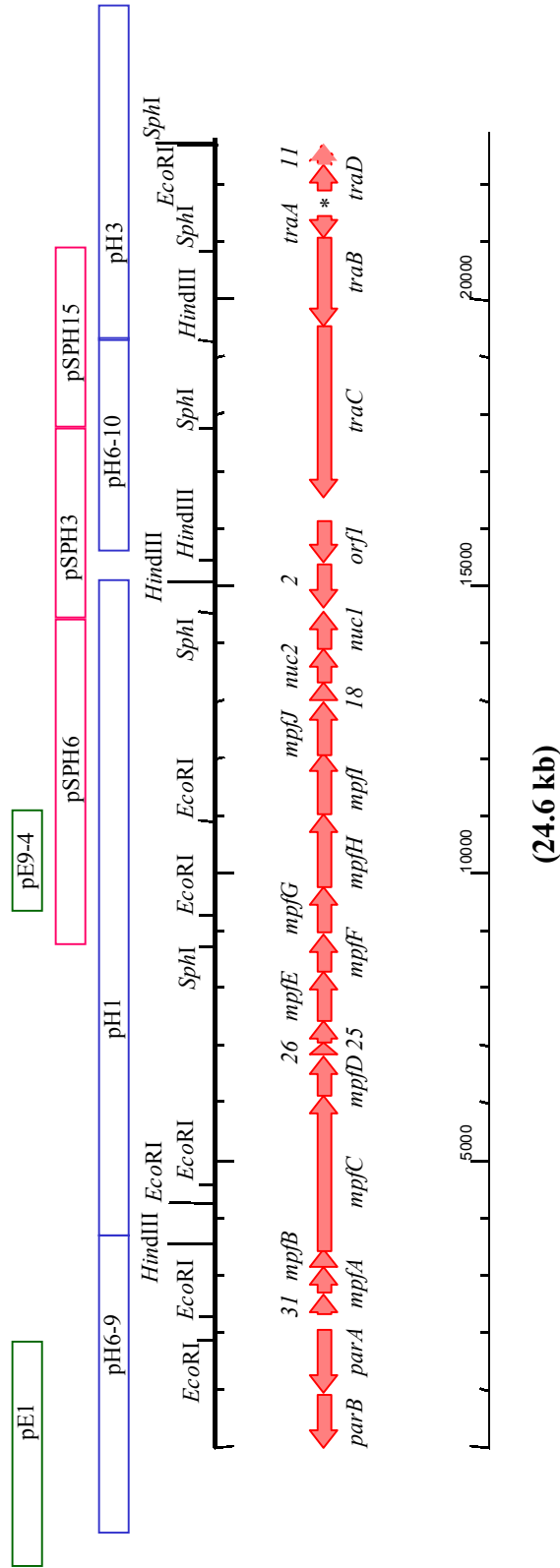


Abb. 21. Physikalische und genetische Karte der Transferregion des Plasmides pBI709. Die Lage der Inserts der Hybridplasmide in der Transferregion ist durch Balken angedeutet. Die Inserts der Hybridplasmide, die an beiden Enden der Transferregion liegen, sind verkürzt dargestellt. Die Gene für die hypothetischen Proteine Hpp31, Hpp26, Hpp25, Hpp18, Hpp2 und Hpp11 sind mit den jeweiligen Zahlen bezeichnet. * *oriT*

Die Transferregion von pBI1063

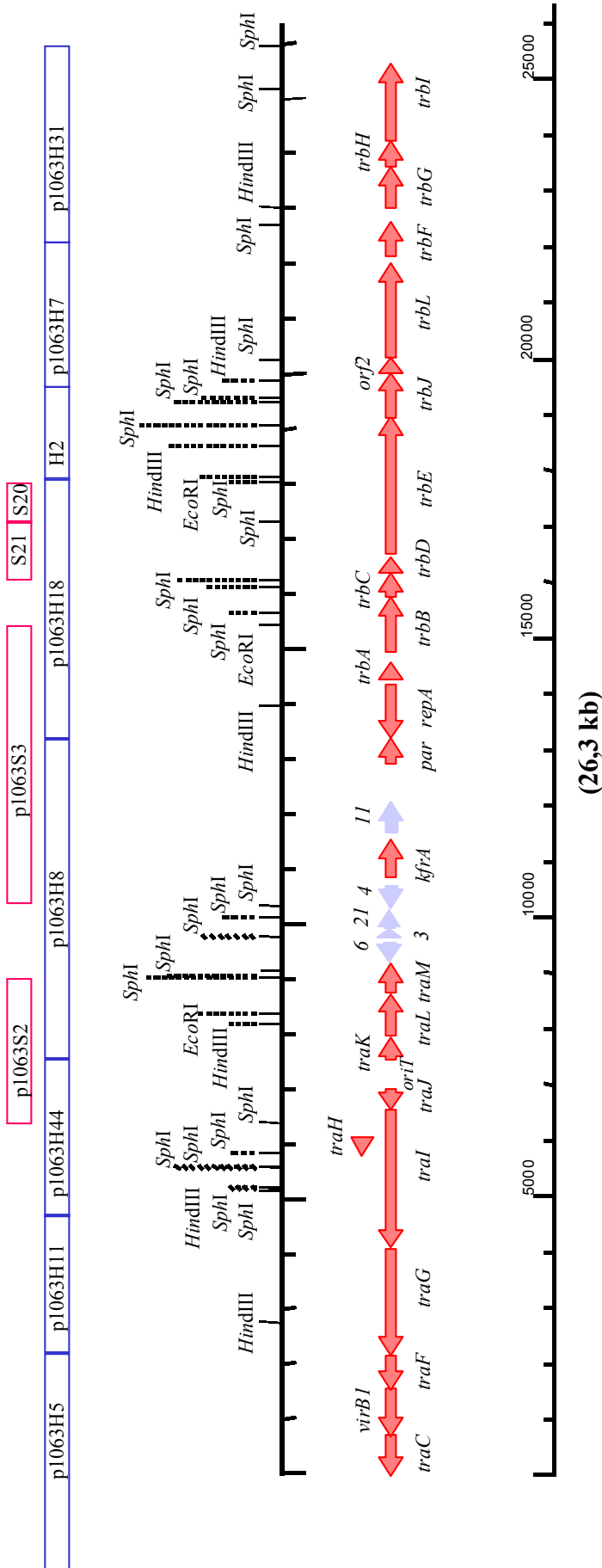


Abb. 22. Physikalische und genetische Karte der Transferregion des Plasmides pBI1063. Die Lage der Inserts der Hybridplasmide in der Transferregion ist durch Balken angedeutet. Die Inserts von p1063H5 und p1063H31 sind verkürzt dargestellt. Offene Leseraster in dem Bereich zwischen *traM* und *trbA*, für die keine Homologien gefunden wurden, sind in lila dargestellt, die Zahl gibt die *orf*-Bezeichnung an. H2: p1063H2, S20: p1063S20, S21: p1063S21.

E. DISKUSSION

Zum besseren Verständnis des konjugativen Gentransfers in bakteriellen Gemeinschaften sind zum einen Informationen über die Diversität und die Abundanz von Plasmiden und zum anderen die Kenntnis über das Ausmaß des konjugativen Potentials in diesen Gemeinschaften unerlässlich. Zusätzlich können Sequenzdaten von Transferregionen konjugativer Plasmide aus Umweltisolaten weitere Hinweise zur Evolution von Typ IV-Sekretionssystemen liefern.

E.1 Detektion von Plasmiden aus Bodenisolaten durch eine endogene Plasmidisolierung

In vielen Untersuchungen zum konjugativen Potential verschiedener Habitats wurde die exogene Plasmidisolierung gewählt (Übersicht siehe z. B. Dröge *et al.*, 1999).

Bei dieser Isolierungsmethode können in biparentalen Kreuzungen nur konjugative Plasmide mit Markergenen (z. B. Resistenzgene, degradative Gene) und in triparentalen Matings nur Plasmide, die in der Lage sind, IncQ-Plasmide zu mobilisieren, detektiert werden. Außerdem hängt die Detektion konjugativer Plasmide stark von den verwendeten Rezipienten ab (Drögen *et al.*, 1999; diese Arbeit). Zur Analyse des Plasmidgesamtgehaltes einer bakteriellen Gemeinschaft ist die exogene Isolierung nicht geeignet. Deshalb wurde in dem Teilprojekt "Analyse des Gentransferpotentials für Konjugation und Transformation" zur Detektion von Plasmiden die endogene Isolierungsmethode gewählt. Ein weiterer Vorteil dieser Isolierungsmethode ist, dass der Donorstamm der Plasmide bekannt ist. Dieses ist ein wichtiger Aspekt für die Analyse des Wirtsspektrums konjugativer Plasmide. Die Kenntnis des Donorbakteriums erlaubt außerdem einen Einblick in die Plasmidverteilung in den unterschiedlichen Gattungen der Bodenisolate. Auch der Plasmidgehalt einzelner Isolate lässt sich mit der endogenen Isolierung analysieren. Die Detektion von Plasmiden nicht kultivierbarer Bakterien ist mit der endogenen Isolierung allerdings nicht möglich.

E.2 Der Plasmidgehalt in einer Gemeinschaft von denitrifizierenden Bodenisolaten

E.2.1 Der Gesamtplasmidgehalt

Für die untersuchte Gemeinschaft von denitrifizierenden Bodenisolaten (3055 Isolate) konnte mit der Isolierungsmethode nach Ramos-Gonzales (Ramos-Gonzales *et al.*, 1991) ein Plasmidgehalt von 3.2 % ermittelt werden. Unter Berücksichtigung, dass diese Methode für sehr große Plasmide (> 250 kb) und kleine Plasmide (< 2 kb) nicht sehr sensitiv ist, und dass lineare, integrierte und RNA-haltige Plasmide mit dieser Methode nicht detektiert werden können, besitzen wahrscheinlich mehr als 3.2 % der 3055 Isolate Plasmide. Zwischen den beiden Parzellen 520 (mit Ammoniumnitrat gedüngter Ackerboden) und 521 (ungedüngter Ackerboden) konnte kein signifikanter Unterschied in dem Plasmidgehalt festgestellt werden. Über den Plasmidgehalt von Bodenisolaten gibt es in der Literatur kaum Angaben. Campbell *et al.* (1995) untersuchten fluoreszierende Pseudomonaden aus Böden auf ihren Plasmidgehalt. Im Ackerboden waren 3 % der isolierten Pseudomonaden plasmidhaltig. In Isolaten von Industrieböden stieg der Anteil plasmidhaltiger Isolate unter den fluoreszierenden Pseudomonaden auf 44 % an. Diese beiden Werte sind sicherlich nicht repräsentativ für den Gesamtgehalt an Plasmiden, da von Campbell nur fluoreszierende Pseudomonaden auf ihren Plasmidgehalt analysiert wurden. Wickham und Atlas (1988) isolierten heterotrophe Bakterien aus einem Wiesenboden, dabei waren von 110 Isolaten 23 plasmidhaltig (21 %). Koraki und Karagouni (2000) fanden unter 147 Isolaten der Gattung *Streptomyces* sechs (4 %) plasmidhaltige Isolate und von 31 Isolaten der Gattung *Bacillus* konnten Thorsted *et al.* (1999) 21 Isolate (68 %) mit Plasmiden detektieren. In all diesen Studien ist der Stichprobenumfang mit maximal 147 Isolaten zu klein, um eine statistisch gesicherte Aussage über den Plasmidgehalt der Untersuchungsflächen treffen zu können. In der Literatur konnten keine Angaben zu dem Plasmidgehalt einer Bakteriengemeinschaft aus dem Boden gefunden werden, die auf einer endogenen Plasmidisolierung von mehr als 150 Isolaten beruhten. Eine Studie mit mehr als 3000 Isolaten zur Ermittlung des Plasmidgehaltes im Boden konnte erstmalig von uns beschrieben werden (Disqué-Kochem *et al.*, 2001). Inwieweit ein Plasmidgehalt von ca. 3 % repräsentativ für das Umwelthabitat Boden bzw. für Ackerboden ist, kann aufgrund fehlender Vergleichsdaten nicht gesagt werden. Von dem Umwelthabitat Boden im allgemeinen kann so nicht gesprochen werden, da es eine Vielzahl unterschiedlicher Bodenarten (z. B. Ton, Schluff, Sand, Grus), Bodentypen (z. B. Syrosem, Ranker, Rendzina,

Braunerde, Podsol) und Nutzungsarten (z. B. Ackerland, Grünland, Wald, Ödland) gibt. Bei dem Habitat Boden handelt es sich um ein heterogenes dynamisches System, in dem die Abundanz von Bakteriengattungen, deren Verteilung im Boden und der potentielle Gentransfer durch viele Parameter (u. a. Bodenbeschaffenheit, pH-Wert, Temperatur, Anteil organischen Materials, Wassergehalt, Sauerstoffverfügbarkeit, Gehalt von Stickstoff und Phosphat, toxische Chemikalien) beeinflusst werden (van Veen *et al.*, 1997; Hill und Top, 1998; Ross *et al.*, 2000). Um die Rolle der Konjugation am HGT besser einschätzen zu können und mehr Informationen über die Plasmiddiversität zu erhalten, sind weitere Bestimmungen des Plasmidgehaltes und eine Charakterisierung der Plasmide unterschiedlicher Bodenhabitats von großer Bedeutung. Für marine Habitats ist dieses in größerem Umfang schon in Angriff genommen worden. Von 1086 aus marinem Sediment isolierten Bakterien konnten 297 (27 %) plasmidhaltige Isolate gefunden werden (Sobecky *et al.*, 1997). Reyes *et al.* (1999) untersuchten vier Sedimentproben verschiedener Standorte auf ihren Plasmidgehalt, dieser lag je nach Standort zwischen 15 % und 27 %. Cook *et al.* (2001) untersuchten Sedimentproben von drei marinen Standorten auf ihren Plasmidgehalt. Sie konnten 244 (26 %) plasmidhaltige Isolate unter insgesamt 929 Isolaten, 382 (23 %) von 1493 Isolaten und 54 (10 %) von 544 Isolaten detektieren. In der Rhizoplane von Salzsumpfmakrophyten (Beeson *et al.*, 2002) wurden von 521 Isolaten 134 (26 %) als plasmidhaltig eingestuft. Neben der Bestimmung des Plasmidgehaltes wurden die Isolate auch hinsichtlich Resistenzen (Schwermetall und Antibiotika) und Replikations-/Inkompatibilitätsgruppen charakterisiert. Das konjugative Potential wurde in diesen Studien nicht analysiert.

Der tatsächliche Plasmidgehalt der mikrobiellen Gemeinschaft in den entnommenen Bodenproben der Versuchsflächen 520 und 521 kann auch durch die endogene Plasmidisolierung nur ansatzweise beschrieben werden. Durch eine Selektion auf denitrifizierende Bakteriengattungen wurde nur ein Teil der kultivierbaren Bakterien auf Plasmide untersucht. Da Schätzungen zufolge nur etwa 1 % aller Bakterien des Bodens kultivierbar sind (Torsvik *et al.*, 1996), bezieht sich der in unserer Studie ermittelte Plasmidgehalt von 3.2 % nur auf weniger als 1 % aller im Boden vorkommenden Bakterienspezies und davon nur auf die Denitrifizierer.

E.2.2 Plasmidgehalt – ein Hinweis auf die Gentransferaktivität verschiedener Habitate?

Der in marinen Sedimenten gefundene Plasmidgehalt liegt mit Werten zwischen 10 % und 27 % (Sobecky *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 1999; Cook *et al.*, 2001) deutlich über dem in unserer Studie ermittelten Plasmidgehalt (3.2 %) eines Ackerbodens. Der große Unterschied im Plasmidgehalt könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Gentransferaktivität in marinen Sedimenten größer ist als im Ackerboden. Ein Grund für eine höhere Aktivität könnte darin begründet sein, dass marine Habitate ständig feucht sind. Das Wasser spielt eine große Rolle für die Mobilität der Bakterien in Bodenhabitaten. Durch ein ständig feuchtes Habitat wird der für die Konjugation notwendige Zell-Zell-Kontakt zwischen den unterschiedlichen Bakterien gefördert. Die Wahrscheinlichkeit der Bakterien einen Konjugationspartner zu finden ist in solchen Habitaten höher als in Habitaten, in denen die Bakterien nur eine geringe Mobilität besitzen.

E.2.3 Plasmidverteilung in den einzelnen Gattungen

Wie die Analyse des Plasmidgehaltes der 951 durch ARDRA eingruppierten Bodenisolat gezeigt hat (siehe Tabelle 3), variiert der Plasmidgehalt in den einzelnen Gattungen erheblich. So konnte unter 951 Bodenisolaten kein plasmidfreier Vertreter der Gattung *Paracoccus* gefunden werden. Wie Tabelle 3 zeigt, enthalten alle Paracocci mindestens zwei Plasmide. Auch Baj *et al.* (2001) konnten in 11 von 14 Isolaten der Gattung *Paracoccus* über 20 Plasmide mit Größen bis zu ca. 100 kb detektieren.

Die größte Gruppe der isolierten Stämme kommt aus der Gattung *Pseudomonas* (361 Isolate), davon erwiesen sich 6 % (21 Isolate) als plasmidhaltig. Unter den Isolaten der Gattungen *Agrobacterium* und *Arthrobacter* lag der Anteil an plasmidhaltigen Isolaten bei 15 % (2 Isolate) bzw. bei 2 % (1 Isolat). Dieser unterschiedliche Plasmidgehalt könnte ein Hinweis darauf sein, dass bestimmte Gattungen aktiver am Gentransfer beteiligt sind als Gattungen mit geringem Plasmidanteil.

Mit nur 951 taxonomisch eingruppierten Isolaten ist die Stichprobe allerdings zu klein, um für die untersuchten Bodenproben der Versuchsflächen 520 und 521 eine gesicherte statistische Auswertung der Plasmidverteilung in den einzelnen Gattungen vornehmen zu können.

E.2.4 Plasmidgrößen und Plasmidanzahl in den Isolaten

Die 54 plasmidhaltigen Isolate enthalten 104 Plasmide, davon sind 29 % (30 Plasmide) kleiner als 30 kb und wahrscheinlich nicht konjugativ. Die bei der exogenen Isolierung detektierten Plasmide sind größer als 30 kb (Hill *et al.*, 1992; van Elsas *et al.*, 1998; Lilley und Bailey, 1997) und die Transferregionen der bisher bekannten konjugativen Plasmide wie z. B. F, RP4 und R27 aus Gram-negativen Bakterien sind meist größer als 15 kb (Clewell, 1993; Pansegrau *et al.*, 1994b, Lawley *et al.*, 2002).

Der Anteil von Plasmiden mit einer Größe zwischen 30 kb und 70 kb liegt bei 35 % (36 Plasmide), und 47 % (49 Plasmide) aller Plasmide sind größer als 70 kb.

Die Analyse der Plasmidgrößenverhältnisse in marinen Sedimenten konnte für verschiedene Standorte kein einheitliches Bild zeigen. Diese Studien wurden alle von der gleichen Arbeitsgruppe durchgeführt und zur Plasmiddetektion wurde eine modifizierte Lyse nach Kieser (Kieser, 1984) angewandt, so dass die ermittelten Werte bezüglich der Plasmidgrößen vergleichbar sind. Reyes *et al.* (1999) beobachteten an vier verschiedenen Standorten jeweils einen größeren Anteil an Plasmiden, die größer als 30 kb sind. Dieses Ergebnis entspricht dem unserer Analyse. Eine andere Plasmidanalyse von drei Sedimentproben konnte nur für einen Standort einen etwas größeren Anteil an Plasmiden über 35 kb zeigen, bei den anderen beiden Standorten war die Anzahl der Plasmide unter 35 kb etwas höher. Die Gruppe der Plasmide zwischen 35 und 100 kb war an allen drei Standorten am häufigsten vertreten (Cook *et al.*, 2001). Ob Plasmide mit Größen zwischen 35 und 100 kb häufiger in Umweltisolaten vertreten sind als sehr kleine oder sehr große Plasmide ist fraglich. Die von uns zur Plasmiddetektion verwendete Ramos-Gonzales Methode ist für Plasmide kleiner als 2 kb und größer als 250 kb nicht sehr sensitiv, und so könnte sich das Verhältnis zugunsten der Plasmide unter 30 kb oder über 70 kb verschieben. Auch mit den anderen Plasmidisolierungsmethoden (Kieser, 1984; Kado und Liu, 1981; Eckhardt, 1978) werden sehr kleine oder sehr große Plasmide nicht so gut nachweisbar sein, wie Plasmide mit Größen zwischen 20 kb und 100 kb. Das Problem bei allen Plasmidisolierungsmethoden besteht in einer optimalen Lyse der Zellen. Bei einer zu starken Lyse können die Plasmide nicht vom Chromosom und den anderen Zellbestandteilen getrennt werden, bei einer zu schwachen Lyse hingegen gelangen nicht alle Plasmide aus der Zelle.

Vor allem große Plasmide sind schwerer zu detektieren. Da sie leicht Doppelstrang-Brüche durch Scherung bekommen, muss die Plasmidpräparation besonders vorsichtig durchgeführt werden. Die Lyse der Zellen darf nicht zu stark sein, und zur Detektion muss, da es sich bei

großen Plasmiden meist um *low-copy* Plasmide handelt, relativ viel von der Plasmidprobe auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Die Ergebnisse hinsichtlich der Plasmidgrößenhäufigkeit sind deshalb mit Vorsicht zu interpretieren.

Unter dem Vorbehalt, dass es sich bei jeder detektierten Bande im Agarosegel um ein Plasmid und nicht um verschiedene Konformationen handelt, enthalten von den 54 plasmidhaltigen Isolaten 54 % (29 Isolate) nur ein Plasmid. Bei 17 % (9 Isolate) konnten zwei Plasmide detektiert werden und bei 18 % (10 Isolate) drei Plasmide. Der Anteil der Isolate mit mehr als vier Plasmiden beträgt 11 % (jeweils drei Isolate mit vier bzw. fünf Plasmiden). Eine abnehmende Häufigkeit von Isolaten mit zunehmenden Plasmidgehalt konnte auch für marine Isolate gezeigt werden (Sobecky *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 1999; Beeson *et al.*, 2002). Zu welchen Gattungen die Isolate mit mehreren Plasmiden gehören, wurde in den obengenannten Experimenten nicht bestimmt.

Isolate mit mehr als zwei Plasmiden wurden in unserer Studie nur in den Gattungen *Citrobacter*, *Bacillus* und *Paracoccus* gefunden. Vor allem die Paracoccen scheinen ein Sammelbecken für eine Vielzahl von Plasmiden zu sein.

Eine Stichprobe von 54 plasmidhaltigen Isolaten ist sicherlich zu klein, um einen Zusammenhang zwischen der Anzahl von Plasmiden in einem Isolat und der Bakteriengattung herzustellen. Hierzu müssten weitere plasmidhaltige Isolate taxonomisch eingruppiert werden. Eine Charakterisierung der Plasmide bezüglich ihrer Genfracht (degradative Gene, Resistenzgene, Virulenzgene, etc.), ihrer Replikation und Inkompatibilität sowie ihrer Fähigkeit zur Konjugation oder zur Fähigkeit, mobilisiert zu werden, könnte Aufschluss darüber geben, warum einige Isolate einen höheren Plasmidgehalt haben als andere oder ob es sich dabei nur um ein zufälliges Ereignis handelt.

E.3 Die Plasmide aus Bodenisolaten tragen keine Antibiotikaresistenzgene und nur drei Plasmide besitzen Quecksilberresistenzgene

Plasmide mit zum Teil multiplen Antibiotikaresistenzgenen sind häufig in klinischen Bereichen und im Abwasser zu finden (Dröge *et al.*, 2000). Auch in marinen Habitaten (Hill *et al.*, 1992) und bei Pflanzenpathogenen wie z. B. *Pseudomonas syringae* (Sundin und Bender, 1996) konnten Antibiotikaresistenzplasmide identifiziert werden. Bei den 44 plasmidhaltigen Gram-negativen Bodenisolaten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, konnte keine Korrelation zwischen Plasmidgehalt und Antibiotikaresistenz festgestellt

werden. Bei der Analyse hinsichtlich möglicher Schwermetallresistenzen konnten nur drei Plasmiden Quecksilberresistenzgene zugeordnet werden. Diese im Vergleich zu Isolaten des Abwassers geringe Anzahl an Resistenzplasmiden wurde auch für andere Habitate, wie z. B. marine Sedimente (Cook *et al.*, 2001), die Rhizoplane von Salzsumpfmakrophyten (Beeson *et al.*, 2002) und die Weizenrhizosphäre (van Elsas *et al.*, 1998) beschrieben.

E.4 Bei den Plasmiden aus Bodenisolaten handelt es sich um Plasmide unbekannter Inc-Gruppen

Die plasmidhaltigen Isolate wurden mit den Inc-spezifischen Hybridisierungssonden (Couturier *et al.*, 1988) und mit dem Inc-spezifischen PCR-Testsystem (Götz *et al.*, 1996) auf ihre Zugehörigkeit zu den bekannten Inkompatibilitätsgruppen getestet. Dabei konnte kein Plasmid einer bekannten Inc-Gruppe zugeordnet werden. Die von Couturier *et al.* (1988) entwickelten Sonden und die von Götz *et al.* (1996) entwickelten PCR-Primer basieren größtenteils auf Sequenzen von Plasmiden klinischen Ursprungs aus den Gruppen der Enterobakterien und Pseudomonaden. Da diese Inc-Testsysteme mit Bodenisolaten zu keinem positiven Resultat geführt haben, scheinen sich die im Boden vorkommenden Plasmidspezies hinsichtlich ihrer Inkompatibilitätsgruppen und des Replikationssystems von den Plasmiden klinischer Isolate zu unterscheiden. Für die drei Plasmide pBI709, pBI860 und pBI1141 wird vermutet, dass sie zu der IncP-9 Gruppe gehören (siehe Abschnitt E.7.1). Eine erfolgreiche Charakterisierung von Plasmiden verschiedener Umwelthabitate mit den Inc-Testsystemen von Couturier und Götz wurde auch für Plasmide mariner Habitate (Dahlberg *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 2001), des Bodens (Drønen *et al.*, 1999), der Weizenrhizosphäre (van Elsas *et al.*, 1998) und der Zuckerrübenrhizosphäre (Lilley *et al.*, 1996) beschrieben. Unter 79 plasmidhaltigen Isolaten die aus der Phyllosphäre von Zuckerrüben isoliert wurden, konnten nur die 25 Isolate der Familie *Enterobacteriaceae* mit den *inc/rep*-Sonden positiv getestet werden (Kobayashi und Bailey, 1994).

Um besser verstehen zu können, welchen Anteil die Plasmide am Gentransfer besitzen, sind neben Kenntnissen über ihre Transferfähigkeiten und Wirtsbereiche auch Informationen über die Diversität von Replikons wichtig. Ein erster Schritt zur Analyse von Plasmidreplikons aus nicht klinischen Bereichen erfolgte für Plasmide aus marinen Umwelthabitaten. Zur Charakterisierung dieser Plasmide wurden *rep*-spezifische-Sonden und PCR-Primer entwickelt und in Studien zur Analyse der Plasmiddiversität mariner Habitate eingesetzt (Sobecky *et al.*,

1998; Cook *et al.*, 2001). Von vier aus marinem Sediment isolierten Bakterienstämmen der Gattungen *Vibrio* und *Roseobacter* wurden vier Replikons isoliert, die auch in *E. coli* C2110 und DH5 α replizierten (Sobecky *et al.*, 1998). Mit diesen vier verschiedenen *inc/rep*-spezifischen-Sonden repSD141, -SD164, -SD172 und repGA33 und von diesen Sequenzbereichen abgeleiteten PCR-Primern wurden endogen isolierte Plasmide aus marinen Habitaten und Gesamt-DNA aus marinem Sediment von Sobecky *et al.* (1998) auf das Vorhandensein der entsprechenden *inc/rep*-Sequenzen untersucht. 5 % der plasmidhaltigen Isolate aus marinem Sediment enthielten ein Replikon, das dem der repSD141-Probe ähnelt (Sobecky *et al.*, 1998). Mit den Proben repSD164 und repSD172 wurden in plasmidhaltigen Bakterien keine homologen Sequenzen detektiert. Allerdings konnten mit den repSD172-PCR-Primern mit aus marinen Sedimenten isolierter Gesamt-DNA und anschließender Hybridisierung mit der repSD172-Probe positive Signale erhalten werden (Sobecky *et al.*, 1998). Sequenzen, homolog zu der repGA33-Probe wurden in 7 % der plasmidhaltigen Bakterien, die vom Sapelo Island kultiviert wurden, gefunden. In anderen Sediment-Proben konnten keine repGA33-homologen Sequenzen detektiert werden (Cook *et al.*, 2001). Auch mit dem repSD164-PCR-Primerpaar wurde kein Amplifikat detektiert und mit den repSD172 und repGA14 konnten nur in einem untersuchten Sediment Amplifikate erhalten werden (Cook *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass mit diesen *broad-host-range* Replikonsonden/-primern nur ein kleiner Ausschnitt der Plasmiddiversität erfasst werden kann. Die Entwicklung weiterer Sonden ist Voraussetzung für die Analyse der verschiedenen Replikontypen und deren Verbreitung in mikrobiellen Gemeinschaften.

E.5 Das Gentransferpotential von Plasmiden aus Bodenisolaten

E.5.1 Mobilisierung von pSunny durch Bodenisolat

Zur Bestimmung des Gentransferpotentials in der untersuchten mikrobiellen Gemeinschaft wurde die Fähigkeit der Bodenisolat zur Mobilisierung des RSF1010-Derivates pSunny bestimmt. Von 20 getesteten Bodenisolaten waren sechs Isolate (Bi709, Bi860, Bi251, Bi147, Ki173, Bi1094) in der Lage, pSunny zu mobilisieren.

In dem Bodenisolat Bi147 konnte nur ein ca. 7 kb großes Plasmid detektiert werden, das zu klein ist, um für die notwendigen Proteine des Transmembrankanals zu kodieren. Vermutlich ist ein nicht detektiertes Megaplasmid oder ein im Chromosom integriertes Plasmid für die

Mobilisierung des IncQ-Plasmides verantwortlich. Dass die Wahl des Rezipienten entscheidend für die Detektion eines Transferereignisses ist, zeigen die folgenden Ergebnisse. Die zu der Gattung *Pseudomonas* gehörenden Isolate Bi709, Bi860 und Ki173 mobilisierten pSunny sowohl nach *Pseudomonas putida* PaW340 als auch nach *E. coli*. Ein Transfer von pSunny durch Bi251, ebenfalls zu der Gattung *Pseudomonas* gehörend, konnte nur mit *Pseudomonas putida* PaW340, nicht aber mit *Pseudomonas putida* KT2440 oder mit *E. coli* beobachtet werden. Eine Mobilisierung von pSunny erfolgt hier nur innerhalb der Gruppe der γ -Proteobakterien, aber eben nicht mit allen Mitgliedern dieser Gruppe. Auch die Mobilisierung des IncQ-Plasmides pIE723 durch das konjugative Plasmid pIPO2 konnte nicht mit allen getesteten Bakterien der α -Proteobakterien beobachtet werden (van Elsas *et al.*, 1998). Der vom Bodenisolat Bi1094 (*Paracoccus* sp.) vermittelte pSunny-Transfer konnte mit *Pseudomonas putida* (γ -Proteobakterium), nicht aber mit Rezipienten der Gattung *Paracoccus* (*P. aminophilus*, *P. denitrificans*) nachgewiesen werden. Ob andere *Paracocce*-Spezies als Rezipienten fungieren könnten, müsste für Bi1094 noch überprüft werden.

Die Mobilisierungsversuche mit den obengenannten Bodenisolaten deuten daraufhin, dass der nachweisbare Transfer/Mobilisierungsbereich eines Plasmides nicht nur durch die Zugehörigkeit von Donor und Rezipient zu der gleichen Proteobakteriengruppe bestimmt wird, sondern in vielen Fällen gattungs- oder artspezifisch ist.

Viele der getesteten Bodenisolat konnten pSunny in keinen der verwendeten Rezipienten mobilisieren. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass pSunny in den verwendeten Rezipienten replizieren kann. Neben der Möglichkeit, dass diese Bodenisolat keine Transferegene besitzen, die eine Mobilisierung von pSunny ermöglichen, können auch die Konjugations/Mobilisierungsbedingungen nicht optimal sein, so dass die Anzahl der Transferereignisse von pSunny unter der Nachweisgrenze liegen. Die Einflüsse von Temperatur, Medium, pH-Wert, Wachstumsstadium des Donors, etc. auf die Transferraten konnten in vielen Studien nachgewiesen werden (Rochelle *et al.*, 1989; Hill *et al.*, 1992; Smets *et al.*, 1993). Da bekannt ist, dass Transfersysteme wie z. B. beim Ti-Plasmid auch durch Quorum-sensing reguliert werden können (Zatyka und Thomas, 1998), könnte auch bei den in dieser Arbeit getesteten Bakterienstämmen ein solch reguliertes Transfersystem vorliegen.

Die Mobilisierung von RSF1010-Derivaten erfordert vom Helferplasmid die Bereitstellung des *coupling*-Proteins (TraG-Protein) und aller Proteine, die den Transmembrankomplex bilden (Cabezón *et al.*, 1997). Das *coupling*-Protein des Helferplasmides muss mit dem Relaxosom des RSF1010-Derivates interagieren können, damit dieses mit Hilfe des Trans

membrankomplexes in den Rezipienten transferiert werden kann. Wie in der Studie von Cabezón *et al.* (1997) gezeigt, sind aber nicht alle TraG-Proteine und Relaxosomkomplexe kompatibel. Plasmide aus Bodenisolaten, die konjugatives Potential besitzen, deren *coupling*-Proteine aber nicht mit dem Relaxosom von pSunny interagieren können, zeigen einen Transfer-negativen Phänotyp. Dieses Phänomen zeigt sich z. B. bei dem Bodenisolat Ki202 (*Pseudomonas* sp.), das ein ca. 130 kb großes konjugatives Plasmid besitzt. Unter gleichen Versuchsbedingungen konnte der Transfer dieses Plasmides in den Rezipienten *Pseudomonas putida* PaW340 nachgewiesen werden; eine Mobilisierung von pSunny durch Ki202 nach *Pseudomonas putida* PaW340 konnte hingegen nicht gezeigt werden. Der große Unterschied in der Selbsttransferrate des Plasmides pBI709 ($1-2 \times 10^{-3}$) und der Mobilisierungsrate von pSunny (5.3×10^{-8}) mit *Pseudomonas putida* PaW340 als Rezipienten lässt sich ebenfalls mit einer schlechteren Interaktion des *coupling*-Proteines mit dem pSunny-Relaxosom erklären.

E.5.2 Der Selbsttransfer konnte für die Plasmide pBI709, pBI860, pKI173 und pKI202 gezeigt werden

Da auf den meisten Plasmiden keine selektionierbaren Marker gefunden wurden, wurden die Plasmide mit Antibiotikaresistenzgenen versehen. Insgesamt konnten so 14 Plasmide markiert und auf ihre Konjugationsfähigkeit überprüft werden. Für vier Plasmide (pBI709, pBI860, pKI173 und pKI202), deren Wirtsbakterien zu der Gattung *Pseudomonas* gehören, konnte der Transfer innerhalb der γ -Proteobakterien nachgewiesen werden. Da kein Transfer mit Rezipienten anderer Proteobakteriengruppen beobachtet wurde, könnte es sich bei diesen Plasmiden um *narrow-host-range* Plasmide handeln. Die Effizienz eines DNA-Transferereignisses wird einerseits durch die Wahl des Rezipienten, andererseits durch die abiotischen und biotischen Konjugationsbedingungen (Temperatur, Medium, Wachstumsphase des Donors, Faktoren, die ein Transfersystem dereprimieren) beeinflusst. Um einen Plasmid-Transfer nachweisen zu können, muss sich das Plasmid in dem Rezipienten etablieren, d. h. hier sind u. a. der Replikationsbereich des Plasmides, die Inkompatibilität des konjugativen Plasmides gegenüber Plasmiden des Rezipienten und die Restriktionssysteme des Rezipienten Parameter, die den Nachweis des Konjugationsereignisses beeinflussen.

Die Konjugationsraten (Transkonjuganten pro Rezipient) der jeweiligen Plasmide variierten, je nachdem welcher Rezipient benutzt wurde. So liegt z. B. die Konjugationsrate für pBI860.182 mit *Pseudomonas putida* PaW340 und *Pseudomonas stutzeri* bei 2×10^{-4} und sinkt mit *Pseudomonas putida* KT2440 auf 4×10^{-7} . Diese Variabilität in der Konjugations

rate mit verschiedenen Rezipienten einer Gattung konnte auch bei der Analyse des Wirtsbereiches der Quecksilberresistenzplasmide pQM3 und pQM4 gezeigt werden (Rochelle *et al.*, 1989). Mit *Pseudomonas aeruginosa* PAO348 lagen die Transferraten bei 2.8×10^{-3} (pQM3) bzw. bei 2×10^{-5} (pQM4). Mit *Pseudomonas aeruginosa* PU21 als Rezipienten wurden Transferraten von 2.2×10^{-8} (pQM3) bzw. $< 4.1 \times 10^{-10}$ (pQM4) detektiert. Unterschiedliche Konjugationsraten von pQM3 bzw. pQM4 konnten auch mit verschiedenen *Pseudomonas putida*-, *Pseudomonas fluorescens*- und *E. coli*-Stämmen beobachtet werden (Rochelle *et al.*, 1989).

Die Konjugation von pKI173 konnte aufgrund der Antibiotikaresistenzen nur mit einem Rezipienten der Gattung *Pseudomonas* getestet werden. Die Transferrate mit diesem Rezipienten ist sehr niedrig (1.7×10^{-7}), und mit dem Restriktions-negativen *E. coli*-Stamm Ec294 als Rezipienten ist überhaupt kein Transfer nachweisbar. Im Gegensatz dazu war das Bodenisolat Ki173 in der Lage, pSunny auch in den *E. coli*-Stamm Ec294 zu mobilisieren. Mit der Plasmidisolierungs-Methode nach Ramos-Gonzales konnte nur ein Plasmid in dem Isolat Ki173 entdeckt werden. Unter der Annahme, dass dieses Isolat kein Megaplasmid oder integriertes Plasmid mit Transfergenen besitzt, liegt die Ursache für den nicht erfolgten Selbsttransfer des Plasmides pKI173 in den *E. coli*-Stamm Ec294 darin, dass pKI173 in diesem Rezipienten nicht replizieren kann.

Das Plasmid pBI860 und sein Deletionsderivat pBI709 zeigen den gleichen Wirtsbereich bezüglich des Transfers und der Replikation. Der Selbsttransfer der Plasmide konnte mit fünf verschiedenen Rezipienten (*Pseudomonas putida* PaW340 und KT2440, *Pseudomonas stutzeri* und *E. coli* C600 und Ec294) gezeigt werden.

Der Transfer des Plasmides pKI202 war nur innerhalb der Gattung *Pseudomonas* zu beobachten. Ob das Plasmid pKI202 in den anderen Rezipienten nicht replizieren kann, oder ob die Transfereffizienz mit diesen Rezipienten so gering ist, dass ein Transfer nicht nachweisbar ist, kann nicht unterschieden werden.

Für die anderen zehn markierten Plasmide konnte kein Transfer nachgewiesen werden. Da wie oben beschrieben die Wahl des Rezipienten einen sehr großen Einfluss auf den Plasmidtransfer hat, müssten diese Plasmide noch mit anderen Rezipienten unter variablen Konjugationsbedingungen (z. B. Temperatur, Medium) getestet werden.

Die in den Laborexperimenten herrschenden Bedingungen (großes Nährstoffangebot, Temperaturen um 25 °C, hohe Donor- und Rezipientendichte auf engem Raum) spiegeln nicht die Bedingungen wider, die im Umwelthabitat Boden herrschen. Deshalb sind Daten aus

Filterkreuzungsexperimenten nicht generell auf natürliche Bodensysteme übertragbar. Voraussetzung für die Konjugation ist ein Zell-Zell-Kontakt der potentiellen Konjugationspartner. Im Boden spielen dabei vor allem das Wasser- und Nährstoffangebot eine wichtige Rolle. Das Wasser beeinflusst die Mobilität und das Überleben der Bakterien, und durch ein gutes Nährstoffangebot können die Konjugationspartner höhere Zelldichten erreichen, was ebenfalls die Konjugation erleichtert. Vergleichende DNA-Transferexperimente auf Agarplatten und in Bodenproben haben gezeigt, dass die Transferraten in Bodenproben niedriger sind. So konnten z. B. Smit *et al.* (1993) zeigen, dass die Mobilisierungsrate von pSKTG (IncQ) in sterilem Boden 100-fach geringer ist als in Filterkreuzungen. DNA-Transferexperimente in künstlichen Mikrokosmen unter variierenden Bedingungen (u. a. Wasser- und Nährstoffgehalt des Bodens, Temperatur, Bodentyp) haben verdeutlicht, dass diese Parameter die Überlebensfähigkeit der Bakterien und die Konjugationsraten erheblich beeinflussen (Hill und Top, 1998). Inwieweit aber die Daten aus diesen künstlichen Mikrokosmen die aus natürlichen Bodensystemen widerspiegeln, kann nicht bewertet werden.

E.6 Das Gentransferpotential der untersuchten Bodenisolat

Insgesamt wurden 22 Bodenisolat auf ihr Gentransferpotential hin untersucht. Sieben Bakterienstämme (Bi251, Bi709, Bi860, Ki173 und Ki202 aus der Gattung *Pseudomonas*, Bi147 aus der Gattung *Alcaligenes* und Bi1094 aus der Gattung *Paracoccus*) wurden in Mobilisierungs- und Konjugationsexperimenten positiv getestet. Für das Plasmid pBI1063 konnten durch Sequenzierungen Transfergene identifiziert werden. Ein Transfer des Plasmides oder eine Mobilisierung von pSunny konnten mit den verwendeten Rezipienten jedoch nicht gezeigt werden. Unter der Annahme, dass pBI1063 ein intaktes Transfersystem besitzt, konnte somit für acht Isolate ein Gentransferpotential ermittelt werden. Dies entspricht einem Anteil von 36 %.

Wie die Ergebnisse der Mobilisierung und der Konjugation zeigen, beeinflussen mehrere Parameter den Transfer von Plasmiden. Bodenisolat, die pSunny mobilisieren können und Plasmide, für die eine Konjugation gezeigt werden konnte, besitzen eindeutig Gentransferpotential. Für alle die Bodenisolat und Plasmide, für die kein Transfer nachgewiesen werden konnte, kann ein solches Potential nicht ausgeschlossen werden. Daher ist anzunehmen, dass der Anteil der konjugativen Plasmide höher ist als 36 %.

E.7 Die Sequenzierung der Transferregionen der Plasmide pBI709 und pBI1063 liefert neue Daten über die Transfersysteme von Plasmiden aus Bodenisolaten

Die Transferregionen von Resistenzplasmiden (z. B. R388, RP4, R751) sind in der Regel die am besten untersuchten. Von Plasmiden aus Bodenisolaten (z. B. pWW0, SAL, NAH, pJP4) waren bzw. sind größtenteils nur die degradativen Gene bekannt und analysiert. Um einen Einblick in die Diversität der Plasmide aus Bodenisolaten zu bekommen, muss ein breites Spektrum an unterschiedlichen Plasmiden (degradative Plasmide, Resistenzplasmide, kryptische Plasmide, Virulenzplasmide; *broad-* und *narrow-host-range* Plasmide; Plasmide mit und ohne Transferpotential) untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Daten über Transfergene von Plasmiden aus Bodenisolaten ermittelt und analysiert werden. Die Transferregionen der Plasmide pBI709 und pBI1063 wurden fast vollständig sequenziert und analysiert.

E.7.1 Ist pBI709 ein pWW0-ähnliches Plasmid und gehört zur IncP-9 Gruppe?

Das ca. 60 kb große Quecksilberresistenzplasmid pBI709 zeigt in vielen Bereichen Ähnlichkeiten zu dem IncP-9 Plasmid pWW0 (116 kb). So ist die Genorganisation der Transferregion von pBI709 bis auf zwei Ausnahmen identisch mit der des degradativen Plasmides pWW0 (siehe Abb. 8). Die Identität der Transfergene von pBI709 und pWW0 liegt zwischen 54 % und 87 %, was für eine nahe Verwandtschaft dieser beiden Transfersysteme spricht. Auch im Bereich der hypothetischen Replikationsregion und Partitioning-/Stabilitätsregion zeigen die beiden Plasmide in ihren DNA-Sequenzen große Übereinstimmungen (siehe Sequenzvergleich der Plasmide pBI709 und pWW0, Anhang III, Seite 34). Außer in den Genen der genannten Regionen und vier weiteren Genen, die für hypothetische Proteine kodieren, weisen die übrigen partiell sequenzierten Bereiche des Plasmides pBI709 auf DNA-Ebene keine signifikanten Übereinstimmungen zu pWW0 auf.

Die vollständigen Sequenzdaten der Transferregion und die einzelnen Sequenzdaten der "Partitioning"- und Replikationsregion von pBI709 lassen vermuten, dass der als "*backbone*" (Villarrol *et al.*, 1983) bezeichnete Bereich dieses Plasmides (Replikation, Transfer, *maintenance*, Inkompatibilität) homolog zu dem von pWW0 ist. Restriktionsanalysen und Hybridisierungsexperimente haben gezeigt, dass pBI709 wahrscheinlich ein Deletionsderivat von pBI860 und pBI1141 ist. So könnte es sich bei diesen drei Plasmiden um pWW0-ähnliche handeln.

Die nur auf pBI709 gefundenen Transpositionsgene und die Quecksilberresistenzgene deuten daraufhin, dass die Plasmide pBI709 und pWW0 eine andere Genfracht tragen. Inwieweit sich die Genfracht von pBI709 und pWW0 unterscheiden bzw. gleichen, kann nicht beurteilt werden, solange nicht die vollständige Nukleotidsequenz von pBI709 vorliegt.

Innerhalb der Gattung *Pseudomonas* konnten bisher 14 Plasmidinkompatibilitätsgruppen identifiziert werden (IncP1-IncP14), die sich teilweise mit Gruppen, die schon für *E. coli* klassifiziert wurden, überschneiden (z. B. IncP-1 entspricht IncP in *E. coli* und IncP-4 entspricht IncQ) (Chakrabarty, 1976; Tschäpe, 1994). Mit den IncP-PCR-Primern von Götz *et al.* (1996) und den IncP-Hybridisierungssonden von Couturier *et al.* (1988) konnten die Plasmide pBI709, pBI860 und pBI1141 nicht in die Gruppe der IncP-Plasmide (IncP-1) eingestuft werden. Da IncP-9 Primer nicht zur Verfügung standen, konnten die Plasmide nicht auf ihre Zugehörigkeit zu dieser Inc-Gruppe getestet werden. Das Plasmid pWW0 gehört zu der IncP-9 Gruppe, die sowohl degradative Plasmide (z. B. SAL, NAH) als auch Resistenzplasmide (z. B. pMG18, pM3) enthält. IncP-9 Plasmide konnten in verschiedenen Umwelthabitaten isoliert werden, so wurde z. B. pM3 im Abwasser und im Boden einer pharmazeutischen Fabrik und aus Böden verschiedener Industriegebiete detektiert (Greated *et al.*, 2000).

Aufgrund der Homologien von pBI709 zu den Replikations- und "Partitioning"-Regionen des IncP-9 Plasmides pWW0, könnten auch pBI709, pBI860 und pBI1141 zu dieser Inc-Gruppe gehören. Ein Transfer von pBI709 und pBI860 in einen Rezipienten, der das IncP-9 SAL Plasmid trägt, war nicht nachweisbar, dies könnte ein Hinweis auf Inkompatibilität sein. Zur genauen Bestimmung der Inc-Gruppe müssen weitere Tests durchgeführt werden.

E.7.2 Die *mpf*-Region von pBI709 wird durch zwei *nuc*-Gene und drei hypothetische Gene von der *dtr*-Region getrennt

Die Transferregionen von pBI709 und pWW0 sind sich in ihrer Organisation sehr ähnlich (siehe Abb. 8). Wie bei anderen konjugativen Plasmiden (z. B. pKM101, RP4, pTi) liegen auch bei pBI709 die Gene, die für Proteine des Transmembrankanals kodieren (*Mpf*), und die Gene des *dtr* getrennt in zwei Clustern vor. Bei pBI709 liegen in diesem ca. 4400 bp großen Bereich zwischen *mpfJ* und *traC* fünf offene Leseraster (*hpp18*, *hpp2*, *orf1*, *nuc1* und *nuc2*). Für die Genprodukte dieser fünf Gene gibt es keine Hinweise auf eine Beteiligung an dem DNA-Transportprozess im Rahmen der Konjugation. Das Vorkommen von Nukleasegenen in Transferregionen scheint nichts ungewöhnliches zu sein. Dieses wurde z. B. für das IncN-Plasmid pKM101 (Winans und Walker, 1983), für die IncP-9 Plasmide SAL 1 (Battermann,

1997) und pWW0 (Acc.-Nummer NC_003350) und für das IncI1 Plasmid R64 (Komano *et al.*, 2000) nachgewiesen. Winans und Walker (1983) schlossen u. a. eine Funktion der periplasmatischen Nuklease bei der Konjugation, der *entry exclusion* und bei der Degradation fremder DNA aus. Auch die Nuklease von R64 scheint keine essentielle Rolle beim DNA-Transfer zu spielen (Komano *et al.* 2000). Winans und Walker (1983) konnten auch für Plasmide der Inc-Gruppen IncH, IncI, IncN und IncM zeigen, dass diese für eine EDTA-resistente Endonuklease kodieren. Die Lokalisation der *nuc*-Gene auf diesen Plasmiden ist nicht bestimmt worden.

Das Vorkommen von *nuc*-Genen in den Transferregionen könnte spezifisch für bestimmte Inc-Gruppen sein und somit Hinweise zur Verwandtschaft von Transfersystemen liefern.

E.7.3 Die *dtr*-Region von pBI709 und pWW0 ist ähnlich der *dtr*-Region von R388

IncW-Plasmide gehören mit Größen zwischen 30 und 40 kb zu den kleinsten bekannten konjugativen Plasmiden Gram-negativer Bakterien. Das bestuntersuchte IncW-Plasmid R388 besitzt 15 Transfergene, die eine ca. 13 kb große Region umfassen und in zwei Klassen (*dtr*- und *mpf*-Gene) eingruppiert werden können. Die *dtr*-Region bei R388 umfasst nur drei Gene (*trwA*, *trwB*, *trwC*), wobei TrwB das *coupling*-Protein ist, während TrwA und TrwC zusammen mit dem *integration host* Faktor das Relaxosom bilden (Zechner *et al.*, 2000; Gomis-Rüth *et al.*, 2002). Auch pBI709 und das IncP-9 Plasmid pWW0 besitzen eine kurze *dtr*-Region aus nur wenigen Genen, in der neben dem *oriT* vier Gene lokalisiert sind (*traA*, *traB*, *traC*, *traD*). TraC und TraB dieser Plasmide sind homolog zu TrwC bzw. TrwB von R388. Der hypothetische *oriT* wird von den Genen *traA* und *traD* eingerahmt. In den meisten Transfersystemen liegen an diesen Positionen Gene, deren Produkte an der DNA-Prozessierung, insbesondere an der Bildung des Relaxosoms, beteiligt sind. Eine ähnliche Funktion wäre auch für die Proteine TraA und TraD denkbar.

E.7.4 Das konjugative pBI709 kodiert für kein VirB7-homologes Protein

Die Konjugationsfähigkeit des Plasmides pBI709 konnte mit verschiedenen Rezipienten nachgewiesen werden. Die Sequenzierung und Analyse der Transferregion hat gezeigt, dass pBI709 die gleichen homologen *tra*-Gene besitzt wie das konjugative IncP-9 Plasmid pWW0. Die Tra-Proteine dieser Plasmide zeigen auch Homologien zu VirB-Proteinen des Ti-

Plasmides. So kodieren pBI709 und pWW0 für alle VirB-homologen Proteine mit Ausnahme eines VirB7-homologen Proteines (siehe Abschnitt D.3.2).

Für den Transfer der T-DNA vom Ti-Plasmid sind u. a. die Proteine VirB2–VirB11 essentiell (Berger und Christie, 1994). Bei VirB7 handelt es sich um ein Lipoprotein, das in der äußeren Membran lokalisiert ist und mit dem T-Pilus assoziiert vorliegt (Sagulenko *et al.*, 2001). VirB7 bildet Homodimere und einen heterodimeren Komplex mit VirB9. Dieser VirB7-VirB9-Komplex dient als "*nucleating center*" für die anderen an dem Transmembrankomplex beteiligten Proteine (Anderson *et al.*, 1996; Baron *et al.*, 1997b; Hapfelmeier *et al.*, 2000). VirB7-homologe Proteine sind auch in anderen Transfersystemen, wie z. B. im *ptl*-Operon von *Bordetella pertussis*, dem *virB*-Operon von *Brucella*-Spezies, dem *lvhB* Operon von *Legionella pneumophila* und der Transferregion von IncP-Plasmiden (R751) vorhanden (Cao und Saier, 2001).

Proteine, die in einigen Transfersystemen essentiell sind, können wiederum in anderen Systemen fehlen. So gibt es z. B. in den Transfersystemen von pBI709, pWW0 und pXAC64 kein VirB7-homologes Protein. In dem Transportsystem von pVT745 gibt es nur ein Protein, das als Piluskomponente in Betracht kommt, so dass entweder ein VirB2- oder ein VirB3-homologes Protein fehlt (Galli *et al.*, 2001). Die Analyse von Konjugationssystemen unterschiedlicher Plasmide hat gezeigt, dass die verschiedenen Konjugationssysteme auf mechanistischer Ebene gleich sind, sich aber aufgrund der Plasmiddiversität in einigen Punkten, z. B. bezüglich der Funktion einzelner Proteine (z. B. sind die Relaxasen der IncW-Plasmide bifunktionell und besitzen neben der Relaxase- auch eine Helikaseaktivität; die Relaxasen der IncP Plasmide besitzen keine Helikaseaktivität) und des Zusammenbaus der Transmembranpore unterscheiden. So könnte die Membranpore des pBI709 Transportsystems so aufgebaut sein, dass ein VirB7-homologes Protein nicht benötigt wird, oder die Rolle des VirB7 wird von einem anderen Transferprotein übernommen.

E.7.5 Die Genorganisation der TraI Region von pBI1063 ähnelt der TraI Region von RP4 und die TraII Region der vom Octopin Ti-Plasmid

Bei dem Plasmid pBI1063 liegen die Transfergene in zwei Regionen vor, die ca. 5 kb auseinander liegen. In der Region zwischen *traM* und *trbA* konnten nur für drei aller möglichen offenen Leseraster signifikante Homologien gefunden werden (siehe Tab. 17). Wie z. B. bei RP4 (Ziegelin *et al.*, 1991) und Ti-Plasmiden (Alt-Mörbe *et al.*, 1996; Farrand *et al.*, 1996) liegen bei pBI1063 in der TraI Region die Gene des *dtr* und *traF*, dessen Genprodukt zur

Bildung des Mpf-Komplexes essentiell ist. Die TraII Regionen von pBI1063, RP4 (Lessl *et al.*, 1992) und dem Octopin-Ti Plasmid (Acc.-Nummer AF242881) enthalten die Gene, die für Proteine der Transmembranpore kodieren. Die Genanordnung in der TraII Region von pBI1063 ist fast identisch mit der des Octopin-Ti Plasmides. Ein *trbK*-homologes Gen, das in der *mpf*-Region vom pTi zwischen *trbJ* und *trbL* liegt, fehlt in der *mpf*-Region von pBI1063. Zwischen *trbJ* und *trbL* des pBI1063 liegt zwar ein offenes Leseraster, für das aber weder auf DNA- noch auf Protein-Ebene eine signifikante Homologie gefunden wurde.

Die Sequenz der TraI Region (pBI1063) liegt nicht vollständig vor, so dass nicht bekannt ist, ob stromaufwärts von dem *traC* Gen (wie bei RP4) *traA*- und *traB*-homologe Gene folgen. In dem sequenzierten Teil der TraI Region von pBI1063 konnte kein *traE*-homologes Gen detektiert werden. Dieses Gen könnte sich in dem noch nicht sequenzierten Bereich stromaufwärts von *traC* befinden. Bei TraE von RP4 handelt es sich um ein nicht essentielles Transferprotein mit einer Topoisomerase-Aktivität. Dieses Protein könnte eine Rolle bei der Auflösung von Replikationsintermediaten beim konjugativen DNA-Transfer oder bei der vegetativen Replikation spielen. Ein *traE*-homologes Gen ist nicht in allen Transfersystemen vorhanden. Es wird vermutet, dass die Funktion von TraE durch eine chromosomalkodierte Topoisomerase übernommen werden kann (Li *et al.*, 1997).

Ungewöhnlich ist das *virB1*-Gen von pBI1063, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz sowohl zu TraD (R751/RP4) als auch zu VirB1 (pTi) homolog ist. Die VirB1-homologen Proteine zeigen die konservierten Sequenzmotive lytischer Transglykosylasen (Koonin und Rudd, 1994; Mushegian *et al.*, 1996) und könnten durch Auflösung der Peptidoglykanschicht den Aufbau des konjugativen Transmembrankanals erleichtern (Bayer *et al.*, 1995; Baron *et al.*, 1997a, Llosa *et al.*, 2000). Die Funktion von TraD (R751/RP4) ist noch nicht bekannt. Ein Protein, das sowohl zu VirB1 (pTi) als auch zu TraD (R751/RP4) homolog ist, ist bisher von keinem anderen Transfersystem bekannt. Ob es sich bei VirB1 (pBI1063) um ein funktionsfähiges bifunktionelles Protein handelt, kann bisher nicht beurteilt werden.

Abgesehen von den oben beschriebenen Ausnahmen ist die Anordnung der Gene der pBI1063 TraI Region identisch mit der Organisation der entsprechenden homologen Gene in der RP4 TraI Region (siehe Abb. 10).

Im Gegensatz zu pBI709, dessen Transfersystem in der Organisation und dessen Transfergene homolog zu dem Transfersystem von pWW0 sind, konnte für pBI1063 kein Transfersystem gefunden werden, das sowohl in der Genorganisation als auch auf Proteinebene dem von pBI1063 entspricht. Die meisten Transferproteine von pBI1063 ähneln denen von IncP-

Plasmiden, aber für einige Proteine konnten nur Ähnlichkeiten zu Transferproteinen von unbekanntem bzw. nicht kultivierten Bakterien gefunden werden. Auch die Organisation der Transferregion von pBI1063 ähnelt zwei verschiedenen Transfersystemen (RP4 und pTi). Solch ein modulartiger Aufbau von Transfersystemen, in denen Gencluster mit funktionell analogen Genprodukten in den unterschiedlichsten Kombinationen und Anordnungen auftreten, wurde auch für andere Transfersysteme beschrieben (Zechner *et al.*, 2000).

Wäre die Sequenz von pWW0 nicht publiziert, so würde auch das Transfersystem von pBI709 einen modulartigen Aufbau zeigen. Einige Transferproteine von pBI709 sind ähnlich zu VirB-Proteinen von *Agrobacterium*, *Rickettsia*, *Xanthomonas* oder *Mesorhizobium*. Die Organisation der *mpf*-Gene A bis H von pBI709 gleicht der Organisation des *virB*-Operons und der *tra*-Region von IncN- und IncW-Plasmiden. Nur die Organisation der *dtr*-, der *nuc*- und der hypothetischen Gene von pBI709 ist, abgesehen von pWW0, in keinem anderen bekannten Transfersystem beschrieben. Erst durch die Sequenzierung der Transferregion von pWW0 konnte die Verwandtschaft zwischen den Transfersystemen von pBI709 und pWW0 gezeigt werden. Der Eindruck eines modulartigen Aufbaus eines Transfersystems könnte somit dadurch entstehen, dass bislang vor allem Transfersysteme von Plasmiden bekannter Inc-Gruppen untersucht wurden, oft aus Bakterien klinischer Bereiche. Die DNA-Transfersysteme von Plasmiden unbekannter Inc-Gruppen wurden noch nicht so detailliert untersucht. Sequenzdaten dieser Konjugationssysteme können vielleicht weitere Hinweise zur Evolution dieser Systeme liefern, und den (scheinbar) modulartigen Aufbau einiger Transfersysteme erklären.

E.8 Ist das Plasmid pBI1063 konjugativ?

Das Plasmid pBI1063 kodiert für Transferproteine, die die besten Übereinstimmungen zu RP4 Transferproteinen zeigen (siehe Tab. 17). Die TraI Region von RP4 besteht aus 13 Genen, von denen aber nur fünf (*traF*, *traG*, *traI*, *traJ* und *traK*) essentiell sind (Guiney, *et al.*, 1989; Cole *et al.*, 1993; Haase *et al.*, 1995; Lanka und Wilkins, 1995). Diese essentiellen Gene sind auch in der TraI Region von pBI1063 vorhanden. Da die TraI Region von pBI1063 nicht vollständig sequenziert wurde, sind außer den oben genannten *tra*-Genen bisher nur das *traD* (RP4)-homologe *virB1* und das *traC* (RP4)-homologe *traC* dieser Region bekannt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich noch *traA*, *traB*, *traE* (RP4)-homologe Gene auf pBI1063 befinden.

In der RP4 TraII Region liegen 16 Gene (*trbA-trbP*), die für Proteine des Translokationsapparates kodieren. Zu der essentiellen Core-Region gehören nur 10 Gene (*trbB*, *-C*, *-D*, *-E*, *-F*, *-G*, *-H*, *-I*, *-J* und *-L*) (Lessl *et al.*, 1993; Haase *et al.*, 1995), die entsprechenden homologen Gene wurden auch bei pBI1063 in der TraII Region detektiert. Von den nicht essentiellen Transfergenen des RP4 Plasmides wurde auf pBI1063 nur das *trbA* gefunden, das vermutlich für die Regulation des Transfersystems notwendig ist. Theoretisch besitzt pBI1063 somit alle essentiellen Transfergene. Ob sie aber ausreichend für einen Transfer von pBI1063 sind und ob sie alle funktionell sind kann erst beurteilt werden, wenn ein Transfer des Plasmides gezeigt werden konnte. Sollte pBI1063 ein funktionsfähiges konjugatives Transportsystem besitzen, gäbe es andere Gründe warum ein Transfer des Plasmides pBI1063 bislang nicht nachgewiesen wurde. Suboptimale Konjugationsbedingungen (Temperatur, Medium, Rezipient etc.) könnten die Konjugationseffizienz drastisch herabsetzen, so dass der Transfer nicht nachgewiesen werden kann. Außerdem könnten weitere noch unbekannte Faktoren benötigt werden, um das Konjugationssystem zu induzieren, z. B. über "Quorum-sensing" wie bei pTi. Es wäre auch möglich, dass pBI1063 nicht in der Lage ist, sich stabil in den verwendeten Rezipienten zu etablieren.

E.9 pOL1820 - Plasmid oder Minichromosom?

Bei der Untersuchung der Isolate auf ihren Plasmidgehalt fiel besonders die Gattung *Paracoccus* auf. Im Vergleich zu den anderen Isolaten ist diese Gattung besonders plasmidreich, und alle Isolate enthalten ein 20 kb oder ein 14 kb Plasmid (siehe Tab. 3). Um zu überprüfen, ob es sich bei diesen 20 kb bzw. 14 kb Plasmiden um konjugative Plasmide handelt, wurden exemplarisch Teile des 20 kb Plasmides pOL1820 aus dem Isolat O118 ansequenziert. Die Sequenzanalysen und Hybridisierungen haben gezeigt, dass auf all diesen 20 kb und 14 kb Plasmiden der untersuchten Stämme, Gene für die 16S-rRNA, für t-rRNAs und für die 23S-rRNA lokalisiert sind. Da die Sequenzierungen noch nicht abgeschlossen sind, kann das Vorhandensein eines 5S-rRNA-Gens auf diesen Plasmiden und somit das Vorhandensein eines vollständigen *rrn*-Operons nicht ausgeschlossen werden. *rrn*-Operons wurden bislang nur auf (multiplen) bakteriellen Chromosomen identifiziert. Erst 2001 konnte gezeigt werden, dass sich auf dem nicht essentiellen Plasmid pBM400 (53 kb, aus *B. megaterium*) ein vollständiges rRNA-Operon befindet (Kunnimalaiyaan *et al.*, 2001). Normalerweise besitzt eine Zelle mehrere Kopien von rRNA-Operons. So wurden z. B. bei

dem nah verwandten *Rhodobacter sphaeroides* drei rRNA-Operons (*rrnA*, *rrnB* und *rrnC*) gefunden (Dryden und Kaplan, 1990; Mackenzie *et al.*, 1999). Es ist nicht davon auszugehen, dass das *rrn*-Operon auf pOL1820 das einzige in der Zelle ist. Da weitere Untersuchungen zu diesem Plasmid noch nicht abgeschlossen sind und vor allem bisher ein *curing* nicht gelungen ist, und somit kein plasmidfreier isogener Stamm zur Verfügung steht, kann nicht beurteilt werden, ob das Plasmid eventuell essentiell ist, da es das einzige *rrn*-Operon trägt, und somit als "Minichromosom" bezeichnet werden müsste. Das Auftauchen der Plasmide in allen Stämmen ließe sich auch durch den Wachstumsvorteil, den *rrn*-Operons bieten erklären. Es fände somit eine positive Selektion auf den Plasmiderhalt statt.

In den Mobilisierungsexperimenten mit pSunny konnte der Transfer des 20 kb Plasmides aus Bi1094 nach *Pseudomonas putida* PaW340 nachgewiesen werden. Auch dieses 20 kb Plasmid besitzt rRNA-Gene (siehe Abschnitt D.3.9). Ob dieses Plasmid mobilisierbar ist oder durch Kointegratbildung mit einem konjugativen Plasmid transferiert wurde, kann nicht beurteilt werden. Die Tatsache dass rRNA-Operons nicht nur auf Chromosomen vorkommen (Mackenzie *et al.*, 1999), sondern auch auf Plasmiden, die eventuell konjugativ oder mobilisierbar sind, könnte weitreichende Konsequenzen für die Systematik der Bakterien bedeuten.

Die 16S-rDNA-Bestimmungen der *Paracoccus*-Bodenisolate ergab die gleiche Sequenz, die auch für das auf dem Plasmid lokalisierte 16S-rRNA-Gen ermittelt wurde. Es stellt sich jetzt natürlich auch die Frage, ob die 16S-rRNA-Gene auf dem Plasmid und im Chromosom gleich sind oder ob bei der PCR-Amplifizierung und anschließenden Klonierung nur das 16S-rRNA-Gen der Plasmide kloniert und sequenziert wurde. Da bisher "Curing"-Experimente mit den Paracocccen-Isolaten erfolglos waren, kann diese Frage nicht beantwortet werden.

E.10 Ausblick

Untersuchungen zum Plasmidgehalt in Bodenisolaten wurden bisher nur in kleinerem Umfang durchgeführt. In dem BMBF Teilprojekt "Analyse des Gentransferpotentials für Konjugation und Transformation" wurden erstmals über 3000 Isolate mit der endogenen Isolierungsmethode auf ihren Plasmidgehalt überprüft. Diese plasmidhaltigen Isolate können als Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen zur Plasmiddiversität dienen. Es bleiben eine Reihe offener Fragen: Welche Genfracht tragen die Plasmide von Bodenisolaten – gibt es weitere Plasmide mit rRNA-Genen oder anderen eventuell essentiellen Genen? Die *inc*- und

rep-Sonden von Plasmiden aus *Enterobacteriaceen* scheinen nicht die von Plasmiden aus Bodenisolaten zu repräsentieren. Welche Inkompatibilitäts- und Replikontypen gibt es unter diesen Plasmiden? Hier könnten wie schon für marine Bodenisolatate begonnen, *rep*- und *inc*-Sonden entwickelt werden, mit denen Plasmide aus Bodenisolaten analysiert werden könnten. Wie die Experimente zum Gentransfer dieser Arbeit verdeutlicht haben, ist u. a. die Wahl des Rezipienten ein wesentlicher Parameter für die Nachweisbarkeit eines Plasmidtransfers. Die Isolate, für die bisher kein Gentransferpotential gefunden wurde, müssten noch unter veränderten Versuchsbedingungen und mit weiteren Rezipienten getestet werden.

Die Sequenzdaten der Transfergene von pBI709 und pBI1063 liefern weitere Bausteine, um die Evolution und die Diversität von Transfersystemen besser verstehen zu können. In weiteren Versuchen könnte durch gezielte Inaktivierung bestimmter Transfergene die Funktion einzelner Proteine im Transferprozess untersucht werden.

F. LITERATUR

- Alt-Mörbe, J., J. L. Stryker, C. Fuqua, P. L. Li, S. K. Farrand und S. C. Winans.** 1996: The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti *vir* genes. *J. Bacteriol.* **178**: 4248-4257.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman.** 1997: Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Anderson, L. B., A. Vogel Hertz und A. Das.** 1996: *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 form a disulfide-linked protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8889-8894.
- Asai, T., C. Condon, J. Voulgaris, D. Zaporjets, B. Shen, M. Al-Omar, C. Squires und C. L. Squires.** 1999: Construction and initial characterization of *Escherichia coli* strains with few or no intact chromosomal rRNA operon. *J. Bacteriol.* **181**: 3803-3809.
- Bachmann, B. J.** 1987: In *E. coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology, ed. F. C. Neidhardt: Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. ASM pp. 1190-1219.
- Bagdasarian, M, R. Lurz, B. Ruckert, F. C. H. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey und K. N. Timmis.** 1981: Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.
- Baj, J., E. Piechucka, D. Bartosik und M. Wlodarczyk.** 2000: Plasmid occurrence and diversity in the genus *Paracoccus*. *Acta Microbiol. Pol.* **49**: 265-270.
- Bale, J. M., J. C. Fry und M. J. Day.** 1987: Plasmid transfer between strains of *Pseudomonas aeruginosa* on membrane filters attached to river stones. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3099-3107.
- Balzer, D., W. Pansegrau und E. Lanka.** 1994: Essential motifs of relaxase (TraI) and TraG proteins involved in conjugative transfer of plasmid RP4. *J. Bacteriol.* **176**: 4285-4295.
- Baron, C., M. Llosa, S. Zhou und P. C. Zambryski.** 1997a: VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, is processed to a C-terminal secreted product, VirB1*. *J. Bacteriol.* **179**: 1203-1210.
- Baron, C., Y. R. Thorstenson und P. C Zambryski.** 1997b: The lipoprotein VirB7 interacts with VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **179**: 1211-1218.
- Bateman, A., E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall und E. L. L. Sonnhammer.** 2002: The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **30**: 276-280.
- Bates, S., A. M. Cashmore und B. M. Wilkins.** 1998: IncP plasmids are unusually effective in mediating conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the Tra2 mating system. *J. Bacteriol.* **180**: 6538-6543.
- Battermann, A.** 1997: Herstellung einer Genbank des konjugativen SAL Plasmides von *Pseudomonas putida* zur Identifizierung der Transferregion. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Bayer, M., R. Eferl, G. Zellnig, K. Teferle, A. Dijkstra, G. Koraimann und G. Högenauer.** 1995: Gene 19 of plasmid R1 is required for both efficient conjugative DNA transfer and bacteriophage R17 infection. *J. Bacteriol.* **177**: 4279-4288.

- Beaupré, C. E., J. Bohne, E. M. Dale und A. N. Binns.** 1997: Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J. Bacteriol.* **179**: 78-89.
- Beeson, K. E., D. L. Erdner, C. E. Bagwell, C. R. Lovell und P. A. Sobecky.** 2002: Differentiation of plasmids in marine diazotroph assemblages determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Microbiol.* **148**: 179-189.
- Beijersbergen, A., S. J. Smith und P. J. J. Hooykaas.** 1994: Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* **32**: 212-218.
- Berger, B. R. und P. J. Christie.** 1993: The *Agrobacterium tumefaciens virB4* gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J. Bacteriol.* **175**: 1723-1734.
- Berger, B. R. und P. J. Christie.** 1994: Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J. Bacteriol.* **176**: 3646-3660.
- Bickle, T. A. und D. H. Krüger.** 1993: Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev.* **57**: 434-450.
- Biebl, H. und N. Pfennig.** 1981, in *The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria.* Edited by: M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows und H. G. Schlegel
- Birnboim, H. C. und J. Doly.** 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez und J. M. Short.** 1987. *Biotechniques* **5**: 376-379.
- Burlage, R. S., S. W. Hooper und G. S. Sayler.** 1989: The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1323-1328.
- Burland, V., Y. Shao, N. T. Perna, G. Plunkett, H. J. Sofia und F. R. Blattner.** 1998: The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res.* **26**: 4196-4204.
- Busse, H.-J., E. B. M. Denner und W. Lubitz.** 1996: Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotech.* **47**: 3-38.
- Byrd, D. R. und S. W. Matson.** 1997: Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. *Mol. Microbiol.* **25**: 1011-1022.
- Cabezón, E., E. Lanka und F. de la Cruz.** 1994: Requirements for mobilization of plasmids RSF1010 and ColE1 by the IncW plasmid R388: *trwB* and RP4 *traG* are interchangeable. *J. Bacteriol.* **176**: 4455-4458.
- Cabezón, E., J. I. Sastre und F. de la Cruz.** 1997: Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 400-406.
- Campbell, J. I. A., C. S. Jacobsen und Jan Sørensen.** 1995: Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**: 51-62.
- Cao, T. B. und M. H. Saier, jr.** 2001: Conjugal type IV macromolecular transfer systems of gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. *Microbiol.* **147**: 3201-3214.
- Casjens, S., M. Delange, H. L. Ley III, P. Rosa und W. M. Huang.** 1995: Linear chromosomes of Lyme disease agent Spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. *J. Bacteriol.* **177**: 2769-2780.
- Chakrabarty, A. M.** 1976: Plasmids in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Genet.* **10**: 7-30.
- Chattoraj, D. K.** 2000: Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol. Microbiol.* **37**: 467-476.

- Christie, P. J. und J. P. Vogel.** 2000: Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**: 354-360.
- Christie, P. J.** 2001: Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* **40**: 294-305.
- Clewell, D. B.** 1993: Bacterial conjugation. Plenum Press New York
- Cole, S. P., E. Lanka und D. G. Guiney.** 1993: Site-directed mutations in the relaxase operon of RP4. *J. Bacteriol.* **175**: 4911-4916.
- Condon, C., S. French, C. Squires und C. L. Squires.** 1993: Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies. *EMBO J.* **12**: 4305-4315.
- Cook, M. A., A. M. Osborn, J. Bettendorff und P. A. Sobecky.** 2001: Endogenous isolation of replicon probes for assessing plasmid ecology of marine sediment microbial communities. *Microbiol.* **147**: 2089-2101.
- Couturier M., F. Bex, P. L. Bergquist und W. K. Maas.** 1988: Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* **52**: 375-395.
- Covacci, A. und R. Rappuoli.** 1993: Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. *Mol. Microbiol.* **8**: 429-434.
- Dahlberg, C., C. Linberg, V. L. Torsvik und M. Hermansson.** 1997: Conjugative plasmids isolated from bacteria in marine environments show various degrees of homology to each other and are not closely related to well-characterized plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4692-4697.
- Dale, E. M., A. N. Binns und J. E. Ward, Jr.** 1993: Construction and characterization of Tn5*virB*, a transposon that generates nonpolar mutations, and its use to define *virB8* as an essential virulence gene in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **175**: 887-891.
- Dang, T. A. und P. J. Christie.** 1997: The VirB4 ATPase of *Agrobacterium tumefaciens* is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface. *J. Bacteriol.* **179**: 453-462.
- Dang, T. A., X.-R. Zhou, B. Graf und P. J. Christie.** 1999: Dimerization of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the assembly and function of the T-DNA transporter. *Mol. Microbiol.* **32**: 1239-1253.
- Das, A., and Y.-H. Xie.** 1998: Construction of transposon Tn3*phoA*: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. *Mol. Microbiol.* **27**: 405-414.
- Das, A. und Y.-H. Xie.** 2000: The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J. Bacteriol.* **182**: 758-763.
- Davison, J.** 1999: Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**: 73-91.
- Dejonghe, W., J. Goris, S. El Fantroussi, M. Höfte, P. De Vos, W. Verstraete und E. M. Top.** 2000: Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3297-3304.
- De Lorenzo, V., S. Fernandez, M. Herrero, U. Jakubzik und K. N. Timmis.** 1993: Engineering of alkyl- and haloaromatic-responsive gene expression with mini-transposons containing regulated promoters of biodegradative pathways of *Pseudomonas*. *Gene* **130**: 41-46.
- Derbyshire, K. M., G. Hatfull und N. Willetts.** 1987: Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF1010: a genetic and DNA sequence analysis of the mobilization region. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 161-168.
- Diels, L. und M. Mergeay.** 1990: DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1485-1491.

- Diels, L., Q. Dong, D. van der Lelie, W. Baeyens und M. Mergeay.** 1995: The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 142-153.
- Dijkstra, B. W. und A.-M. W. H. Thunnissen.** 1994: Holy proteins II: the soluble lytic transglycosylase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 810-813.
- Dijkstra, A. J. und W. Keck.** 1996: Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. Bacteriol.* **178**: 5555-5562.
- Disqué-Kochem, C. und B. Dreiseikelmann.** 1997: The cytoplasmic DNA-binding protein TraM binds to the inner membrane protein TraD *in vitro*. *J. Bacteriol.* **179**: 6133-6137.
- Disqué-Kochem, C., A. Battermann, M. Strätz und B. Dreiseikelmann.** 2001: Screening for *trbB*- and *traG*-like sequences by PCR for the detection of conjugative plasmids in bacterial soil isolates. *Microbiol. Res.* **156**: 159-168.
- Doolittle, W. F.** 1998: You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends Genet.* **14**: 307-311.
- Downing, R. und P. Broda.** 1979: A cleavage map of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol. Gen. Genet.* **177**: 189-191.
- Dreiseikelmann, B.** 1994: Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol. Rev.* **58**: 293-316.
- Dröge, M., A. Pühler und W. Selbitschka.** 1999: Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies. *Biol. Fertil Soils* **29**: 221-245.
- Dröge, M., A. Pühler und W. Selbitschka.** 2000: Phenotypic and molecular characterization of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 471-482.
- Drønen, A. K., V. Torsvik und E. M. Top.** 1999: Comparison of the plasmid types obtained by two distantly related recipients in biparental exogenous plasmid isolations from soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**: 105-110.
- Dryden, S. C. und S. Kaplan.** 1990: Localization and structural analysis of the ribosomal RNA operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7267-7277.
- Dubnau, D.** 1999: DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 217-244.
- Easter, C. L., H. Schwab und D. R. Helinski.** 1998: Role of the *parCBA* operon of the broad-host-range plasmid RK2 in stable plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* **180**: 6023-6030.
- Eberl, L., C. S. Kristensen, M. Givskov, E. Grohmann, M. Gerlitz und H. Schwab.** 1994: Analysis of the multimer resolution system encoded by the *parCBA* operon of broad-host-range plasmid RP4. *Mol. Microbiol.* **12**: 131-141.
- Eckhardt, T.** 1978: A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
- Eisenbrandt, R., M. Kalkum, E.-M. Lai, R. Lurz, C. I. Kado und E. Lanka.** 1999: Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J. Biol. Chem.* **274**: 22548-22555.
- Eisenbrandt, R., M. Kalkum, R. Lurz und E. Lanka.** 2000: Maturation of IncP pilin precursors resembles the catalytic dyad-like mechanism of leader peptidase. *J. Bacteriol.* **182**: 6751-6761.
- Engelberg-Kulka, H. und G. Glaser.** 1999: Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 43-70.
- Farrand, S. K., I. Hwang und D. M. Cook.** 1996: The *tra* region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4, and F. *J. Bacteriol.* **178**: 4233-4247.

- Galli, D. M., J. Chen, K. F. Novak und D. J. Leblanc.** 2001: Nucleotide sequence and analysis of conjugative plasmid pVT745. *J. Bacteriol.* **183**: 1585-1594.
- Gerdes, K., A. P. Gulyaev, T. Franch, K. Pedersen und N. D. Mikkelsen.** 1997: Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu. Rev. Genet.* **31**: 1-31.
- Gerdes, K., J. Møller-Jensen und R. B. Jensen.** 2000: Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol. Microbiol.* **37**: 455-466.
- Götz, A., R. Pukall, E. Smit, E. Tietze, R. Prager, H. Tschäpe, J. D. van Elsas und K. Smalla.** 1996: Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2621-2628.
- Götz, A. und K. Smalla.** 1997: Manure enhances plasmid mobilization and survival of *Pseudomonas putida* introduced into field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1980-1986.
- Gomis-Rüth, F. X., F. de la Cruz and M. Coll.** 2002: Structure and role of coupling proteins in conjugal DNA transfer. *Res. Microbiol.* **153**: 199-204.
- Grahn, A. M., J. Haase, D. H. Bamford und E. Lanka.** 2000: Components of the RP4 conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecule transport system. *J. Bacteriol.* **182**: 1564-1574.
- Grandoso, G., M. Llosa, J. C. Zabala and F. de la Cruz.** 1994: Purification and biochemical characterization of TrwC, the helicase involved in plasmid R388 conjugal DNA transfer. *Eur. J. Biochem.* **226**: 403-412.
- Greated, A., M. Titok, R. Krasowiak, R. J. Fairclough und C. M. Thomas.** 2000: The replication and stable-inheritance functions of IncP-9 plasmid pM3. *Microbiol.* **146**: 2249-2258.
- Güttler, A.** 1998: Entwicklung eines Rekombinationssystems zum Studium horizontalen Gentransfers auf unbekannte Bakterien sowie die Konstruktion von Transposonvektoren mit *gfp* als Markergen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Guiney, D. G., P. Hasegawa und D. E. Davies.** 1984: Plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Bacteroides fragilis*: differential expression of antibiotic resistance phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7203-7206.
- Guiney, D. G., C. Deiss, V. Simnad, L. Yee, W. Pansegrau und E. Lanka.** 1989: Mutagenesis of the TraI core region of RK2 by using Tn5: identification of plasmid-specific transfer genes. *J. Bacteriol.* **171**: 4100-4103.
- Haase, J., R. Lurz, A. M. Grahn, D. H. Bamford und E. Lanka.** 1995: Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex. *J. Bacteriol.* **177**: 4779-4791.
- Haase, J. und E. Lanka.** 1997: A specific protease encoded by the conjugative transfer systems of IncP and Ti plasmids is essential for pilus synthesis. *J. Bacteriol.* **179**: 5728-5735
- Hamilton, C. M., H. Lee, P.-L. Li, D. M. Cook, K. R. Piper, S. Beck von Bodman, E. Lanka, W. Ream and S. K. Farrand.** 2000: TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmid confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *J. Bacteriol.* **182**: 1541-1548.
- Hapfelmeier, S., N. Domke, P. C. Zambryski und C. Baron.** 2000: VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **182**: 4505-4511.
- Heinemann, J. A.** 1999: Genetic evidence of protein transfer during bacterial conjugation. *Plasmid* **41**: 240-247.
- Herrero, M., V. de Lorenzo und K. N. Timmis.** 1990: Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.

- Hill, K. E., A. J. Weightman und J. C. Fry.** 1992: Isolation and screening of plasmids from the epilithon which mobilize recombinant plasmid pD10. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1292-1300.
- Hill, K. E. und E. M. Top.** 1998: Gene transfer in soil systems using microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 319-329.
- Hobbs, M. und J. S. Mattick.** 1993: Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* **10**: 233-243.
- Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward und H. Schrempf.** 1985: Genetic manipulations of *Streptomyces*. A laboratory manual. John Innes Foundation. Norwich. UK.
- Hwang, I., P.-L. li, L. Zhang, R. Pieper, D. M. Cook, M. E. Tate und S.K. Farrand.** 1994: TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4639-4643.
- Jacob-Dubuisson, F., C. Loch und R. Antoine.** 2001: Two-partner secretion in gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* **40**: 306-313.
- Jagura-Burdzy, G. und C. M. Thomas.** 1992: *kfrA* gene of broad host range plasmid RK2 encodes a novel DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.* **225**: 651-660.
- Jagura-Burdzy, G., F. Khanim, C. A. Smith und C. M. Thomas.** 1992: Crosstalk between plasmid vegetative replication and conjugative transfer: repression of the *trfA* operon by *trbA* of broad host range plasmid RK2. *Nucl. Acids Res.* **20**: 3939-3944.
- Jensen, R. B. und K. Gerdes.** 1995: Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Mol. Microbiol.* **17**: 205-210.
- Jiang, S. C. und J. H. Paul.** 1998: Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2780-2787.
- Jones, A. L., K. Shirasu und C. I. Kado.** 1994: The product of the *virB4* gene of *Agrobacterium tumefaciens* promotes accumulation of VirB3 protein. *J. Bacteriol.* **176**: 5255-5261.
- Jones, A. L., E.-M. Lai, K. Shirasu und C. I. Kado.** 1996: VirB2 is a processed pilin-like protein encoded by the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J. Bacteriol.* **178**: 5706-5711.
- Kado, C. I. und S.-T. Liu.** 1981: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
- Kado, C. I.** 1994: Promiscuous DNA transfer system of *Agrobacterium tumefaciens*: role of the *virB* operon in sex pilus assembly and synthesis. *Mol. Microbiol.* **12**: 17-22.
- Kado, C. I.** 1998: Origin and evolution of plasmids. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 117-126.
- Kieser, T.** 1984: Factors effecting the isolation of ccc DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**: 19-36.
- Khan, S. A.** 2000: Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol. Microbiol.* **37**: 477-484.
- Kholodii, G.Y., S. Z. Mindlin, I. A. Bass, O. V. Yurieva, S. V. Minakhina und V. G. Nikiforov.** 1995: Four genes, two ends, and a *res* region are involved in transposition of Tn5053: a paradigm for a novel family of transposons carrying either a *mer* operon or an integron. *Mol. Microbiol.* **17**: 1189-1200.
- Kholodii, G. Y., O. V. Yurieva, Z. M. Gorlenko, S. Z. Mindlin, I. A. Bass, O. L. Lomovskaya, A. V. Kopteva und V. G. Nikiforov.** 1997: Tn5041: a chimeric mercury resistance transposon closely related to the toluene degradative transposon Tn4651. *Microbiol.* **143**: 2549-2556.

- Kim, J. J. und G. W. Sundin.** 2000: Regulation of the *rulAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *rulAB*-mediated mutability in vitro and in planta. *J. Bacteriol.* **182**: 6137-6144.
- Kobayashi, N. und M. J. Bailey.** 1994: Plasmids isolated from the sugar beet phyllosphere show little or no homology to molecular probes currently available for plasmid typing. *Microbiol.* **140**: 289-296.
- Komano, T., T. Yoshida, K. Narahara und N. Furuya.** 2000: The transfer region of IncI1 plasmid R64: similarities between R64 *tra* and *Legionella icm/dot* genes. *Mol. Microbiol.* **35**: 1348-1359.
- Koonin, E. V.** 1993: A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J. Mol. Biol.* **229**: 1165-1174.
- Koonin, E. V. und K. E. Rudd.** 1994: A conserved domain in putative bacterial and bacteriophage transglycosylase. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 106-107.
- Koraki, T. G. und A. D. Karagouni.** 2000: Occurrence and diversity of plasmids in populations of streptomycetes in soil. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 323-329.
- Koski, P., H. Saarilahti, S. Sukupolvi, S. Taira, P. Riikonen, K. Österlund, R. Hurme und M. Rhen.** 1992: A new α helical coiled coil protein encoded by the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *J. Biol. Chem.* **267**: 12258-12265.
- Krause, S., M. Bárcena, W. Pansegrau, R. Lurz, J. M. Carazo und E. Lanka.** 2000a: Sequence-related protein export NTPases encoded by the conjugative transfer region of RP4 and by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* share similar hexameric ring structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3067-3072.
- Krause, S., W. Pansegrau, R. Lurz, F. de la Cruz und E. Lanka.** 2000b: Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J. Bacteriol.* **182**: 2761-2770.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne und E. L. L. Sonnhammer.** 2001: Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**: 567-580.
- Kumar, S., X. Cheng, S. Klimasauskas, S. Mi, J. Posfai, R. J. Roberts und G. G. Wilson.** 1994: The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1-10.
- Kumar, R. B und A. Das.** 2001: Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore protein VirB8. *J. Bacteriol.* **183**: 3636-3641.
- Kunnimalaiyaan, M., D. M. Stevenson, Y. Zhou und P. S. Vary.** 2001: Analysis of the replicon region and identification of an rRNA operon on pBM400 of *Bacillus megaterium* QM B1551. *Mol. Microbiol.* **39**: 1010-1021.
- Kurbanova, I. V., V. A. Velikov und M. I. Chumakov.** 2001. Expression of VirB2 protein-containing structures on *Agrobacterium* in mating cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 291-295.
- Lai, E.-M. und C. I. Kado.** 1998: Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **180**: 2711-2717.
- Lai, E.-M. und C. I. Kado.** 2000: The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol.* **8**: 361-368.
- Lai, E.-M., O. Chesnokova, L. M. Banta, and C. I. Kado.** 2000: Genetic and environmental factors affecting T-pilin export and T-pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **182**: 3705-3716.
- Lanka, E. und B. M. Wilkins.** 1995: DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 141-169.

- Lane, D.** 1991: 16S/23SrRNA sequencing. in: E.Stackebrandt, M. Goodfellow (eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, UK. 115-165.
- Lawley, T.D., M. W. Gilmor, J. E. Gunton, L. J. Standeven und D. E. Taylor.** 2002: Functional and mutational analysis of conjugative transfer region 1 (Tra1) from the IncHI1 plasmid R27. *J. Bacteriol.* **184**: 2173-2180.
- Lawrence, J. G. und H. Ochman.** 1998: Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9413-9417.
- Lessl, M., D. Balzer, W. Pansegrau, and E. Lanka.** 1992: Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti VirB region strongly support the conjugation model for the T-DNA transfer. *J. Biol. Chem.* **267**: 20471-20480.
- Lessl, M., D. Balzer, K. Weyrauch, and E. Lanka.** 1993: The mating pair formation system of plasmid RP4 defined by RSF1010 mobilization and donor-specific phage propagation. *J. Bacteriol.* **175**: 6415-6425.
- Li, P.-L. und S. K. Farrand.** 2000: The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the *repABC* family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing regulatory system. *J. Bacteriol.* **182**: 179-188.
- Li, Z., H. Hiasa, U. Kumar und R. J. DiGate.** 1997: The *traE* gene of plasmid RP4 encodes a homologue of *Escherichia coli* DNA topoisomerase III. *J. Biol. Chem.* **272**: 19582-19587.
- Liebert, C. A., J. Wireman, T. Smith und A. O. Summers.** 1997: Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1066-1076.
- Liebert, C. A., A. L. Watson und A. O. Summers.** 2000: The quality of *merC*, a module of the *mer* mosaic. *J. Mol. Evol.* **51**: 607-622.
- Lilley, A. K., M. J. Bailey, M. J. Day und J. C. Fry.** 1996: Diversity of mercury resistance plasmids obtained by exogenous isolation from the bacteria of sugar beet in three successive years. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 211-227.
- Lilley, A. K. und M. J. Bailey.** 1997: The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked pseudomonad population colonizing the sugar beet phytosphere is related to local environmental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1577-1583.
- Lin, K.-J.** 1998: Gemeinschaftsanalyse von Bodenbakterien. Diplomarbeit, Universität Bielefeld
- Linton, K. J. und C. F. Higgins.** 1998: The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.* **28**: 5-13.
- Llosa, M., S. Bolland, and F. de la Cruz.** 1994: Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the IncW plasmid R388. *J. Mol. Biol.* **235**: 448-464.
- Llosa, M., G. Grandoso und F. de la Cruz.** 1995: Nicking activity of TrwC directed against the origin of transfer of the IncW plasmid R388. *J. Mol. Biol.* **246**: 54-62.
- Llosa, M., G. Grandoso, M. A. Hernando, and F. de la Cruz.** 1996: Functional domains in protein TrwC of plasmid R388: dissected DNA strand transferase and DNA helicase activities reconstitute protein function. *J. Mol. Biol.* **264**: 56-67.
- Llosa, M., J. Zupan, C. Baron, and P. Zambryski.** 2000: The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. *J. Bacteriol.* **182**: 3437-3445.
- Lodwick, D. und P. Strike.** 1991: Distribution of sequences homologous to the *impCAB* operon of TP110 among bacterial plasmids of different incompatibility groups. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 27-30.

- Lorenz, M. G. und W. Wackernagel.** 1994: Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58**: 563-602.
- Macartney, D. P., D. R. Williams, T. Stafford und C. M. Thomas.** 1997: Divergence and conservation of the partitioning and global regulation functions in the central control region of the IncP plasmids RK2 and R751. *Microbiol.* **143**: 2167-2177.
- Machón, C., S. Rivas, A. Albert, F. M. Goñi und F. de la Cruz.** 2002: TrwD, the hexameric traffic ATPase encoded by plasmid R388, induces membrane destabilization and hemifusion of lipid vesicles. *J. Bacteriol.* **184**: 1661-1668.
- Mackenzie, C., A. E. Simmons und S. Kaplan.** 1999: Multiple chromosomes in bacteria: the yin and yang of *trp* gene localization in *Rhodobacter spaeroides* 2.4.1. *Genet.* **153**: 525-538.
- Maidak, B. L., J. R. Cole, T. G. Lilburn, C. T. Parker jun., P. R. Saxman, R. J. Farris, G. M. Garrity, G. J. Olsen, T. M. Schmidt und J. M. Tiedje.** 2001: The RDP-II (Ribosomal database project). *Nucleic Acids Res.* **29**: 173-174.
- Mandel, M., und A. Higa.** 1970: Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
- Martínez-Abarca, F., S. Zekri und N. Toro.** 1998: Characterization and splicing *in vivo* of a *Sinorhizobium meliloti* group II intron associated with particular insertion sequences of the IS630-Tc1/IS3 retroposon superfamily. *Mol. Microbiol.* **28**: 1295-1306.
- Matsuura, M., J. W. Noah und A. M. Lambowitz.** 2001: Mechanism of maturase-promoted group II intron slicing. *EMBO J.* **20**: 7259-7270.
- Mazodier, P. und J. Davies.** 1991: Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 147-171.
- Mergeay, M., P. Lejeune, A. Sadouk, J. Gerits und L. Fabry.** 1987: Shuttle transfer (or retrotransfer) of chromosomal markers mediated by plasmid pULB113. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 61-70.
- Miele, L., B. Strack, V. Kruft und E. Lanka.** 1991: Gene organization and nucleotide sequence of the primase region of IncP plasmids RP4 and R751. *DNA Seq. J.* **2**: 145-162.
- Miller, R. V.** 2001: Environmental bacteriophage-host interactions: factors contribution to natural transduction. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 141-147.
- Moller, S., M. D. R. Croning und R. Apweiler.** 2001: Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **17**: 646-653.
- Moncalián, G., E. Cabezón, I. Alkorta, M. Valle, F. Moro, J. M. Valpuesta, F. M. Goñi und F. de la Cruz.** 1999: Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. *J. Biol. Chem.* **274**: 36117-36124.
- Motallebi-Veshareh, M., D. A. Rouch und C. M. Thomas.** 1990: A family of ATPases involved in active partitioning of diverse bacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* **4**: 1455-1463.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloona.** 1987: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**: 335-350.
- Mushegian, A. R., K. J. Fullner, E. V. Koonin und E. W. Nester.** 1996: A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7321-7326.
- Neilson, J. W., K. L. Josephson, I. L. Pepper, R. B. Arnold, G. D. Di Giovanni und N. A. Sinclair.** 1994: Frequency of horizontal gene transfer of a large catabolic plasmid (pJP4) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4053-4058.

- Nelson, K. E., R. A. Clayton, S. R. Gill, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, W. C. Nelson, K. A. Ketchum, L. McDonald, T. R. Utterback, J. A. Malek, K. D. Linher, M. M. Garrett, A. M. Stewart, M. D. Cotton, M. S. Pratt, C. A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, J. A. Eisen, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter und C. M. Fraser. 1999: Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**: 323-330.
- Netolitzky, D. J., X. Wu, S. E. Jensen und K. L. Roy. 1995: Giant linear plasmids of β -lactam antibiotic producing *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**: 27-34.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak und G. von Heijne. 1997: Identification of procaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**: 1-6.
- Nucifora, G., L. Chu, S. Silver und T. K. Misra. 1989: Mercury operon regulation by the *merR* gene of the organomercurial resistance system of plasmid pDU1358. *J. Bacteriol.* **171**: 4241-4247.
- Nunn, D., S. Bergman und S. Lory. 1990: Products of three accessory genes, *pilB*, *pilC*, and *pilD*, are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *J. Bacteriol.* **172**: 2911-2919.
- Osborn, A. M., K. D. Bruce, P. Strike und D. A. Ritchie. 1997: Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**: 239-262.
- Pansegrau, W., D. Balzer, V. Krufft, R. Lurz und E. Lanka. 1990a: *In vitro* assembly of relaxosomes at the transfer origin of plasmid RP4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6555-6559.
- Pansegrau, W. G. Ziegelin und E. Lanka. 1990b: Covalent association of the *traI* gene product of plasmid RP4 with the 5'-terminal nucleotide at the relaxation nick site. *J. Biol. Chem.* **265**: 10637-10644.
- Pansegrau, W., W. Schröder und E. Lanka. 1994a: Concerted action of three distinct domains in the DNA cleaving-joining reaction catalysed by relaxase (TraI) of conjugative plasmid RP4. *J. Biol. Chem.* **269**: 2782-2789.
- Pansegrau, W., E. Lanka, P. T. Barth, D. H. Figurski, D. G. Guiney, D. Haas, D. R. Helinski, H. Schwab, V. A. Stanisich und C. M. Thomas. 1994b: Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP α plasmids. *J. Mol. Biol.* **239**: 623-663.
- Paterson, E.S., M. I. Moré, G. Pillay, C. Cellini, R. Woodgate, G. C. Walker, V. N. Iyer und S. C. Winans. 1999: Genetic analysis of the mobilization and leading regions of the IncN plasmids pKM101 and pCU1. *J. Bacteriol.* **181**: 2572-2583.
- Plano, G. V., J. B. Day und F. Ferracci. 2001: Type III export: new uses for an old pathway. *Mol. Microbiol.* **40**: 284-293.
- Pohlman, R. F., F. Liu, L. Wang, M. I. Moré und S. C. Winans. 1993: Genetic and biochemical analysis of an endonuclease encoded by the IncN plasmid pKM101. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4867-4872.
- Pohlman, R. F., H. D. Genetti und S. C. Winans. 1994. Common ancestry between IncN conjugal transfer genes and macromolecular export systems of plant and animal pathogens. *Mol. Microbiol.* **14**: 655-668.
- Possot, O. und A. P. Pugsley. 1994: Molecular characterization of Pule, a protein required for pullulanase secretion. *Mol. Microbiol.* **12**: 287-299.
- Powell, B. J., K. J. Purdy, I. P. Thompson und M. J. Bailey. 1993: Demonstration of *tra*⁺ plasmid activity in bacteria indigenous to the phyllosphere of sugar beet; gene transfer to a recombinant pseudomonad. *FEMS Microbiol. Ecol.* **12**: 195-206.
- Rådström, P., O. Sköld, G. Swedberg, J. Flensburg, P. H. Roy und L. Sundström. 1994: Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu and the retroelements. *J. Bacteriol.* **176**: 3257-3268.

- Ramos-Gonzales, M.-I., E. Duque und J. L. Ramos.** 1991: Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3020-3027.
- Rashkova, S., X.-R. Zhou, J. Chen und P. J. Christie.** 2000: Self assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 traffic ATPase. *J. Bacteriol.* **182**: 4137-4145.
- Rawlings, D. E. und E. Tietze.** 2001: Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 481-496.
- Rees, C. E. D. und B. M. Wilkins.** 1990: Protein transfer into the recipient cell during bacterial conjugation: studies with F and RP4. *Mol. Microbiol.* **4**: 1199-1205.
- Reimann, C. und D. Haas.** 1993: Mobilization of chromosomes and nonconjugative plasmids by cointegrative mechanisms. Kapitel 6, Seite 137-188. In *Bacterial conjugation*, Plenum Press, New York und London.
- Reyes, N. S., M. E. Frischer und P. A. Sobecky.** 1999: Characterization of mercury resistance in marine sediment microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**: 273-284.
- Richaume, A., J. S. Angle und M. J. Sadowsky.** 1989: Influence of soil variables on in situ plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1730-1734.
- Ripp, S. und R. V. Miller.** 1995: Effects of suspended particulates on the frequency of transduction among *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1214-1219.
- Rivas, S., S. Bolland, E. Cabenzón, F. M. Goñi and F. de la Cruz.** 1997: TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation. *J. Biol. Chem.* **272**: 25583-25590.
- Rochelle, P. A., J. C. Fry und M. J. Day.** 1989: Factors affecting conjugal transfer of plasmids encoding mercury resistance from pure cultures and mixed natural suspensions of epilithic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 409-424.
- Rohrer, J. und D. E. Rawlings.** 1992: Sequence analysis and characterization of the mobilization region of the broad-host-range plasmid, pTF-FC2, isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **174**: 6230-6237.
- Rosche, T. M., A. Siddique, M. H. Larsen und D. H. Figurski.** 2000: Incompatibility protein IncC and global regulator KorB interact in active partition of promiscuous plasmid RK2. *J. Bacteriol.* **182**: 6014-6026.
- Ross, I. L., Y. Alami, P. R. Harvey, W. Achouak und M. H. Ryder.** 2000: Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related pseudomonads isolated from wheat field soils in south australia. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1609-1616.
- Russo, T. A., S. Wenderoth, U. B. Carlino, J. M. Merrick und A. J. Lesse.** 1998: Identification, genomic organization, and analysis of the group III capsular polysaccharide genes *kpsD*, *kpsM*, *kpsT*, and *kpsE* from an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (CP9, O4/K54/H5). *J. Bacteriol.* **180**: 338-349.
- Sagulenko, V., E. Sagulenko, S. Jakubowski, E. Spudich und P. J. Christie.** 2001: VirB7 lipoprotein is exocellular and associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T pilus. *J. Bacteriol.* **183**: 3642-3651.
- Sandkvist, M.** 2001: Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* **40**: 271-283.
- Saraste, M., P. R. Sibbald und A. Wittinghofer.** 1990: The P-loop – a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 430-434.
- Schmidt-Eisenlohr, H., N. Domke und C. Baron.** 1999a: TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 5563-5571.
- Schmidt-Eisenlohr, H., N. Domke, C. Angerer, G. Wanner, P. C. Zambryski und C. Baron.** 1999b: Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **181**: 7485-7492.

- Schneiker, S., M. Keller, M. Dröge, E. Lanka, A. Pühler und W. Selbitschka.** 2001: The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from the microbial population residing in the rhizosphere of alfalfa. *Nucleic Acids Res.* **29**: 5169-5181.
- Schröder, G., S. Krause, E. L. Zechner, B. Traxler, H.-J. Yeo, R. Lurz, G. Waksman und E. Lanka.** 2002: TraG-like proteins of DNA transfer systems and of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates? *J. Bacteriol.* **184**: 2767-2779.
- Schumann, W.** 1990: *Biologie bakterieller Plasmide*. F. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig
- Simon, R., U. B. Prierer und A. Pühler.** 1983: A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.
- Silver, S. und L. T. Phung.** 1996: Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 753-789.
- Shoemaker, N. B., C. Getty, J. F. Gardener und A. A. Salyers.** 1986: Tn4351 transposes in *Bacteroides* spp. and mediates the integration of plasmid R751 into the *Bacteroides* chromosome. *J. Bacteriol.* **165**: 929-936.
- Siddique, A. und D. H. Figurski.** 2002: The active partition gene *incC* of the IncP plasmids is required for stable maintenance in a broad range of hosts. *J. Bacteriol.* **184**: 1788-1793.
- Siddiqui, R. A., H. G. Schlegel und M. Meyer.** 1988: Inducible and constitutive expression of pMOL28-encoded nickel resistance in *Alcaligenes eutrophus* N9A. *J. Bacteriol.* **170**: 4188-4193.
- Smets, B. F., B. E. Rittmann und D. A. Stahl.** 1993: The specific growth rate of *Pseudomonas putida* PAW1 influences the conjugal transfer rate of the TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3430-3437.
- Smit, E., D. Venne und J. D. van Elsas.** 1993: Mobilization of a recombinant IncQ plasmid between bacteria on agar and in soil via cotransfer or retrotransfer. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2257-2263.
- Sobecky, P. A., C. L. Easter, P. D. Bear und D. R. Helinski.** 1996: Characterization of the stable maintenance properties of the *par* region of broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* **178**: 2086-2093.
- Sobecky, P. A., T. J. Mincer, M. C. Chang und D. R. Helinski.** 1997: Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain related replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 888-895.
- Sobecky, P. A., T. J. Mincer, M. C. Chang, A. Toukdarian und D. R. Helinski.** 1998: Isolation of broad-host-range replicons from marine sediment bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2822-2830.
- Solar, del G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarría, M. Espinosa und R. Díaz-Orejas.** 1998: Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 434-464.
- Solar, del G. und M Espinosa.** 2000: Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol. Microbiol.* **37**: 492-500.
- Southern, E.** 1975: Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stephens, K. M., C. Roush und E. Nester.** 1995: *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 protein requires a consensus nucleotide-binding site for function in virulence. *J. Bacteriol.* **177**: 27-36.
- Strack, B., M. Lessl, R. Calendar und E. Lanka.** 1992: A common sequence motif, -E-G-Y-A-T-A-, identified within the primase domains of plasmid-encoded I- and P-type DNA primases and the α protein of the *Escherichia coli* satellite phage P4. *J. Biol. Chem.* **267**: 13062-13072.
- Suarez, A., A. Güttler, M. Strätz, L. H. Staendner, K. N. Timmis und C. A. Guzmán.** 1997: Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. *Gene* **196**: 69-74.

- Summers, A. O.** 1986: Organization, expression, and evolution of genes for mercury resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 607-634.
- Sundin, G. W. und C. L. Bender.** 1996: Molecular analysis of closely related copper- and streptomycin-resistance plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plasmid* **35**: 98-107.
- Sundin, G. W., S. P. Kidambi, M. Ullrich und C. L. Bender.** 1996: Resistance to ultraviolet light in *Pseudomonas syringae*: sequence and functional analysis of the plasmid-encoded *rulAB* genes. *Gene* **177**: 77-81.
- Surtees, J. A. und B. E. Funnell.** 2001: The DNA binding Domains of P1 ParB and the architecture of the P1 plasmid partition complex. *J. Biol. Chem.* **276**: 12385-12394.
- Sýkora, P.** 1992: Macroevolution of plasmids: a model for plasmid speciation. *J. Theor. Biol.* **159**: 53-65.
- Szpirer, C., E. Top, M. Couturier und M. Mergeay.** 1999: Retrotransfer or gene capture: a feature of conjugative plasmids, with ecological and evolutionary significance. *Microbiol.* **145**: 3321-3329.
- Szpirer, C., M. Faelen und M. Couturier.** 2000: Interaction between the RP4 coupling protein TraG and the pBHR1 mobilization protein Mob. *Mol. Microbiol.* **37**: 1283-1292.
- Tauch, A., S. Schneiker, W. Selbitschka, A. Pühler, L. S. van Overbeek, K. Smalla, C. M. Thomas, M. J. Bailey, L. J. Forney, A. Weightman, P. Ceglowski, T. Pembroke, E. Tietze, G. Schröder, E. Lanka und J. D. van Elsas.** 2002: The complete nucleotide sequence and environmental distribution of the cryptic, conjugative, broad-host-range plasmid pIPO2 isolated from bacteria of the wheat rhizosphere. *Microbiol.* **148**: 1637-1653.
- Taylor, D.E. und J. G. Levine.** 1980: Studies of temperature-sensitive transfer and maintenance of H incompatibility group plasmids. *J. Gen. Microbiol.* **116**: 475-484.
- Thisted, T., A. K. Nielsen und K. Gerdes.** 1994: Mechanism of post-segregational killing: translation of Hok, SrnB and Pnd mRNAs of plasmids R1, F and R483 is activated by 3'-end processing. *EMBO J.* **13**: 1950-1959.
- Thomas, C. M. und C. A. Smith.** 1987: Incompatibility group P plasmids: genetics, evolution, and use in genetic manipulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 77-101.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin und D. G. Higgins.** 1997: The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- Thorsted, P. B., D. P. Macartney, P. Akhtar, A. S. Haines, N. Ali, P. Davidson, T. Stafford, M. J. Pocklington, W. Pansegrau, B. M. Wilkins, E. Lanka und C. M. Thomas.** 1998: Complete sequence of the IncP β plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. *J. Mol. Biol.* **282**: 969-990.
- Thorsted, P. B., C. M. Thomas, E. U. Poluektova und A. A. Prozorov.** 1999: Complete sequence of *Bacillus subtilis* p1414 and comparison with seven other plasmid types found in russian soil isolates of *Bacillus subtilis*. *Plasmid* **41**: 274-281.
- Thorstenson, Y. R., and P. C. Zambryski.** 1994: The essential virulence protein VirB8 localizes to the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **176**
- Top, E., M. Mergeay, D. Springael und W. Verstraete.** 1990: Gene escape model: transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2471-2479.
- Top, E., I. de Smet, W. Verstraete, R. Dijkmans und M. Mergeay.** 1994: Exogenous isolation of mobilizing plasmids from polluted soils and sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 831-839.
- Torsvik, V., R. Sorheim und J. Goksoyr.** 1996: Total bacterial diversity in soil and sediment communities: a review. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 170-178.

- Tschäpe, H.** 1994: The spread of plasmids as a function of bacterial adaptability. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**: 23-32.
- Tsuda, M. und T. Iino.** 1988: Identification and characterization of Tn4653, a transposon covering the toluene transposon Tn4651 on TOL plasmid pWW0. *Mol. Gen. Genet.* **213**: 72-77.
- Turner, L. R., J. C. Lara, D. N. Nunn und S. Lory.** 1993: Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**: 4962-4969.
- van Elsas, J. D., B. B. McSpadden Gardener, A. C. Wolters und E. Smit.** 1998: Isolation, characterization, and transfer of cryptic gene-mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 880-889.
- van Veen, J. A., L. S. van Overbeek und J. D. van Elsas.** 1997: Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 121-135.
- Venkatesan, M. M., M. B. Goldberg, D. J. Rose, E. J. Grotbeck, V. Burland und F. R. Blattner.** 2001: Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **69**: 3271-3285.
- Vergunst, A. C., B. Schrammeijer, A. den Dulk-Ras, C. M. T. de Vlaam, T. J. G. Regensburg-Tuink und P. J. J. Hooykaas.** 2000: VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* **290**: 979-982.
- Vieira, J. und J. Messing.** 1982: The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.
- Villaroel, R., R. W. Hedges, R. Maenhaut, J. Leemans, G. Engler, M. Van Montagu und J. Schell.** 1983: Heteroduplex analysis of P-plasmid evolution: the role of insertion and deletion of transposable elements. *Mol. Gen. Genet.* **189**: 390-399.
- Vogel, A. M. und A. Das.** 1992: Mutational analysis of *Agrobacterium tumefaciens virD2*: tyrosine 29 is essential for endonuclease activity. *J. Bacteriol.* **174**: 303-308.
- Vogel, J. P., H. L. Andrews, S. K. Wong und R. R. Isberg.** 1998: Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**: 873-876.
- Ward, J. E., Jr., E. M. Dale, P. J. Christie, E. W. Nester und A. N. Binns.** 1990a: Complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid *virB* genes by use of a *vir* promoter expression vector: *virB9*, *virB10*, and *virB11* are essential virulence genes. *J. Bacteriol.* **172**: 5187-5199.
- Ward, J. E., Jr., E. M. Dale, E. W. Nester und A. N. Binns.** 1990b: Identification of a VirB10 protein aggregate in the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **172**: 5200-5210.
- Waters, V. L., B. Strack, W. Pansegrau, E. Lanka und D. G. Guiney.** 1992: Mutational analysis of essential IncPα plasmid transfer genes *traF* and *traG* and involvement of *traF* in phage sensitivity. *J. Bacteriol.* **174**: 6666-6673.
- Waters, V. L.** 1999: Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Frontiers Bioscience* **4**: 416-439.
- Weidner, S., W. Arnold und A. Pühler.** 1996: Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 766-771.
- Wickham, G. S. und R. M. Atlas.** 1988: Plasmid frequency fluctuations in bacterial populations from chemically stressed soil communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2192-2196.
- Wilkins, B. M. und A. T. Thomas.** 2000: DNA-independent transport of plasmid primase protein between bacteria by the II conjugation system. *Mol. Microbiol.* **38**: 650-657.

- Williams, D. R. und C. M. Thomas.** 1992: Active partitioning of bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.* **148**: 1-16.
- Williams, D. R., D. P. Macartney und C. M. Thomas.** 1998: The partitioning activity of the RK2 central control region requires only *incC*, *korB* and KorB-binding site O_{B3} but other KorB-binding sites form destabilizing complexes in the absence of O_{B3}. *Microbiol.* **144**: 3369-3378.
- Williams, P. A. und K. Murray.** 1974: Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **120**: 416-423.
- Winans, S. C. und G. C. Walker.** 1983: Genetic localization and characterization of a pKM101-coded endonuclease. *J. Bacteriol.* **154**: 1117-1125.
- Witte, W.** 1998: Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**: 996-997.
- Wolf, Y. I., L. Aravind und E. V. Koonin.** 1999: Rickettsiae and Chlamydiae evidence of horizontal gene transfer and gene exchange. *Trends Genet.* **15**: 173-175.
- Woodgate, R. und S. G. Sedgwick.** 1992: Mutagenesis induced by bacterial UmuDC proteins and their plasmid homologues. *Mol. Microbiol.* **6**: 2213-2218.
- Wu, J. H., P. Kathir und K. Ippen-Ihler.** 1988: The product of the F plasmid transfer operon gene, *traF*, is a periplasmic protein. *J. Bacteriol.* **170**: 3633-3639.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing.** 1985: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yeo, C. C., J. M. Tham, M. W.-C. Yap und C. L. Poh.** 1997: Group II intron from *Pseudomonas alcaligenes* NCBI 9867 (P25X): entrapment in plasmid RP4 and sequence analysis. *Microbiol.* **143**: 2833-2840.
- Zatyka, M., G. Jagura-Burdzy und C. M. Thomas.** 1994: Regulation of transfer genes of promiscuous IncP α plasmid RK2: repression of TraI region transcription both by relaxosome proteins and by the Tra2 regulator TrbA. *Microbiol.* **140**: 2981-2990.
- Zatyka, M., G. Jagura-Burdzy und C. M. Thomas.** 1997: Transcriptional and translational control of the genes for the mating pair formation apparatus of promiscuous IncP plasmids. *J. Bacteriol.* **179**: 7201-7209.
- Zatyka, M. und C. M. Thomas.** 1998: Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 291-319.
- Zatyka, M., L. Bingle, A. C. Jones und C. M. Thomas.** 2001: Cooperativity between KorB and TrbA repressors of broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* **183**: 1022-1031.
- Zechner, E. L., F. de la Cruz, R. Eisenbrandt, A. M. Grahn, G. Koraimann, E. Lanka, G. Muth, W. Pansegrau, C. M. Thomas, B. M. Wilkins und M. Zatyka.** 2000: Conjugative-DNA transfer processes. In *The horizontal gene pool - bacterial plasmids and gene spread*, Seite: 87-174. Herausgeber C. M. Thomas. Amsterdam
- Zeph, L. R., M. A. Onaga und G. Stotzky.** 1988: Transduction of *Escherichia coli* by bacteriophage P1 in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1731-1737.
- Ziegelin, G., W. Pansegrau, B. Strack, D. Balzer, M. Kröger, V. Kruft und E. Lanka.** 1991: Nucleotide sequence and organization of genes flanking the transfer origin of promiscuous plasmid RP4. *DNA Sequence-J.* **1**: 303-327.
- Ziegelin, G., W. Pansegrau, R. Lurz und E. Lanka.** 1992: TraK protein of conjugative plasmid RP4 forms a specialized nucleoprotein complex with the transfer origin. *J. Biol. Chem.* **267**: 17279-17286

G. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
add.	addiere
ad	auf
Ap	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ARDRA	amplified ribosomal DNA restriction analysis
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylpyrophosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
ccc	covalently closed circular
C-terminal	Carboxy-terminaler Bereich von Proteinen
DEAE	Diethylaminoethyl
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dot	<i>defective for organelle trafficking</i>
DR	<i>direct repeat</i>
<i>dtr</i>	DNA Transfer und Replikation
DTT	Dithiothreitol
Cm	Chloramphenicol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenglykol-bis(3-Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
g	Gramm
G	Guanin
gfp	Gen für das <i>green fluorescent protein</i>
Gm	Gentamicin
h	Stunde
HGT	Horizontaler Gentransfer
hyp.	hypothetisch
ICM	<i>intracellular multiplication</i>
Inc	Inkompatibilität
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IR	<i>inverted repeat</i>
kb	Kilobasen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Km	Kanamycin
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	Milli
M	Molar
<i>mer</i>	Quecksilberresistenzgene
min	Minuten
mob	Mobilisierung
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
<i>mpf</i> /MPF	<i>mating pair formation</i>
μ	Mikro
NPT	Nitrobluetetrazolium
N-terminal	Amino-terminaler Bereich von Proteinen
Nx	Nalidixinsäure
<i>orf</i>	offenes Leseraster
ORF	Genprodukt eines offenen Leserasters
<i>oriT</i>	<i>origin of transfer</i>
<i>oriV</i>	<i>origin of replication</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Sm	Streptomycin
par	"Partitioning"
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
put	putativ
r/R	Resistenz
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
TBE	Trisborat
<i>tra</i> /Tra	Transfer
U	Unit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
vir/Vir	Virulenz
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-Galaktosid

16S-rDNA-Sequenzen ausgewählter Bodenisolat

Die Alignment der 16S-rDNA-Sequenzen wurden alle mit dem ClustalX-Programm (Version 1.81) durchgeführt. In einigen multiplen Alignments wurde nicht die gesamte 16S-rDNA-Sequenz, sondern nur die unterschiedlichen Nukleotide aufgeführt.

Bi1063 und Bi1098:

Multiples Alignment der 16S-rDNA-Sequenzen der Bodenisolat Bi1063 und Bi1098 mit der 16S-rDNA-Sequenz von *Stenotrophomonas maltophilia* HK40 (Acc-Nummer AJ01132), der nach der 16S-rDNA-Klassifizierung nicht zur *Stenotrophomonas*-Gruppe, sondern zur *Xanthomonas campestris*-Untergruppe gehört.

```

AJ011332      CCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTG
Bi1063        --TAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTG
Bi1098        CCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTG
                *****

AJ011332      GCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACCTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACT
Bi1063        GCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACCTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACT
Bi1098        GCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACCTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACT
                *****

AJ011332      TACGCTAATACCGCATAACGACCTTCGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGGA
Bi1063        TACGCTAATACCGCATAACGACCTTCGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGGA
Bi1098        TACGCTAATACCGCATAACGACCTTCGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGGA
                *****

AJ011332      TAGATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATC
Bi1063        TAGATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATC
Bi1098        TAGATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATC
                *****

AJ011332      CGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTA
Bi1063        CGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTA
Bi1098        CGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTA
                *****

AJ011332      CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCG
Bi1063        CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCG
Bi1098        CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCG
                *****

AJ011332      TGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAATCGATT
Bi1063        TGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGATT
Bi1098        TGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGATT
                *****

AJ011332      AATACTCGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
Bi1063        AATACTCGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
Bi1098        AATACTCGGTTGTTCTGACGGTACCCAAA-----
                *****

AJ011332      CCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAG
Bi1063        CCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAG
                *****

AJ011332      GTGGTTGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACT
Bi1063        GTGGTTGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACT
                *****

```

Anhang I

```
AJ011332      GGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGGAAATCCCGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGA
Bi1063        GGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGGAAATCCCGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGA
*****

AJ011332      GATCGGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCAC
Bi1063        GATCGGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCAC
*****

AJ011332      GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGA
Bi1063        GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGA
*****

AJ011332      ACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACCGGTTAAGTTCGCCGCC
Bi1063        ACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACCGGTTAAGTTCGCCGCC
*****

AJ011332      TGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG-T
Bi1063        TGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
*****

AJ011332      GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATGTCGAG
Bi1063        GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATGTCGAG
*****

AJ011332      AACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTG
Bi1063        AACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTG
*****
```

Bi251, Bi1436 und Bi1506:

Alignment der 16S-rDNA-Sequenzen der Bodenisolat Bi251, Bi1436 und Bi1506 mit der 16S-rDNA-Sequenz von *Pseudomonas* sp. (Acc.-Nummer PSPS3x12). Die 16S-rDNA Sequenzen der drei Bodenisolat sind zu 100 % identisch, deshalb ist im Alignment nur die Sequenz von Bi251 aufgeführt.

```
Bi251          TTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGT
PSPS3x12      TTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGT
*****

Bi251          CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
PSPS3x12      CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
*****

Bi251          CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAA
PSPS3x12      CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAA
*****

Bi251          AGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTACCTAATACGTAAGTGTTTTGACGTTACCGA
PSPS3x12      AGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTACCTAATACGTAAGTGTTTTGACGTT-----
*****
```

Anhang I

Bi113 und Bi156:

Alignment der 16S-rDNA-Sequenzen der Bodenisolat Bi113 und Bi156 mit der 16S-rDNA-Sequenz von *Pseudomonas* PSB (Acc.-Nummer AF105380). Die 16S-rDNA-Sequenzen von Bi113 und Bi156 sind bis auf wenige Nukleotide identisch. Im Alignment ist nur die Sequenz von Bi113 aufgeführt. Sequenzunterschiede der 16S-rDNA-Sequenz von Bi156 sind im Alignment angegeben.

```
AF105380      -----AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
Bi113         ATGGCGGCCGCGGGAATTCGATT---GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
Bi156                                     CTG
                                     * ** *** *****

AF105380      TGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGCGGACGGGTGAGTA
Bi113         TGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGCGGACGGGTGAGTA
*****

AF105380      ATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCA
Bi113         ATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCA
*****

AF105380      TACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGT
Bi113         TACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGT
Bi156         -
*****

AF105380      CGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAG
Bi113         CGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAG
*****

AF105380      AGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
Bi113         AGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
*****

AF105380      GGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC
Bi113         GGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC
*****

AF105380      TTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTT
Bi113         TTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTT
*****

AF105380      TGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGA
Bi113         TGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGA
*****

AF105380      GGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTGTAAAGTT
Bi113         GGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTTGTAAAGTT
Bi156                                     G
*****

AF105380      GGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACAAGCTAGAGTAT
Bi113         GGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACAAGCTATAGTAT
Bi156                                     G
*****

AF105380      GGTAGAGGGTGGTGGGAATTCCTGTGT
Bi113         GGTAGAGGGTGGTGGGAATTCCTGTGT
*****
```


Anhang I

Bi860 und Bi1141:

Alignment der 16S-rDNA-Sequenzen der Bodenisolat Bi860 und Bi1141 mit der 16S-rDNA-Sequenz eines nicht klassifizierten *Pseudomonas*-Stammes (Acc.-Nummer PSPS1x10). Von der 16S-rDNA-Sequenz des Bodenisolates Bi1141 sind nur die Sequenzunterschiede angegeben.

```
PSPS1x10 -----TACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAG
Bi860      GCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAG
Bi1141                                           T
                                           ***** **

PSPS1x10 ATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGT
Bi860      ATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGT
                                           *****

PSPS1x10 AACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
Bi860      AACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
Bi1141                                           G
                                           *****

PSPS1x10 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT
Bi860      GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT
                                           *****

PSPS1x10 GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAAT
Bi860      GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAAT
Bi1141                                           G      T
                                           ***** ***

PSPS1x10 ACGTTAGTGTTTTGACGTT
Bi860      ACGTTASTGTTTTGACGTT
Bi1141      GC
                                           *****
```

Bi709:

Das Alignment der 16S-rDNA-Sequenz des Bodenisolates Bi709 mit der 16S-rDNA-Sequenz von *Pseudomonas putida* ATCC17522 (Acc.-Nummer D85995).

```
D85995 ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGA
Bi709 -----GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGA
                                           *****

D85995 TCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCC
Bi709 TCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCC
                                           *****

D85995 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCG
Bi709 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCG
                                           *****

D85995 CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAA
Bi709 CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAAC
                                           *****

D85995 TTAATACTCTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC
Bi709 TTAATACGTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC
                                           *****
```

Anhang I

```
D85995      AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGT
Bi709      AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGT
*****

D85995      AGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAA
Bi709      AGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAA
*****

D85995      CTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
Bi709      CTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAKCGGTGAAATGCGTA
*****

D85995      GATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGT
Bi709      GATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGT
*****

D85995      GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGT
Bi709      GCGAAAGCGTGGGGAGCAGACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGT
*****

D85995      CAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGC
Bi709      CAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGC
*****

D85995      CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
Bi709      CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
*****

D85995      TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCCTTGACATCCAAT
Bi709      TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCCTTGACATCCAAT
*****

D85995      GAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC
Bi709      GAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC
*****
```

O118, Bi144, Bi161, Bi165, Bi271 und Bi1590:

Alignment der 16S-rDNA-Sequenzen der Bodenisolat O118, Bi144, Bi161, Bi165, Bi271 und Bi1590 mit der 16S-rDNA-Sequenz des Stammes SMK735 aus der *Paracoccus aminophilus* Untergruppe. Die Sequenzen von Bi144, Bi161, Bi165, Bi271 und Bi1590 sind zu 100 % identisch, als Beispiel wurde nur die Sequenz von Bi271 in das Alignment mit einbezogen. Die 16S-rDNA-Sequenz von O118 weicht an zwei Positionen von den 16S-rDNA-Sequenzen der übrigen oben genannten Bodenisolaten ab.

```
O118      -----
Bi271      TACGCCCTACGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGGATTAGCCCGCGTTGGATTAGGTAGTT
SMK735      -----TACGGGG-AAAGATTTATCGGAGAAGGATTAGTCCCGCGTTGGATTAGGTAGTT
*****

O118      -GTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCTACGATCCATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGGCC
Bi271      GGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCTACGATCCATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAG-CC
SMK735      GGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCTACGATCCATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAG-CC
*****

O118      ACACGTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGA
Bi271      ACAC-TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGA
SMK735      ACAC-TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGA
*****
```

Anhang I

```
O118          CAATGGGGGAAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAA
Bi271         CAATGGGGGAAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAA
SMK735        CAATGGGGGAAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGG-----
*****
```

Amplifikat von O111 mit dem IncQ-spezifischen *oriV*-Primerpaar

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *orf1* zeigt Übereinstimmungen zu Sensor-Histidin-Kinasen.

```
orf1 →
GAATTCGATATCGACCGAGACAGGCCCTGCGCCTGGCGCTGAGCCTGCATGAGCTGGGTA      60
  I R Y R P R Q A L R L A L S L H E L G
CCAATGCCGCGAAATATGGCGCGCTCTCGGTTCTGCGGGTCAGGTGCGCCTGTCTTGGTA    120
  T N A A K Y G A L S V P A G Q V R L S W
CTTGCGAGGCGGAGGTGTTGTCGCTCAGATGGGAAGAACGCGGCGGTCTGCGGTCTACC    180
  T C E A E V L S L R W E E R G G P A V Y
CGCCTGAGCGCACAGGTTTTGGCACACCCTGATCCGCGCTAGCGCCGGCGGCGAGAATG     240
  P P E R T G F G T T L I R A S A G G E N
ACGGCGTCACGGTCGATTGGTGCGTTGCGGGCGTGATCTGGACCATTACCCTGCCGGTAG    300
  D G V T V D W C V A G V I W T I T L P V
GCGTTGCGCAGCCAAAGGAACCAGAGCCTGCACGTCAGATCGAGCAGGTCGCTACCCAGA    360
  D G V T V D W C V A G V I W T I T L P V
CCGGTGCACCTGAACTAGACGGTTTACGCGTTCTGGTGATCGAGGACGAGCCCTTGGTTG    420
  T G R P E L D G S R V L V I E D E P L V
CGCTGGACATCAGCCACGAACTTAAGGCTGCAGGGCCTGTCTCGGTCGATAATCACTAGT   480
  A L D I S H E L K A A G P V S V D N H *
GAATTC                                                                486
```

Sequenzen von pBI860

Kontig-Sequenz 860A

Diese Kontig-Sequenz besteht aus den Einzelsequenzen pPST1610 rev, pPST105 uni und p860H13 rev. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.

merA →

GCCGTCATCGGCTCGTCGGTGGTGGCGCTGGAAGCTGGCGCAAGCCTTCGCCCGGCTGGGT 60
 A V I G S S V V A L E L A Q A F A R L G

AGCCAGGTCACGAKCCTTGCGCGCAGCAGCTGTTCTTCCGCGAAGACCCTGCCATCGGC 120
 S Q V T X L A R S T L F F R E D P A I G

GAGGCCGTCACAGCCGCTTCCGTCGCCGAAGGAATCAAGGTAAGTGGAAACATACGCAAGCC 180
 E A V T A A F R A E G I K V L E H T Q A

AGCCAAGTCGCCCATGTGGACGGCGAATTCGTGCTGACCACTGGACAGGGCGAAGTGGCG 240
 S Q V A H V D G E F V L T T G Q G E V R

GCCGACAAGCTGCTGGTGCACCCGGCCGGACACCGAACACGCGCAGCCTGGCATTGGAA 300
 A D K L L V A T G R T P N T R S L A L E

GCGGCGGGGGTAGCCGTCATGCGCAGGGGGCCATCGTCATCGACAAGGGCATGCGCACC 360
 A A G V A V N A Q G A I V I D K G M R T

AGTAGCCCGAACATCTACGCGGCCGGCGACTGCACCGACCAGCCGAGTTCGTCTATGTG 420
 S S P N I Y A A G D C T D Q P Q F V Y V

GCGGCAGCGGCCGGCACTCGTGCGGCCATTAACATGACCGGCGGCGACGCAACGCTCGAT 480
 A A A A G T R A A I N M T G G D A T L D

CTCGACGCTATGCCGGCAGTCGTGTTCACTGATCCGCAAGTTGCCACGGTTGGCTACAGT 540
 L D A M P A V V F T D P Q V A T V G Y S

GAAGCAGAAGCCCAGCGCATCGGCCTGCAAACCGACAGTCGTACTCTCACGCTCGACAAT 600
 E A E A Q R I G L Q T D S R T L T L D N

GTGCCGCTGCACTCGCCAACTTCGACACGCGCGGCTTTATCAAGCTTGTCGCTGAGGCT 660
 V P R A L A N F D T R G F I K L V A E A

GGATCTGRACGCATTCTTGGGGTTCAGGCTGTAACACCGGAAGCAGGCGAGATCATCCAG 720
 G S X R I L G V Q A V T P E A G E I I Q

ACTGCCGCGATTGCCATCCGGGCTCGCATGACCGTCCAGGATCTTGCCCAACCAACTTTT 780
 T A A I A I R A R M T V Q D L A Q P T F

TCACCCTACCTACCATGGTGGAAAGGTCTCAAAGTGGTGGCACAGACTTTCTCGAAGGAT 840
 S P Y L T M V E G L K L V A Q T F S K D

GTGACACAGCTATCGTGTGTGCGGGCTAAACCAAGGACACGAAAAGAGCGACAGAGGAG 900
 V T Q L S C C A G *

merG →

TTTTTATGTTTTGCGATATTAGACTAACAGCACGTTGCACCCGTGCATGCTTAACCATTC 960
 M F C D I R L T A R C T R A C L T I

TGTTGGCGGGTACTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGAAAAANGTTNC 1020
 L L A G T A G R L *

TTAA 1024

Anhang II

Kontig-Sequenz 860B

Diese Kontig-Sequenz besteht aus den Einzelsequenzen p860H2 uni/rev und pSHP105 I-2. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Gegenstranges ist über der DNA-Sequenz dargestellt.

```
GGCGAGCACGCGCGCTTCATCACAGTGAGCGCCGTCATCGAGCCTCAACAGCCCCGGCCAC      60
TTCTTCGAGGCTAAAGCCCAGCCGTTGCGCGGACTTTACGAATTTACCCGGGCGACATC      120
GGGGGTTGGGGAGCAATGGAAGTGAACCAACGTAAGCCGAATTAGAGTTCGTTTTACT      180
CGTCAGCGACTGCGAATTAACGAACTTTGATTCGTGAGAAAGGTTTATTGCACTGATTTT      240
CGGGTGTGGTGACCTTTCCCTCGCGATANCGGAAACGGTTTCATAAAACGGTCGTTTTTC      300
GAAACTATCCAGACGTTGCAAGGGTTTGCGGGGCAGCGACTGAGCTTAAGTGCACCTTCT      360
GTTCCGTTGCTCCCCCAACCCCTATTTCCAGCAGCGAGGTGATGAATTCGTTTTGCTGTT      420
GTGCGGCGGCGACAAAAGCAGCCAAAGCCGTGATATTGAAGCGGCTAAAAAACTCGCCAG      480
CGAGTGGAGGTCAGAATGAGCGAAAAAATTTACGACTACGACCCAGCAGCAGCCCTAGAC      540
GGCCCTGAAGCAATCGCCGCTTTCATGGCGGAGCCCTGCCATTTCTCTCAGCGCCATAA      600
TCCAGGACCTTCATCTCCTCTNTCCTTGATTCCGTACTTAACTACGGAGGTAGAGTTGAA      660
TCGTGGATCGAAAACCCGAGAGGAGATCGCCGTTATGAAACACCTAAGACTGCTGCTGGT      720
AGTGGGTGCGATTCTGCTGTTCATCCACCGTATGGGCCGAGGGCGGGAGCGACCGAGCGAT      780
TGAGCGAATTGCTGCACGCGAGAGGGCTGAAGCGACCCTGGTGGCGGAAACCGTCAAGGA      840
GATTAAGCAACTGGGCCCCACGGCGGCAGGCCGTAGCGAAGCGCAGCCCGCCTGTCCGCC      900
TGCAAAGTAGAGCCTGTGCTACTCGACCAGATGCAACGTGAGCCCACTCTGCTGAGGCGC      960
GAGGGCAAATAGCAATACCAAATGTGCCCTTTGCAAGTGCTCCTTTGGCCATTCAGCGG      1020

                                                                 *   A   V
CGCTCATTGAGCGCCGCTTTTTTTCTAAGCGCAAGCCGACCAACAGGGGCGCCTTACGCAA      1080

  P   F   G   R   N   V   G   S   N   D   G   H   L   S   V   I   L   P   C   S
CGGGAAATCCTCGGTTAACGCCCCGAGTTGTCCCCATGCAGCGAAACGATCAGCGGACAGG      1140

  V   T   G   H   S   A   C   C   D   H   V   L   Q   E   L   V   S   E   I   R
AAACAGTCCCCTGGCTCGCACAAACAGTCGTGAACCAGTTGCTCCAAAACACTGACTCGATCC      1200

                                     ← merR
  R   L   D   A   L   K   G   R   V   D   G   L   K
GTCGCAGATCCGCGAGCTTGCCACGCACATCCCCAAGCTT      1240
```

Kontig-Sequenz 860C

Diese Kontig-Sequenz besteht aus den Einzelsequenzen pSPH105 rev und p860H11 rev und ist zu 99% identisch zu dem DNA-Bereich 3129-4241 bp von Tn5041 (Acc.-Nummer X98999).

```
GCATGCTGCTGGAGCTGGGTTGGCTCATCGCGTGCAGGCGTCCGCCCTGTAGACCAAGC      60
CCTCGACACTGGTGTGTATGCGGTGACGCCGCGGAAGCTTTCGGGAAGCAGTCGCGAAT      120
CGCCGTAATGACAGCAGGCGTGCAGGGAAGACATCGCCTACTTTGATTTAGTGTCCA      180
GGAAACGGGTCTTTACGGCGCCCGGAGCTTGGAGTAATTGTCTCGGCCCTGGCCGAGCC      240
CGACTCGAATCGGCCTATGACTCCGTGGGCCCATTTCTCCGAGTAGCCATTTCTGTACT      300
GCTGGACTGGCCTTTGCGAAAATCACGGTTGAAGTAGAAAATTTGATTTGAGGATGCTCAG      360
GCTGCTGCCTTCGATGAATCCCTCGCCTTTTTCTCGGGCGCCATTGCAGCCTGCGCACG      420
GCTGATGCTCAAGACGATCTGAGAAAGTCCCAACAGGGCCTTGTGTTTCATAAACGCTCT      480
TGATGTTTTGGCAGATTTTTTATTGTGCGGTTGTGTATATGCCGAAGCGCGCCGGGCATA      540
GCCGGGTGCGCTTCTTACATACTTCCACATGCAAAAATAACGTCAGGGTGACGTGAAAAT      600
ACTTTCCGTCAGCAACAGTCAACAATGCTCAGTGGCTGGCTCCTGCAATCCGTTCCCTGA      660
TACGCGTACTCCAGAATATGCAGGTTTCCGCTCGAATCCTCGTAGGTCATTTGCGCAGG      720
CATCACATCGCAGTTGCCATTGGTCGACGTGACGTGAATGACCTTGGCGATGTCGAGCTT      780
CATGCCATAGCGGTAGTGAGTGACTTCTGGCGGGTTCTTGCCCTTGGGCGCTAGCGTATTC      840
GCGCATGGGATTTGCTCCGTTGGGCTGGGATCATCTTACCGTACAGGCGATCGGAACTG      900
CCATCGGCCCATACGGTGGATGACAGCAGAGTCGCACTCACTATCAGCAGCAGTCTTAGG      960
TGTTTCATAACGGCGATCTCCTCTCGGGTTTTTCGATCCACGATTCAACTCTACCTCCGTA      1020
GTTAAGTACGGAATCAAGGAGGGAGGAGATGAAGGTCCTGGTTTTATGGCGCCGAGATAAG      1080
ATGGGTAGGGCTTAAGTACACTTTTCGTCGGGT      1112
```

Anhang II

Kontig-Sequenz 860 D

Diese Kontig-Sequenz besteht aus den Einzelsequenzen pSPH105 uni und p860H13 uni. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz und die des Gegenstranges ist über der DNA-Sequenz dargestellt.

```
S V R E E D C H A G D D L R L L G A V E
GGCGACACACGCTCTTCATCGCAGTGAGCACCGTCATCCAGCCTCAACAGCCCGGCCACT 60

D L S F G L R Q A S K V F K V R A V D A
TCATCGAGGCTAAAGCCCAGCCGTTGCGCGGATTTAACGAATTTACCCGGGCGACATCC 120

E G Y R R I S G Y P K D P E P L L A K R
GCCTCACCGTAACGGCGAATGCTGCCGTAGGGCTTGTCCGGTTCCGGTAACAGCGCCTTG 180

Q Y F R I T E V N V G A A K A F A G I T
CGTTGATAGAACCGGATGGTTTTCCACGTTGACCCCGCCGCTTGGCGAAAGCGCCAATG 240

      ← merR
L S E L N N K M
GTCAGGCTTTCCAAATTGTTTTTCATACCGCTTGATTCCGTACATGACTACGGGACTAAC 300

                                merT →
CTTAAACCATCGATCAAATGCTCGAAAGGAGAAATGCATGTCTGAACCATCAAACGGGCG 360
                                M S E P S N G

CGCCCCTCTTGTCGCCGGGGGGCTTGC GGCGATTCTCGCCTCGGCTTGCTGCCTGGGGCC 420
R A P L V A G G L A A I L A S A C C L G

GCTGGTTCTGATCGCCCTGGGGTTCAGCGGCGCTTGGATCGGCAACTTGACGGTGTGGGA 480
P L V L I A L G F S G A W I G N L T V L

ACTTATCGCCCCGATCTTCATCGGCGCGGCGCTGGTTGCACTGTTCTTTGCCTGGCGGCG 540
E P Y R P I F I G A A L V A L F F A W R

CATCGTCCGACCGACCGCAGCCTGCAAGCCGGGCGAGGTGTGCGCGATTCCGCAAGTGCG 600
R I V R P T A A C K P G E V C A I P Q V

CACCACCTACAAGCTCATTTTTCTGGTTCGTCGCCGTGTTGGTCTTGGTTCGCGCTTTGGTT 660
R T T Y K L I F W F V A V L V L V A L W

                                merP →
TTCCCTACGTCATGCCATTTTTCTACTAACCAGGAGTTCATCATGAAAAAACTGTTTGCC 720
F S L R H A I F L L T R S S S *
                                M K K L F A

TCCCTCGCTCTCGCCGCTTTTCGTTGCCCGCGTTCGCCGCCACCCAGACCGTCACGCTG 780
S L A L A A F V A P V F A A T Q T V T L

TCGNTACCGGCATGACCTGCTCCACCTGCCCGATCACCGTCAAGAAGGCGATTCCAAG 840
S X P G M T C S T C P I T V K K A I S K

GTCGAAGGCGTCAGCAAAGTTAACGTGACCTTCGAGACACGCGAAGCGGTTGTCACCTTC 900
V E G V S K V N V T F E T R E A V V T F

GATGATGCCAAGACCAGCGTGCAGAAGCTGACCAAGGCCACCGAAGACGCAGGCTATCCG 960
D D A K T S V Q K L T K A T E D A G Y P

TCCAGCGTCAAGAAGTGAGGCACTGAAAACGGCAGCGCAGCACATCTGACGCCCTTGTCT 1020
S S V K K *

                                merA →
GCTACCACAAACGAAAAAGGATCTGTGCGATGACCCATCTAAAAATCACCGGCATGACCT 1080
                                M T H L K I T G M T

GCGACTCGTGC GCGGCACGTCAAGGAAGCGCTGGAAAAAGTACCCGGCGTCCAATCTG 1140
C D S C A A H V K E A L E K V P G V Q S

CCATAGTGTCTATGCCAAGGGCGCGGCCAGCTCGCCCTTGATCCAGGCACAGCGCCGG 1200
A I V S Y A K G A A Q L A L D P G T A P
```

Anhang II

ACGCACTGACCGCCGCCGTGGCTGGCCTGGGCTACAAAGCGATGCTCGCCGATGCCCCGC	1260
D A L T A A V A G L G Y K A M L A D A P	
CGACCGACAACCGCACTGGGCTGTTTCGACAAGGTGCGCGGCTGGATGGGTGCCGCCGACA	1320
P T D N R T G L F D K V R G W M G A A D	
AGGGCAGCGGCGGCGAGCGCCCGTTGCAAGTCGCCGTGATCGGCAGCGGTGGAGCCGCGA	1380
K G S G G E R P L Q V A V I G S G G A A	
TGGCGGCAGCACTGAAGGCCGTGAGCAAGGCGCGCAGGTCACGCTGATTGAGCGCGGCA	1440
M A A A L K A V E Q G A Q V T L I E R G	
CCATCGGCGGCACCTGCGTCAACGTGCGTTGTGTGCCGTCCAAGATCATGATCCGCGCCG	1500
T I G G T C V N V G C V P S K I M I R A	
CCCANATCGCCCATCTGCGCCGGGAAAGCCATTCGACGGCGGCATGCAAGCTT	1554
A X I A H L R R E S P F D G G M Q A	

Sequenz PST1610 uni

Die Sequenz stammt vom Insert des Hybridplasmides pPST1610 und ist zu 97 % identisch zu dem DNA-Bereich 2035-2726 bp von *Tn5041*.

CTGCAGGCCGCGAGGAACAACGCCTGGTGCAGGGACCATGATCGTCTAGAGAGCACCCCTGC	60
TCACGACGCAAGCGACGCTCGCGCAGAGTNAGATTGCGCATGAACACGTCTTACTTCAAT	120
TCACCGACTTGCAACAGTCGCATCAGGCACTGGAGCAGCGCCATGGCCAAGGTGAGCAGC	180
GTTTGGCTGAGACGCGGACTTACCTGGCCGTCAATGAACGGGAGCGAAGCCTGCTGGCGG	240
AACGCTTAAGCCAAACTGAAAGCCAATTGAGCCAGTTGGCCACAGAAAAGCAGCTTCTCG	300
TGCAAGACAACGCGGTGCTGTCAAGCCAGCTCGCAGAGTCCAGAGCGATGAAGCCGAAGA	360
CTTGTGACCGAAAAAGGCGCCTACCTCAGGCGCCTGAAACCATCCTCCAAACCAAAGGA	420
GCCAAACAGGAGGACAGTGGAGCAATCAACTCTTCAATACACAGCCTGGCTGGAAACCAA	480
GGTCGTAGATGAGGAGAGTCGGCATGCGTAACGCCATTACCTACACCGTCTTGCTACCTT	540
NATAGCCCTTGGAAGTGTGGCACNNGGATTTGCCGAACAGGCCAAAACCCCGCCCAAAA	600
GCAATGCCCGAGACAAATNANGGTGAGGACATGCACATGATGGACNGCAACCATATGCCG	660
ATGATGGCATCNNGAAATGTCCAAGATGATGAAAAACTGC	700

Sequenz 860H11 uni

Die Sequenz stammt vom Insert des Hybridplasmides p860H11 und ist zu 99 % identisch zu dem DNA-Bereich 4730-5282 bp von *Tn5041*.

KTKGGATGTGCGTGGCAAGCTCGCGGATCTGCGACGGATCGAGTCTGTTTTGGTGCAACT	60
GGTTCACGACTGTTGTGCGAGCCACGGGACCGTTTCTGTCCGCTAATCGTTTCGCTGCA	120
TGGGTAAAACGCTCTGCGTTGGCCAGTGGTTGTGAAGGGAACCAGCGGACAAGGTCTACG	180
GCTGCCGCGGCTGTGAAGCGCACCGGTCACCGCCGACAAACCGGCTCAACTGATCGAAAA	240
GAGCATGGCCAGTCTTAGCGTCTGGCGATGCTGTTGATCACC AAATACGTCGATGGTCT	300
GCCGCTGCACCGCTTCAAAAAAATCCTCGGTCGTACGGCGTCGATATCCCCGCAAAC	360
CCTGGCGCGTGGGTGATCCAGTGCGGCGAGCACCTGCAACCGCTGCTGAATCTGTCTAC	420
GAAAACAGCCCGCGTGCCGCGTCGGCSAAGGCCGTATTGCGGTGCAAACAGCGATACG	480
CGTTGGTGCTCGGACGGCTTTGAGTTCCGCTGCGAGGACGGAGCCAAATTGAGCGTAACC	540
TTCGCCCTGGAC	552

Sequenzen von pBI709

Im Folgenden wird die DNA-Sequenz der in Abb. 21 (Seite 128) gezeigten Region von pBI709 aufgeführt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Hinstranges sind unter der DNA-Sequenz, die des Gegenstranges über der DNA-Sequenz dargestellt.

Die Transferregion

TGCCTTCGACAAGGATTTCAAAGGCTACGTCGAGGCTACGGCTGTGCATCTTGGACTTGT	60
TGCGGATCCGCTCGAAGTCTTCGAGCGGTATCCGTAGATCCCTGGTCAATGGTGCGGCCA	120
* E T P K W Q E A I Q Q R A K E L E Q T	
GTCATTCTGTTGGCTTCCACTGTTTCAGCGATTTGTTGCCGGGCTTTTTCCAGCTCCTGGG	180
L Y E K E A E L A K V Q E A L V A N Q E	
TGAGATATTCCTTTTCGGCTTCCAGGGCTTTTACCTGCTCGGCCAGGACGGCGTTTTGTT	240
K L V N L E T G E D T N A A P K A T K T	
CTTTTCAGCACGTTGAGTTCTGTGCCTTCGTCCGTGTTGGCGGCAGGCTTAGCGGTCTTGG	300
K S G P K I R L A K T T R L Q T R V E N	
TTTTGCTACCGGGTTTGATCCTCAGTGCCTTTGTGGTGCGAAGCTGGGTGCGGACTTCGT	360
R L N L D P D E E A R Q V L E V A A A Q	
TGCGCAAGTTGAGGTCGGGGTCTTCTTCGGCCCGCTGCACCAGCTCGACCCTGCGGCCT	420
D L R E L R A L D N V V S I D A T V G N	
GGTCAAGCCGTTCAAGGCGGGCCAGGTCATTGACCACGGAAATATCGGCAGTGACCCCGT	480
Q V A T R S A G P Q E V A D L Y A L R E	
TCTGTACGGCTGTGCGGCTCGCGCCTGGCTGCTTACCGCATCAAGATAGGCGAGGCGTT	540
A V W S V S K K W E D A V A Q L T G L E	
CAGCAACCCAACTGACGCTCTTTTTCCACTCGTCAGCGACGGCTGCAGGGTGCCCAATT	600
E K D G K L A L A V E L Q T L N E R Q V	
CCTCTTTGTCTCCTTTGAGAGCAAGGGCTACCTCAAGCTGTGTCAGGTTCTCGCGCTGTA	660
N E A R Q I R K A Q A D T L D R V V A E	
CGTTTTTCAGCGCGTTGAATCCGTTTTCGCTTGGGCGTCAGTAAGGTCGCGCACAAACGGCTT	720
L L L G K L A C S R Q R R E G A V M L Y	
CAAGCAGAAGGCCTTTGAGCGCGCATGAACGCTGCCGACGTTACCGGCTACCATCAGAT	780
K F G S E P N P H P R L I A P E A Q G N	
ATTTGAAGCCGCTTTCAGGATTTGGATGAGGGCGAAGGATGGCAGGCTCTGCCTGACCGT	840
Q E I D D G L E M L S E Q T F G P N Q K	
TCTGCTCAATGTCGTCGCCCAGCTCCATCAGCGACTCTTGAGTAAAGCCCGGATTCTGTT	900
G R I Q P K C E V E G P N V K I I R E G	
TCCCCGGATCTGTGGCTTGCACTCAACTTCACCAGGGTTGACCTTGATGATGCGCTCGC	960
E Q V A K Q K Q F D S L K N V A G G F A	
CTTCCTGAACGGCTTTCTGCTTTTTGGAAGTCAGACAGCTTGTGACTGCTCCCCGAATG	1020
N P K K I T T M ← <i>parB</i> * V L D K V F T A	
CGTTCGGTTTTCTTTATCGTAGT <u>CAT</u> GGGATCTCCCTCAAGCCGTGAAAACCTTATCGAGA	1080
A K C A R K M E K G A E R Q S G S R A K	
ACAGCCTTGCAGGCCCGTTTTCAATTTCTTTCCCGGCTTCGCGCTGGCTACCCTGCGAGCT	1140
W W V P N G A A L A K N I C P R Y I I Q	
TTCCACCAGACGGGATTGCCTGCGGCCAAGGCTTTGTTGATGCAGGGCCGGTAAATGATT	1200
E A F M S D G Y A E R L G P L A D I E E	
TGTTACGCAAACATCGAGTCCCCGTAGGCTTCGCGCAAACCGGGGAGGGCATCAATTTCT	1260
P S R S N V L N P L Y G L F K L E P N Y	
TCTGGTGATCGGCTGTTGACCAGGTTTCGGCAAGTAACCCAAGAACTTCAGTTCCGGGTTG	1320

Anhang III

R D Q V T E I T N M L K P L R A L T F A
 TACCGATCCTGCACAGTCTCGATGGTGTTCATCAGTTTTCGGCAGCCGAGCCAAGGTGAAA 1380
 S I N F P A V V A D S A T L A A V M R R
 GCACTGATATTGAAGGGGGCGACCACCGCTCAGAAGCCGTCAGAGCGGGCACCATACGA 1440
 Q L N P P T D I M C L D F D G A F R E L
 CGCTGCAGGTTGGGTGGGGTGTTCGATCATGCACAGGTCAAAATCACCGGCAAAGCGTTCG 1500
 A P R L Q H I V D L P M D D V D L L P V
 AGGGCAGGCCGCAACTGGTGAATTACATCAAGAGGCATATCGTCCACATCGAGCAGCGGT 1560
 D A E I L W T N P G V Q R P Q Y G D H D
 ACGTCTGCTTCGATCAACCAAGTGTTAGGACCAACCTGGCGCGGCTGATAACCGTCATGA 1620
 G T F L Q S S M L Y P T E D G D E L A A
 TCGCCGGTGAACAGTTGACTGGACATGAGGTAGGGCGTTTTCATCACCGTCCTCTAGAGCG 1680
 F F Q S L D G E D L D V V L V R K G E E
 GCAAAGAAGTGCACAGGTGCCTTCATCGAGGTGCACAACCAGCACACGCTTCCCTTCT 1740
 A A Y A T L H C E V T T K G V G G K Q N
 TCGGCTGCATAGGCGGTCAAGTGACACTCCACGGTGGTCTTGCCTACACCGCCTTCTGA 1800
 A V T I I K M H D G A P G I T S C P A L
 TTCGCTACAGTGATGATCTTCATGTGATCTCCGGCTGGTCCGATAGTGGAAACATGGGGCA 1860
 T C A T F G E T L G Y Y P N V K N K E C
 AGTGTGCAGGCGGTAAACCTTCAGTCAACCCATAATAAGGGTTTACTTTGTTTTTCTCG 1920
 A L F L R A F R R K E C A I F G Q N A A
 CACGCGAGAAAAGGCGGGCAAACCGGCGTTTCTCGCACGCGATAAAGCCCTGATTGGCT 1980
 L I R A V G S G P L A P D T E K R A R Q
 GCTAGAATTCGCGCCACGCCGCTCCCTGGTAGCGCGGGGTCAGTTTTCTTGC GCGCTCTT 2040
 V A L P K D P A A G P W A R D G K R D S
 TGGACGGCCAGGGGCTTGTCCGGGGCGGCTCCCGCCAAGCCCTGTCCCCCTTCCTATCA 2100
 G S T L A E E T T F L I I N T R D C A R
 CTACCGCTCGTCAGAGCTTCCCTCCGTAGTGAACAAAATAATATTCGTGCGGTCACACGCG 2160
 A P K N V ← *parA*
 CGGGCTGGTTTTATTCACTCCCTTCCCTTTCTTTACGCGTGGCATGGAGCCATCACACACGC 2220
 GCTGAGCGGTAACATGGAAAACCGTTTTGAAACTCAATCACTTATGCGGAATTCAGTGGT 2280
 ATCGAGCTTTGTTTTCGAGGTTTTGCCGTGCCTGTTATAGCGAACGGATCCAAAAATAAAA 2340
 CCAACGAAATGTTGATTTTCGTGAAATGAAATGTCTAAAGTGAGCCACGAAATACGGAAAA 2400
 CATCTTACGAAACTCGAAAGAGGGAAGAAAGGCGAGGTGGGATCTAGAAGAAAATCCTCG 2460
 V G S R R K S S
 ACAGCTCCAGTATCCGCTCTGTTTTTAGCGACCAGCTATCCAGAGGACATGATGCAGAGC 2520
 T A P V S A L F L A T S Y P E D M M Q S
 CTAGATAAGAAAGAACTGACGGTTTTTCGCCTTCGCTCAACCTGACTATCGAGTTCACTTA 2580
 L D K K E L T V F A F A Q P D Y R V H L
 AAAGAACTAATTCAGAGCGATGGGAGGAAATGGATATTAATCATTGAAAGTCCATCTACT 2640
 K E L I Q S D G R K W I L I I E S P S T
 GGACAGATGTTACCGTAGTAAGTGCCTTAGGGAAGACCAGACTATTTAAGAACGCCGAT 2700
 G Q M F T V V T A L G K T R L F K N A D
 ACTGCTATCGACTTCATAAAGGAAACCTGCCCTAACCAACCCAAATAACGCAATAACTGTA 2760
 T A I D F I K E T C P N N P N N A I T V
 ACGTACGGGGTTCCTCCGTCATGACATAGATGAGGCAAAGGTATGCATCTCGAATCTGGG 2820
 T Y G V P P S * M H L E S G
 AAAATGGTTTTGTCATGAAGCAAAAAGCAACAAGCCTTCCCTGGGCCACCCGGCTACAACAG 2880
 K M V C H E A K S N K P S W A T R L Q Q

Anhang III

AGTAAGGCTGTAACCTCCCTCCGTAATCTGTTAGCGCAAAAAAAGCGAGCCATGCGTCT 2940
 S K A V T S L R N L L A Q K K A S H A S
 CTTATGCGCAAGGACTGGACAGCGAGAGCTGAAAAGACTTTGCTCATTGGGTCGCTGATC 3000
 L M R K D W T A R A E K T L L I G S L I
 TCCATCAGCCTCTTACCCGAAGTTGCCAACGGCGCTAAACTTCAGTTCCCTTACGAAT 3060
 S I S L L P E V A N A A L N F S S L T N
 CTGGCTAAAGATATTGTCAGCTTCCCTGATCTTCGACATTGGTTACTACCTCGGCATTCTG 3120
 L A K D I V S F L I F D I G Y Y L G I L
 GCCATCGTGATCACTGGTTACAAAGCCAAATCCGGGCATATTTCTGGGGGGCTTTTGGC 3180
 A I V I T G Y K A K S G H I S W G A F G
 TGGGCGGTGCGGGTATCTTCTGGTGTCTTCGCACCGAACATCGTTACCGAGATCAAG 3240
 W A V A G I F L V F F A P N I V T E I K
 AACGGCGCGGCGAACTCGCTATGACTACAGGCGAGCACAAACCCGATGAAGGGGAGGTGC 3300
 N G A A N S L *
 M T T G E H K P D E G E V
 TCGTCGTTGCGATGGCCCCGCCATCCATGGTCGGCGCCTTCACGATGTCGAGCGTACTCA 3360
 L V V A M A R P S M V G A F T M S S V L
 TAAGCATCTTTGCACCGCTCATAGCTGCACTGCTGATTCGTTTCGCTATGGCCAGTTGCAT 3420
 I S I F A P L I A A L L I R S L W P V A
 TAATACCTGTTCTGTTTGGCGCGTCTTACTACATCTGCAGCAAAGACGTTTATTTGTTTCG 3480
 L I P V L F G A S Y Y I C S K D V Y L F
 GGGTTATGCAAGCAGCTTTCCGCTTGCAGCGCCTCACAGAATCGGAAAGTTTGGGGGTATC 3540
 G V M Q A A F R L R A S Q N R K V W G Y
 GGAGTTATGCGCCTCGTTGATAAAGCTTTTAAAAAGCTGACGCAAAACCTTGATCTCTCT 3600
 R S Y A P R *
 M R L V D K A F K K L T Q N L D L S
 CTTGGTGTTCACATCCAGAGGGATCCGAGCAAGATCTCTTGGAACTGCAAGTTAGCGAA 3660
 L G V Q H P E G S E Q D L L E L Q V S E
 ATGGTGCCGTATGATTACCATTACGATGACGAAACAGTTATGACCAAGGAAAGTTTCGTTG 3720
 M V P Y D Y H Y D D E T V M T K E S S L
 GTACAAGTTGTCAAATTGACGGCTTGCTCTTTGACTCTTTGTCTGACGAACAGGTTAAG 3780
 V Q V V K I D G L L F D S L S D E Q V K
 CAGTTTGAAGTTCGCCGTAATACCGTGCTGCGCACTATCGCTTCCAGCGACCTTGCCTG 3840
 Q F E V R R N T V L R T I A S S D L A L
 TATGTGCATATAGTCCGCCGCAAGGTGTTTGGATTTCCCTGAAGGGCAGGGGTCCACTTGG 3900
 Y V H I V R R K V F D F P E G Q G S T W
 TTCTCCAAGCAGTTCAATGCGGCCTGGCGTAAGCGCTACGAGAGCAAAGGCTTCTATGTC 3960
 F S K Q F N A A W R K R Y E S K G F Y V
 AACGAGATCTATATCTCGTTGGTGCCTAGCCGCTTCCGTGCTGGTATGCCAGGGATCATG 4020
 N E I Y I S L V R S R F R A G M P G I M
 GATCGAGGAATTGCGCTCATCACGGGCACCAGTGCTAACAAGCAGGATGCTGAATCCTTC 4080
 D R G I A L I T G T S A N K Q D A E S F
 GAGGAAATGGCGGACGATCTTTACAAGGCGTCAAACCTGCTGTTGCGCGGCCCTTTCTGAG 4140
 E E M A D D L Y K A S N L L L R G L S E
 TACGGCGCTACCCGCTGCAGATCCAGCGGCACCCGGTTTGTCTCCACCACGTTTCATGGGC 4200
 Y G A T R L Q I Q R H P V C S T T F M G
 CGTGACCAGGCCTTTGATGCTGTCAGCCGTTTCCGGTGGAGCTGGGACGAATTCAAAAAG 4260
 R D Q A F D A V S R F R W S W D E F K K
 GTGGTTGGCGATCAAGCTCAATACCCTGCTGAAGTTGTCTCGATTACCTGGGGGAAGAG 4320
 V V G D Q A Q Y P A E V V L D Y L G E E

Anhang III

TTCTCCGAACTCAGCTCGTTCTTCCACTACCTGATCAACCTTGAGGATCGCAAGATCCCT 4380
F S E L S S F F H Y L I N L E D R K I P

GTGAGCGATCAGAAAATCTGCGAAATGTTGCCATATGCACGACTCAATTTCCGCGTGTG 4440
V S D Q K I C E M L P Y A R L N F R V L

GCAACGATGTGTGAAGTCCGGGGTAGCACCAGTTCGAGAATCGGAGCGGTGTTGAGCATG 4500
A T M C E V R G S T S S R I G A V L S M

GCCGAGTGGCCGCGTAAGACGCCATCGCGAATGATGAACAAGTTCCTGCAGCAGCCGGTG 4560
A E W P R K T P S R M M N K F L Q Q P V

GAATTCATCATCACGCAATCATTCTTCTTCTCGAACCGGATTGAAGCCGAGTCGTCGATG 4620
E F I I T Q S F F F S N R I E A E S S M

GTCGATGAACAACGCCGACTGACCGTATCGGATACACACGGGATTTCCAACGATGACAGC 4680
V D E Q R R L T V S D T H G I S N D D S

CAGGAACTGACTGAAGGTATTCGTGCTCTGCGCCGTGGCGATACTGTCAATGGTCTGCAT 4740
Q E L T E G I R A L R R G D T V N G L H

CACCTGACGATCTTCGTTTCATGTGCCTTCGTTGCCAATGGACTCCGATGACCATCGCAA 4800
H L T I F V H V P S L P M D S D D H R K

GCGAACAACAAGGCGCTGGATAAAGCTGTTGGTTTGATCGAGGGATGCTTTGTCGACCTG 4860
A N N K A L D K A V G L I E G C F V D L

AACGTCAAATCTGTTTCGTGAGTGGATGGCCCTGGAAACCTTCTTCTGGTTCGACGCTGCCT 4920
N V K S V R E W M A L E T F F W S Q L P

GGCCAACAAGAGGCCTTGATCGGTCGTGCGTGGGAAGATCAAATCGAGCAACTTCGCCGGG 4980
G Q Q E A L I G R R G K I K S S N F A G

TTCGCTTCGTTGCACAACCTTCGCAAGGGGCCGTGCGCAGCGCAACTTGTGGGGGCTGCG 5040
F A S L H N F A R G R R D G N L W G P A

ATCACGGCTTTTGAACCGAGAGCGGCACGTCTTACAACCTTCAACTTTCACCGCGAGCTG 5100
I T A F E T E S G T S Y N F N F H R E L

GAAGGGATGGTTGCAGGGCACACCGCAGTTGCAGCGGACACCGGCTCAGGTAAGACCACG 5160
E G M V A G H T A V A A D T G S G K T T

CTGATTTCCGGCGATGGTTTGTGAAGCCGATAAAGCCGGGCCGAGTGTCTGGTTCGAT 5220
L I S A M V C E A D K A G P R V F W F D

AACCGCTTCGGCGCGAAGGTGTTTCATGAAGGCAATGGGCGGGGTACACACCACGCTTTCC 5280
N R F G A K V F M K A M G G V H T T L S

CCGCACAGCGGCATGAATTGGAATCCTTTCAAGCTGCCGGACACGGCTGAGAACCGGGCG 5340
P H S G M N W N P F K L P D T A E N R A

TTTCTGGTTCGATCTGCAGGTGCAGATGCGTCACTGCTACGCGCTACACCGGCTGACTCT 5400
F L V D L Q V Q M R Q C Y A P T P A D S

GACGACATTAAGCGCTTCAAGGCCCTGGTAGATGAAAATACTCGCTGCCGTATGAGGAT 5460
D D I K R F K A L V D E N Y S L P Y E D

CGGCGGTTGCGCAATGTGGTGTGGACGTATGGCCAGGGTGAGCTGGCAGACATTATGGCC 5520
R R L R N V V W T Y G Q G E L A D I M A

ATCTGGCACGGCGCCAAGGGCGTACTGGTGCAAACGCTGGTGTGTTGACAATCAACAC 5580
I W H G A K G V T G A N A G V F D N Q H

GACTCTATCGACCTGACCACTTCCCGGCACTACTGCTTTGAAATGATGGAAGTCTCAAG 5640
D S I D L T T S R H Y C F E M M E L L K

GGCGGTGAGGCACGGCCTGAACTGCCGGTCTGCTGAGCTACCCGCTCCACCGTATTGAG 5700
G G E A R P E L P V V L S Y P L H R I E

CAAGCGATGGATGGCACCCCTTTCATCTGGTACTGGAGGAAGGGCAAAAACCTGGTGAAG 5760
Q A M D G T P F I L V L E E G Q N L V K

AACGATTATTGGAAGAAGCGAATCGACAACCTTCATCATGCAGATCCGCCGCAAAAACGGG 5820
N D Y W K K R I D N F I M Q I R R K N G

Anhang III

CTGATTATCTTCGTCACCCCTGATGCGAAGTACTTCCGCAGTGAAACCGACTCAATCGAC 5880
 L I I F V T P D A K Y F R S E T D S I D
 AAGCAGACCTCTACCAAGATCTACCTGTGCGAACGACGCGGCCACTGATGAAGACCATCAA 5940
 K Q T S T K I Y L S N D A A T D E D H Q
 AACCTGACCGTCGCAGAACGTAAGTGGATTTCGTGAGATCGGCCAGGCTTCCCGCAAGTTT 6000
 N L T V A E R K W I R E I G Q A S R K F
 CTGATCCGTGCGGGGAAGGAGTCGATCAGGGCGGTTTTTCGATCTGACTTCCGAAGTGGAT 6060
 L I R R G K E S I R A V F D L T S E V D
 GACGAAAACCTGTCCGACTTTATCCCGGTGCTGTCTCAAACGATGTTGGTGTGCGCCTTG 6120
 D E N L S D F I P V L S S N D V G V A L
 ATGGATTCCATCATCAAGCGCCTGGGCACCGACACCTGAGCAATGGGTTCTGTCTTT 6180
 M D S I I K R L G T D D P E Q W V P V F
 ATGGCGGAAGCCAAAGCGAAAAACACCCACAACCTGAAGGCGGTCAAATGATGGCAACTA 6240
 M A E A K A K N T H N L K A V K * M A T *mpfD* →
 TGAAGAAATTCGGCCTCGCAGTGGCAGTGGCCATGGCCGTGAGCGGCCAAGTGAATGCTA 6300
 M K K F G L A V A V A M A V S G Q V N A
 CCGGCGTTCCAACCTGGCGACGCTGGAACCTGGGCGGCCCTGGCTCAACAGCTTGTGTTC 6360
 T G V P T G D A G T W A A L A Q Q L V V
 TCGGGAACAATTCGAGACGCTGAAAGACTCGTATCAGACCCAAGGCAACATCCTGCGCA 6420
 L R E Q F E T L K D S Y Q T Q G N I L R
 ACCTCGAAGGTTCTATGGCCGTGGTGCATCGGCCTGAACGACTCGATCAACTCGGCTT 6480
 N L E G S Y G R G A I G L N D S I N S A
 CGGTCGTGCCGGGCTCTTGGCAAGAGGTCGTTGCACGGCAAGGCTCCGGTGCATGCGCA 6540
 S V V P G S W Q E V V A R Q G S G A Y G
 ACAAGCAATCGTACTACGAGGAATTGATCAAGACCTTGCCGCAAGAGCTGTTTGCCAACC 6600
 N K Q S Y Y E E L I K T L P Q E L F A N
 CACAAGGCCAACGCGCCCAAGGCTACCAGCTCAGTTCTGATGCCGTTTCGCGCAGCCATGT 6660
 P Q G Q R A Q G Y Q L S S D A V R A A M
 CCGGTGGCGATGCGCTCTACAGCGAAGTGCAGGTGCATCTGAACAACCTGGCCACCCTCT 6720
 S G G D A L Y S E V Q V H L N N L A T L
 CGCGTCAAGTGGACATGACCACAAACGCCAAGGATGCCGCTGACCTGCAGAACC GCATTG 6780
 S R Q V D M T T N A K D A A D L Q N R I
 CTGCTGAAAACGGCATGTTGGCCTCGGCCAGTGAAGCTGCAGGCGTTGAACATGAACC 6840
 A A E N G M L A S A Q S K L Q A L N M N
 TGCAGGCGAACCTGAACAACGCTGAAAACAGGCCACTGCGGATAACGAGAAAATCTTTTC 6900
 L Q A N L N N A E N Q A T A D N E K F F
 GCTGGACTGAACAGTAATTCTCGCGTGCAGAAAAGGAGATCTGAAAATGAAAAGCAATCCT 6960
 R W T E Q * *hpp26* →
 M K A I
 GCTGATGCTCAAATCATCACCGCCCCAGTCTGGGGCCGCTGTGGCTGATCGCCAAACT 7020
 L L M L K I I T A P V W G P L W L I A K
 CTGGAAGGTGATCGTTCTGGCGGTACTGGTTCGGCGCAGCCTCCGGCTGTGTCACCAACAC 7080
 L W K V I V L A V L V G A A S G C V T N
 CGCCAAGCTCGACAAGTCACCGTGCCTTGCCAGTTACCCCCGTTTCGTAACCGCTGACCA 7140
 T A K L D K S P C A C Q F T P F V T A D
 GGAGCGCACCAATGCTTAAGTTCAAGCTGCACCATATCCTCTCTGTTTGGCTCGGTGTGG 7200
 Q E R T N A * *hpp25* →
 M L K F K L H H I L S V C V G V
 TCGTGGTTCGGCGGGCTGGTTTACATCAACACCTCGTCTACTTTTCGACCTCGCCGGTCG 7260
 V V V G G L V Y I N T S S Y F S T S P V

Anhang III

ATGGTGAAGCCCCGACGGCGCCGGTGGCCACCTCGGAAAATCCGCTGCTGAAGGCAACCA 7320
 D G E A P T A P V A T S E N P L L K A T
 AAAAGGATGTTGGCGACTGGTTCCCGGGCACCTGCTTTGCAGAGATCTACATGCAGTCGT 7380
 K K D V G D W F P G T C F A E I Y M Q S
 CGTCCTACGGTGGTGCCTGGTGCAGGGTTGCATTTCAGAAAACAGCGCGAGAAATCAAGG 7440
 S S Y G G A L V Q G C I Q K T A R E I K
 CGCAGACCGGTGCGACCGTAAGCGCTGAAGACTTCCGCTCTCCTGAAGTGATCTCGCACT 7500
 A Q T G A T V S A E D F R S P E V I S H
 TCAAGGGTGTATATGGGGCATCGAATCCATGGCGCAGCTGACTCTCGAAGGTCTGATCGG 7560
 F K G V Y G A S N P W R S *
 M A Q L T L E G L I
 GGCTACGGACGAAGTAACGACAAGTTTCGTCGCCGAAGTATTTCCCAACCTTGCGGAGCT 7620
 G A T D E V T T S F V A E V F P N L A E
 GGTTTCACCACTGGTCTATGTTCGTTGCTGTTGGGTACTGGGTAGCGTTGGGGCTTTTCGAT 7680
 L V S P L V Y V V A V G Y W V A L G L S
 CTACAACGGCCAATCCGTCAAATACTGGGACATTACGAAAAGGGCAATGCTCACATCATT 7740
 I Y N G Q S V K Y W D I T K R A M L T S
 GATCTTTCTCACGTTGAACTGGGGTAGTGGCGGGCTGTGTTTTACCAGGCATGGGGCAC 7800
 L I F L T L N W G S G G A V F Y Q A W G
 GTTCACTGAGTCGGTTGCCGCGAAAATTATGAGTGGCGGTAGCACTACCACTTCGATGCT 7860
 T F T E S V A A K I M S G G S T T T S M
 CGACGCGCTGTATGTAAACGTGGGGAAGGTTGCCAGCGTTCTGATGAATGTTAGTTGGCG 7920
 L D A L Y V N V G K V A S V L M N V S W
 CCAGTTTTCGATGATCCTGATGGGCTACGGTCTTTTTCTTTATTAAGTGCATTCTGTTTGT 7980
 R Q F A M I L M G Y G L F F I N C I L F
 GGTCGCCATTCTGAACATGCTGATTGCAAAGTTTGGTGCTGCTATCAGCATGGCAATTCT 8040
 V V A I L N M L I A K F G A A I S M A I
 TCCGATCTTGATCGCGTTCTTCTTCTTTTCGGAGACTCGGCAATGGGGCATGAACTGGCT 8100
 L P I L I A F F F F S E T R Q W G M N W
 AAGTAAGATGCTGAACTTCTCACTTATCTACATTCTGTCCATCGCCATTATTCGTTTTGG 8160
 L S K M L N F S L I Y I L S I A I I R F
 TTATTCGGTTTTTCGGGGATGCAATCAATGAAGTCGCGCAAAGTGCCTACTATCAGCGATGC 8220
 G Y S V F G D A I N E V A Q T A T I S D
 AGCACTAATGACCGCGCAACAGTACGGAACGATCCTGATCGTAGAGGGCGTCTTGATTAT 8280
 A A L M T A Q Q Y G T I L I V E G V L I
 CTGCATGTTGCAAGTGCCTGGCTGGGCGGCGCACTGTCTTCGGGTGCAGCGGTACAAGG 8340
 I C M L Q V R G W A A A L S S G A A V Q
 ATCCTCGCTTGTAATGATGGCTATCAGAAGTTTGGGAGTACGTCGCTAATGGACAAGACG 8400
 G S S L V M M A I R T L G V R R * M D K T
 TTTAAGAATGATGAACAGCTGCGTCGCAAGGCCTTGCGCGAAGGTCAGAAAACCAAGCAA 8460
 F K N D E Q L R R K A L R E G Q K T K Q
 GAACGCAACCGTTTCGTTCTACCTCAATGGCATCCAGGCCGTTGCCATTCTCGGGCTGGGC 8520
 E R N R S F Y L N G I Q A V A I L G L G
 ATAGCGGTAGCCGCGCTGGCAGAGATCCATAACGTCATTCCGGTGGTTGCGACCATCGGT 8580
 I A V A A L A E I H T V I P V V A T I G
 GCGGATGGTGAGGTTTTGAAGATGCGTGTTATCGACCAAGACAACGTGTCTTCTGAAGAT 8640
 A D G E V L K M R V I D Q D N V S S E D
 GCGTTGATCCAAGGTGCGCTGTATGACTTTGTGGGTGCATGTAATACGTTTCGATCCGAAA 8700
 A L I Q G A L Y D F V G A C N T F D P K

Anhang III

CGTAAACAGCAACTTTCCGATGCATGCCACTTGTTCATCACGCCGGACATTGCTCGGGAA 8760
R K Q Q L S D A C H L F I T P D I A R E

TATGAACAACCTGATCAACCCGAAAACCTGATAACCCGTACCTGACGCTTGATGCGAAG 8820
Y E Q L I N P E N P D N P Y L T L D A K

GACTGGATTGAAGCTCAGGCGTATGGGATGAACAAAGTCGGAGACGTGTATCAGGTTTCT 8880
D W I E A Q A Y G M N K V G D V Y Q V S

TTTAGATCCTATTTGCACAAGTGGGGTACGAAAGACCCGGTTGTTACCAACTATGTGGCA 8940
F R S Y L H K W G T K D P V V T N Y V A

AACGTAAAAATCGATAACACACTGAAGCCAAGAGCACTTGGCGACCGTTGGGTAAACCCG 9000
N V K I D N T L K P R A L G D R W V N P

CTCGGAACATTGGCTACTGTTTACCGTAAGAGTGAAGAAGTGAAGCCCGGTAATTTCATT 9060
L G T L A T V Y R K S E E L S R R *

mpfG →

CAATTCAAGGAAACTGATCATGAAGAAAAACTGCATTCTGCCGACCGCTATCGCCCTGAG 9120
M K K N C I L P T A I A L

TTTGTGTTTTGCGGGTGGCATCGCACATGCCGCAAAGTTGCCAAAGCCGCTTATGAGCGA 9180
S L C F A G G I A H A A K L P K P L M S

TAGCCGGGTAAAACAAGTTCCTTACGACCCGAACCAAGTTTATGAACTGGTAGGGACGTA 9240
D S R V K Q V P Y D P N Q V Y E L V G T

CAACTATCAAACCTTCGCTGGAATTCGAAGCAGACGAAATGGTCAAGGTTGTTGCACTCGG 9300
Y N Y Q T S L E F E A D E M V K V V A L

CGATACCATCGCCTGGCAAACCATCCCATTCCGCAACCGGCTTTTTCCTCAAGCCGGTTGA 9360
G D T I A W Q T I P F R N R L F L K P V

AGAAAATGCGGACACTAACCTGACCGTTATCACCAGCAAACGCACCTATTACTTCCAGCT 9420
E E N A D T N L T V I T S K R T Y Y F Q

GGGCAGCACCAAAAAACGGCTGGCCAGTGCATCCTGGTGCCTTCATCTATCCGACCAG 9480
L G S T K K T A G Q S Y L V R F I Y P T

TCGGGTGGCCACCTACTCCGAGTTCAAAAGCAATGAGCCAGCGCCGATGGCCAGCTCCGG 9540
S R V A T Y S E F K S N E P A P M A S S

CACCGCGAGCGAGCCGAACATCAACTACGGCTTTTTCGGGTGACAAGGACGCAATCGGACT 9600
G T A S E P N I N Y G F S G D K D A I G

GCAGTCGGTGATGGACGATGGCCAGTTCACCAAGTTCCTACTCAAGAAAAGGTGCCGACAT 9660
L Q S V M D D G Q F T K F L L K K G A D

GCCGCAGTTCTACCGCGTGTGCCGGATGGCACCGAGGCGATGGTCAACAAGCGTCGTGA 9720
M P Q F Y R V L P D G T E A M V N K R R

GGGTGACTACGTGGTTCGTTGAGCGCCTGGACAGCATGTTTGTGTTTTCGCTGACGGCAATTC 9780
E G D Y V V V E R L D S M F V L R D G N

CTACGTGTGTGTGCAGAACCTGGCGAATCCCTACAAACGCACTGTTACCCGTGGTGCCCG 9840
S Y V C V Q N L A N P Y K R T V T R G A

mpfH →

TGACGGCGGAGGGGCATAAGCATGGCCACTGAAGACAACAAGCAGACCCCTGAAAAACAA 9900
R D G G G A * M A T E D N K Q T P E K Q

GTGACGGAGAAAACCTCGCGAGGACGAAATTCGCGAGTGAACGAATCGCAATCCAACCTCG 9960
V T E K T R E D E I R E W N E S Q S N S

ATGTTGAAGGCCAAAGGCGGCTCCAACAAAGCGACCCGGCATTGCGCTGATCGTCGCAACC 10020
M L K A K G G S N K A T G I A L I V A T

GTGGCGGGTTTGGGCTTTGTTTACTGGCTGAACAACAGCGGCGATAGCAAAGCTACGGGC 10080
V A G L G F V Y W L N N S G D S K A T G

GGCTTGAAGAAAGAAGAAGTGGTTCGAGCTTCGCCCAAGCGTGTGTTGGATCCTTCGCCG 10140
G L K K E E V V A A S P K R V L D P S P

AAACGTGAGGCGGCAAAGGTAAGCCCCGTTAGCAATGACGGCTCGGCTACTCCTGCTGAT 10200
K R E A A K V S P V S N D G S A T P A D

Anhang III

ACGCCGCGCTCGGTGGTGGATCGGCAGAACCAACAAACCGGCTTGAGTGAAGAAGAAAAG 10260
T P R S V V D R Q N Q Q T G L S E E E K

CGGCGGCAAGCGTTGGAAATGCAGATGGAGCTGGAGCGGCAGAAGATGCTTGCAGCTCGT 10320
R R Q A L E M Q M E L E R Q K M L A A R

CAGCGGTGCGCCATTTTCGCCAGTGCAGAAAGAGGACGGCTTCAAGGATGGAGCAGGTGGC 10380
Q R S A I F A S A K E D G F K D G A G G

CAACAGGTGGATCTGGCTCATTGCTTGGGGGGGGCAATGGCCCTTCGACACCGACCAAT 10440
Q Q G G S G S L L G G G N G P S T P T N

GCAAACGACGCTTACGCGGCATCGACCTTCTCCGATGGCGTGCCGGTTTCAACGGGTGCT 10500
A N D A Y A A S T F S D G V P V S T G R

CAGTTGAAAATCTCGAGTACAAGTTTTGCAAGGCGCCGTGATCGAGGGTGTCTTCAA 10560
Q L E N L E Y K V L Q G A V I E G V L Q

CCTCGCGCCGTGAGCCAGTTGCCGGGCCAGGTCTGTGTAGACATTCAGCAGGACGTTTAT 10620
P R A V S Q L P G Q V C V D I Q Q D V Y

GCGGCAGCCGGTGCAGCGGTCATGATCCCATGGGGTTTCGACCGTTTGTGGCAGCTACAAC 10680
A A A G R R V M I P W G S T V C G S Y N

GCGACTCTGCGACCAGGACAGGAACGCTTGTTCACGATCTGGAACGGTTGCGCACGCCT 10740
A T L R P G Q E R L F T I W N W L R T P

GTCCTGCCTGGCAGGCCAGCGATGGAAATTGCCATCAACAGCGGTGGTGTGACCAGCTC 10800
V L P G R P A M E I A I N S G G A D Q L

GGCACCGCTGGCCAGGGTGGCATTGTGCGACAACCACTGGGCGCAGATTTTTGGTGTGCT 10860
G T A G Q G G I V D N H W A Q I F G V A

GCAGCGGTGTCGATCATTGGGGCCGGTGCCTCGAATTCCGGGGTTTCGTCCGGCGATCAG 10920
A A V S I I G A G A S N S G V S S G D Q

GAAAACCTCGTCTTCGCGCTATCGCTCTGAGGTGCAGGAAGCCGCGGCTGACTCTGCTCAG 10980
E N S S S R Y R S E V Q E A A A D S A Q

ACGATCCTGGGTGCTACGCCAATATTCAGCCAACGCTGACCGTCCCGCACGGTTCGCGA 11040
T I L G R Y A N I Q P T L T V P H G S R

GTGGTGATCTACCTGCAGCGGATCTGGATTTTCAGCTCGCATTTCAGAAAGAGATCGAG 11100
V V I Y L Q R D L D F S S H F K K E I E

CACGCCAGCAATGGCGGCGTGACCTACATCCAGTGAGGAAGCGGTATGTCTGTTATTGCA 11160
H A S N G G V T Y I Q * *mpfl* → M S V I A

TCTTTCCGTTCCAAGCTGAGAAATCTAGTCACGCTGCTGGATGATCCTGAAGTTCCGAA 11220
S F R S K L R N L V T L L D D P E V S E

ATTGCGATCAACGGCCCGGACAATGTCTGGGCCGGTTTTTCGCGGCCATCGGTTTCATGCAG 11280
I A I N G P D N V W A G F R G H R F M Q

CCAGTGCAGATCGAGGGTGTGACCGTTCCGCTGATTACCTCGCTTGGTGAGGTAATCGCT 11340
P V Q I E G V T V P L I T S L G E V I A

GCGCATAACCGACAAAAGGTTGATAACCAGTACGCCGATTCTGTGCGGCCGTATCCCGATC 11400
A H T D Q K V D T S T P I L S G R I P I

AATCTTGGGATGGCGTAGCAGACAACGAGCGCGGTGATTACCGCGTTCAGGTTGTGCTG 11460
N L A D G V A D N E R G D Y R V Q V V L

GCTCCCCTGTTGAGCAGCACATTGGCGGCATCGTTTGTATCCGTAAGCCAGGAATCAG 11520
A P A V E Q H I G G I V C I R K P G I T

CAGATCACCTTGAAAGAGTACGAGGAATTTGGCGGTTTCGAGCACATCAACAAAACCTCGG 11580
Q I T L K E Y E E F G A F E H I N K P R

GCGCACTCCGACTATTCAGACGATCACTTGATAGAGCTGTACCGGGCCAAGCGCTGGAAA 11640
A H S D Y S D D H L I E L Y R A K R W K

GAGTTTTTTCATCGGCATCATCAAGGCCCGCAAGAACATCATGATTTCTGCAGGCACCAAC 11700
E F F I G I I K A R K N I M I S A G T N

Anhang III

GCCGGTAAAACCACCTGGCTTAACGGAATGCTGCAGCACATTGATCCACATGAGCGGATT 11760
 A G K T T W L N G M L Q H I D P H E R I
 GTCACGATTGAAGACACCCGTGAGATCCGTATAACCAGCCCCGGAACGCGGTTACCTGCTC 11820
 V T I E D T R E I R I P A R N A V H L L
 TATTCACGCGGCGCCCAAGGCCGCGCCAAGGTGACGCCGTTGACTTGCTTGAATCGATC 11880
 Y S R G A Q G R A K V T P F D L L E S I
 CTCCGGCTGACGCCCGACCGGGCAATCATGGGCGAGATTTCGCGGCGGTGAGGCATTCCCG 11940
 L R L T P D R A I M G E I R G G E A F P
 TTTCTGGAATTGCTCAACACCGGTACAGCGGCTCGCTGTCTCGATAACACGCGGACTCG 12000
 F L E L L N T G H S G S L S S I H A D S
 CCGGAAATGATGTTTGACCGGTTGGCCTCAATGGCTGCCCCGAGGTGGTGCGGATATGACC 12060
 P E M M F D R L A S M A A R G G A D M T
 AAAAACCAACTGGTCGAGTATTCGCGGCAACTGATCGATGTAGTCATTTCAGTGGGAATAC 12120
 K N Q L V E Y S R Q L I D V V I Q W E Y
 GGCTTCGACGCGCCCGCTACATTTTCGGAGGTGCAATATGCAAAAAGCTGCCTAAGTTCGC 12180
 G F D G R R Y I S E V Q Y A K A A *
mpfJ →
M Q K L P K F
 GGTAACGATGCTGGCCCTGGCTTGTACGGTCGGCCAGGCTGGGCCGATGAGCCTGCCCC 12240
 A V T M L A L A C T V G Q A W A D E P A
 TATGCCTTTCTCTGAACTGGCGGCGAAGTGTGCACCGACAGTTCACCAGCGAACGCTGAA 12300
 P M P F S E L A A K C A P T V H Q R T L
 GTCCTGATCGGTAATGAATCGACCTACAACCCCTATGCAATTGGGGTTGTAGGTGGACG 12360
 K S L I G N E S T Y N P Y A I G V V G G
 GCTGGAGCGTCAGCCCCAGTCGTTGCGCGAGGCGGTGGCCACCGCTGAACGACTGGAGCG 12420
 R L E R Q P Q S L R E A V A T A E R L E
 GGAGGGTCAGCGTTTCTCGGTGGGAATCGGCCAGCTCCTGGTCACCAACATGCGCGCCAT 12480
 R E G Q R F S V G I G Q L L V T N M R A
 GGGCATGACCTATGCCGAAGCCTTTGAGCCTTGCCAGAACCTCAAGGCAATCAGCGATCT 12540
 M G M T Y A E A F E P C Q N L K A I S D
 CATGGTGAAGAACTACACCAAGCGCTGACTTCGGGCGCTCAACCGCAAGAAGCGTTGCG 12600
 L M V K N Y T K A L T S G A Q P Q E A L
 TGATTGTTCTCGATGTACTACAGCGGCAATCGCACCCGTGGATAACCAGCCGACAAGCC 12660
 R D S F S M Y Y S G N R T R G Y Q P D K
 AGGCGATCCATCGTATGTGGCAAAGGTTGTTACCGGCGCTCTCAATCCCCTGACCACCGA 12720
 P G D P S Y V A K V V T G A L N P T A T
 TCCAATTGTGCCCGCTGTAGAGGCGCTGGAAGGCGATGAGGCGATTGCCATGGCCGTTCC 12780
 D P I V P A V E A L E G D E A I A M A V
 GCCGCAAGGGGCAAGCAAGGCACCTGTGCGCGCTCGTAGAGCCTCACAGCAACAAAAGTGG 12840
 P P Q G A S K A P V R A R R A S Q Q Q S
 CCCGTGGGTGATCGTGACCGACGAAAACGGCCAACAAGTGGCGCCAGTGCAGGCCGTGGC 12900
 G P W V I V T D E N G Q Q V A P V Q A V
 TTTCCAGAGTGCGCCTACTGGACAAGCTCAGGCGCCAGAACAACCCAAGGTGCAGGTTCA 12960
 A F Q S A P T G Q A Q A P E Q P K V Q V
 CTTAAACACCGATGTTCTGAAAGCGATCAGCGATTCCAGCGCTTTGACCAGCCGCTCGC 13020
 H L N T D V P E S D Q R F Q R F D Q P L
 AGCACCTGCGGCGGCTCCGGCTCCGGTGCAAGCCCAAGCCCAAGCCCAAGCAGTACCTTC 13080
 A A P A A A P A P V Q A Q A Q A Q A V P
 TTTCGTACAGATCATCAACTGAATTTCTCGCACGCGAGAAAAGGGGGAATTTATGAAAAA 13140
 S F V Q I I N *
hpp18 →
M K

Anhang III

ACTTCCATTTGCTGCGCTGCTCGGTGCGCTGTTTTTGTCCGGTGCGGTCAATGCTACCGA 13200
 K L P F A A L L G A L F L S G A V N A T
 CCTCCCATATGGGCATGACAGCGACCCGGATGCTTGTGGCGCTGTGCTCTGCCTGCTGGG 13260
 D L P Y G H D S D P D A C G A V L C L L
 CATGACCCGTGATGGCGACTGCGACAAGTACATCAAAAACCTATTTTCGGCATTAAAGCGTTA 13320
 G M T R D G D C D K Y I K N Y F G I K R
 CAAGCACGGCAATTTTCAGCCCGTCGCGTACGAAAGCAGCCCGGGGAGACGCGGTTGCTTC 13380
 Y K H G N F S P S R T K A A R G D A V A
 GTGCAAGGACGATGAGGGCCTGGCCAAAAAGGCCAACGACATTTGGGGGAGCGTCCCGAA 13440
 S C K D D E G L A K K A N D I W G S V P
nuc2 →
 TGGCTTCTAGTGTGCTCAAGCCATTGGCATTGGCGTTTTGCATTGATCGCGGGGGCCAGCG 13500
 N G F *
 M A S S V L K P L A L A F A L I A G A S
 TTCAGACGCTGGCCCTGGCCCGCTGAAGTAGATGGCCCCGGCGTATTGAAGTCGGCTTTT 13560
 V Q T L A L A A E V D G P R R I E V G F
 CGCCGGAGGGATCGGCGCAAAAACCTGGTGTGCGAACCATTTGAGGTAGCAAGCAGCTCTA 13620
 S P E G S A Q K L V L R T I E V A S S S
 TTCGTCTGTCTGCTTACGTGTTACCAACCCGGACGTAACCCGTGCGCTGATCGCTGCGA 13680
 I R L S A Y V F T N P D V T R A L I A A
 AACAGCGCGGGGTCGATGTTGCCGTTGTTGCTGACCATCGCAGCAACCTGCAGGAACAAC 13740
 K Q R G V D V A V V A D H R S N L Q E Q
 GCACGTGACCCGCTCGCCATGCACTGACGCTTCTGGCGAAGGCAGGGATACCGACTCGCA 13800
 R T S A A R H A L T L L A K A G I P T R
 CTGTGATGCGTACGCCATTTCATCACGACAAGTTTCATGGTGGTGGATGGCATGACGGTCG 13860
 T V D A Y A I H H D K F M V V D G M T V
 AAACGGGCAGTTTCAACTTCACCGCTGCAGCGGCCAAGAGCAACAGCGAGAACGCACTAG 13920
 E T G S F N F T A A A A K S N S E N A L
 TGGTCTGGAATGACCCGGCGCTCGCTGAAACCTACTTGAACCATTTGGCAAAGCCGCTGGG 13980
 V V W N D P A L A E T Y L N H W Q S R W
nucl →
 ATCAAGGAATCGCTTTCAAGGCGAAATACTGAGAGGGAACGCATATGGAAAAGCAAAAACA 14040
 D Q G I A F K A K Y * M E K Q N
 CTGACCAGACCACGTACCAACTGTTCCAGAAAGGCAAGGAGCTGCAGACGTTACCGATC 14100
 T D Q T T Y Q L F Q K G K E L Q T F T D
 CGAAGGAAGCGGGCACTGCCTGGTTCAAGGCCGAGCTTTCCGACAAGACTGTGATGACCG 14160
 P K E A G T A W F K A E L S D K T V M T
 TTCAGCAAGGCGGGCGCTCGCGTATTCGCGCAGGTGGGCAAGGAAGGTAGCCAGTATT 14220
 V Q Q G G G A R V F A Q V G K E G S Q Y
 ACAAGGATCTGCCATTTCGACAACATGCCAGGCGCTGCCGACTTCAAAAACCTCGTTCAAGG 14280
 Y K D L P F D N M P G A A D F K T S F K
 AAGCGCTTGAAGTGCAAAAATCGGGGCTTTCCGGTGCTGCCGCTGGTAAGCCTGCCGAAG 14340
 E A L E L Q K S G L S G A A A G K P A E
 CTCTGGCCGTTTTCCAAACCGATGGATATGCCTGCCATTAAGAATGCTGAGAGTGGTCAGA 14400
 A L A V S K P M D M P A I K N A E S G Q
 CCTACGAGGGCAAGATCCTTGGGTTCCAGGGCAATCAGGTAATCCAAGCTGTCAGCGACG 14460
 T Y E G K I L G F Q G N Q V I Q A V S D
 GACAGAAGACCGTTTCACATTGCACATGAACGTGCAGCTCTGAGCAGCGCAAAGGCCGGGA 14520
 G Q K T V H I A H E R A A L S S A K A G
 TCCTGCATGCTGGCAAGGATCTTTTCGATACGCTACCCATTCGCCGGGGTAGGCATTGTGC 14580
 I L H A G K D L S I R Y P F A G V G I V

Anhang III

AAGAGCGTCAGCTTCAGCACGAACGGAAGGAGCATTCGCACCAGCCGAAAGGCTTTGGTG 14640
 Q E R Q L Q H E R K E H S H Q P K G F G
 GGAAGGGCTTTTTGACCTTAACGAGCCGTAGCTGGCCAACACAGCGCATGACACACTTTCA 14700
 G K G F *
* C N H G K S K R I
 AGGGAGCCGGTAGGCTCCCTTTTTTTGTAGATCAGCAGTTATGCCCTTGCTCTTGCGAAT 14760
 D A I R S P A V G A L K A L V N N S V M
 GTCCGCAATGCGTGACGGTGCCACACCCGCCAGCTTTGCCAACACGTTGTTGGATAACCAT 14820
 G L L H E Y R A V R S V R Q Y P K I G L
 CCCAAGCAGATGCTCGTAACGAGCTACCCGCGACACCCGCTGATAGGGCTTGATGCCCAA 14880
 F E R R Q E V V L F P V G V A R S I K A
 AAACCTCCCGCGCTGTTTCGACCACAAAATGGCAGCCCACTGCGCGACTGATCTTCGC 14940
 S S M T G F L S E F G L W P G Q Y N P L
 CGAAGACATGGTGCCAAATAGCGACTCGAACCCAAGCCACGGCCCTTGATAGTTTGAAG 15000
 P V P N P S E P L P A A P G F G F A E R
 CGGGACGGGGTTCGGCGACTCAGGTAGGGGGGCGAGGCCCGAAGCCGAATGCTTCGCG 15060
 L A K V T A V T A G S L K A I D Q D T V
 CAATGCTTTGACTGTGGCGACGGTAGCGCCTGAAAGCTTGGCTATGTCCTGGTCAGTCAC 15120
 L G L L A K Y P R V P H N A P I R Q K R
 AAGGCCCAACAACGCCTTGTAGGGTCTGACTGGATGGTTTGCCGGGATCCGTTGCTTTCT 15180
 P T P R P R P P I G Q S E R Y T T V S S
 CGGCGTCGGTCGAGGTCTGGGCGGTATGCCCTGCGACTCGCGGTAGGTCGTCACACTGGA 15240
 V S V G C R A A I A P D S E V G L L D R
 AACGGACACACCGCATCGAGCGCAATAGCCGGGTCGGATTCAACCCCCAGCAAATCACG 15300
 F P E I V R D V T Y A A I G F M L R R Q
 GAACGGTTCAATCACCCGGTCGACCGTATAGGCCGCGATGCCGAACATCAGGCGGCGCTG 15360
 R I R H Q T T G V L R A L T R D K M R G
 TCGGATCCTGTGCTGTGTCTCCCGACCAACCTGGCCAATGTTTCGATCCTTCATCCGGCC 15420
 L K C D Y W K P L G I N K W D A T M ← *hpp2*
 AAGCTTGCAGTCGTACCACTTGGGCAATCCGATGTTTTTCCAGTCAGCGGTCATACATTC 15480
* A P
 TTTGGGGGACGATAGAGGAAACGGACAAGATTGTACGCTAAGCGTGCGGCCTGTCAGGCT 15540
 A P S P A A K Q G T F L E R Y G R M F Y
 GGGGCCGGTGACGGTGCTGCTTTTTTGTCCCGTGAAAAGCTCTCGATAACCCACGCATGAAA 15600
 K N P E K K K V D E S H E R S L N A L L
 TACTTGTTTCGGCTCTTTTTTCTTAACGTCTTCCGAGTGTTACAGCGATAGGTTTGCAGT 15660
 G C N I L F A N A R P I R K E A V G K T
 AGCCCGCAGTTGATCAAAAAGGCGTTTTGCCCTGGGAATCCGCTTCTCAGCCACACCGGTC 15720
 E S I T E F S A M T F M T K N D R A F A
 TTTTCGCTGATGGTTTTCAAACGATGCCATCGTGAACATGGTCTTGTGTGCCCGCAAAA 15780
 F Y L F L K L A D L E C V S R K Q F M Q
 GCAAAGTAGAGAAAGAGCTTCAGCGCGTCGAGTTCACAGACAGATCGCTTTTGAACATC 15840
 F P E I Q T N K L V N Y L P R S P L K C
 TGGAAAGGCTCGATTTGAGTGTTCTTCAAGACGTTATAAAGCGGCCTTGAGGGCAGCTTG 15900
 W N G T F D Y G V L V Y R C K R G D K E
 CACCAGTTGCCGGTGAAGTCATAACCCACAAGGACGTACCTGCATTTGCGGCCATCCTTT 15960
 S K I R G T V V L G E L G A A V L Q R S
 TCGCTTTTGTATCCTGCCTGTAACAACAGTCTTCCAAGCCAGCAGCAACGAGCTGTCCG 16020
 L G T I E M L R T Y T L E A I L L C D N
 CTCAAGCCTGTAATTTCCATCAAGCGTGTGTAAGTCAGCTCGGCTATTAGCAGGCAGTCG 16080

Anhang III

G R W Q E E A Q T L L A I Y L Q L A A I
TTTCCCCTCCATTGTTCTTCAGCCTGGGTCAGCAGGGCGATGTACAGCTGCAATGCTGCA 16140

A T S R S A K A Q N S W G F D R L G G E
ATCGCGGTTGATCGGGACGCCTTGGCTTGGTTTGACCAGCCAAAGTCGCGCAGACCTCCC 16200

← *orf1*

K I W I A P M R V W P L L R M
TCCTTAATCCATATCGCGGGCATCCGCACCCAAGGCAGCAATCTCATTTCCAAACCCCCT 16260
GCATTCCGATGACGACGATAGCAGCGAACACTGCTAGTGACAGAACCAGCGGTTACTAAGC 16320
GATCTGCGTTAGTAGCGAGGCGTTCCAATGCTTCTACTGCTTTGCGAAAACCTGTTTCATTA 16380
GCCAGATCTCAAATGACTTGTGATGTGGTCTTTATAACGATCTCGCACACCTCTCTCTAG 16440
AATAAGGTGATCGAGCTATAAAAAAATGTTTGAAAAATTACTTTAAAAACAATGCGTTA 16500
AACAGATTTATTAAAGTCTTTAAGATTCATTTATTGGTTACAGAAAGGCGGGTTTTTGAC 16560
TGAAATTCCAAGAAAATTTCTCTCATGCGCCATGGCAGCAATTCTCGCACGCGAAAAAA 16620
ATPSEGRERTK

* K T R E R G E S P T A

AGCCCCCTCCGGGGCTTTGTTACCCCTACTTTGTACGCTCTCTGCCCTCGCTTGGTGTGCG 16680

P Q V R Q K R E L A R E N T A G D A I T
CGGGTTGCACTCGCTGTTTCCGCTCCAGGGCGCGCTCATTGGTTGCGCCATCCGCGATGG 16740

K L A H P K Q L R M V E R E K Q L S L A
TTTTGAGTGCGTGCGGTTTCTGCAGGCGCATCACTTCACGCTCTTTCTGCAGGCTCAAAG 16800

T T K D Y R K A I A A P L G A I A D T Y
CGGTGGTTTTGTGCTAGCGCTTGGCAATGGCTGCTGGTAGTCCGGCAATAGCGTCCGGTGT 16860

V R A E L R A R S I A V Y F L N L S T T
ATACACGCGCCTCCAGCCGCGCCCGGCTGATCGCCACATAGAACAGGTTGAGCGAGGTGG 16920

R S K T N I S I M V R D N T L G Q A S H
TTCGGCTCTTGGTGTGATCGAGATCATTACCCGGTTCGTTGGTTCAGCCCCCTGCGCACTAT 16980

V T A S Y A H E L H L P K N A P L K V V
GCACCGTCGCCGAATAGGCGTGCTCTAGGTGCAACGGCTTGTTCGCTGGCAGCTTCACTA 17040

R E P K G N R E K I S A L E I L G N Q T
CTCGCTCAGGTTTGCCGTTGCGCTCTTTGATCGATGCCAGCTCGATCAAACCGTTTTGCG 17100

S V V R M R D G N T L D L A P D N R T I
TACTGACTACGCGCATCCGGTTCGCCGTTGGTGAGGTCAAGAGCCGGATCGTTCCGGGTGA 17160

R V L D G M A L E P R E H K Y V S L K T
TCCGAACTAGGTGCGCCATGGCCAGCTCGGGGCGTTTCGTGCTTGTACACACTGAGTTTTCG 17220

V Q R P N F Q I P N G D A G T V I L I N
TTACCTGGCGCGGGTTGAACTGGATGGGATTTCCATCGGCGCCGGTCACAATGAGGATGT 17280

G P L A Q K V T Y T E C R M L G A K K Y
TCCCCGGCAGTGCCTGCTTACCGTGTAGGTTTCGCACCGCATCAGGCCCGCTTTTTTGT 17340

D K E P Q I L M G A K Y A P A Y R R E A
AGTCCTTCTCCGGCTGGATCAGCATTCCCGCTTTGTAGGCCGGGCATAGCGGCGTTCTG 17400

Q T M D V R N L T D F K A G T G E L G L
CCTGGGTGATGTCTACACGGTTCAGCGTATCGAACTTGGCCCCTGTCCCCTCCAGCCCCA 17460

A R R A L T N I E K R D K N T G A V I L
AAGCTCGGCGGGCCAGCGTGTGATTTCTTTGCGATCCTTGTTCGTGCCCGCGACGATCA 17520

V E K R E Q D T L R V Y D N V I A Q H R
ACACCTCTTTGCGCTCCTGGTTCAGTGAGGCGAACGTAGTCGTTTACAATGGCCTGGTGCC 17580

E S P N R L E E I H K I H Q L S L P T N
GCTCGGAAGGGTTGCGCAGTTCTCAATGTGTTTGTGCTGCTGAGCGAAAAGTGGGGTAT 17640

G D A A H E V A R K L E P D K Q R Q I E
TACCATCGGCGGCGTGCTCGACGGCCCGTTTTCAGCTCGGGGCTTTTCTGCCGCTGAATCT 17700

K I R A T Q M G N Q Q L Q A F P K G A E
CTTTGATTTCGAGCGGTCTGCATGCCGTTTTGCTGAAGCTGGGCGAACGGTTTACCCGCT 17760

Anhang III

I A E T Q K T D G L Q V L R A G S K E V
CGATAGCTTCGGTGTGCTTGGTGTGCGCCAGTTGAACCAAGCGAGCACCCGACTTCTCAA 17820

L R M L Q E M Q R A G V V G A E D L V I
CTAGGCGCATCAGTTGTTCCATCTGGCGAGCGCCACCACCCGGCCTCATCGAGGACGA 17880

I T R E D L K K D K T H F F S A L T H A
TGATGGTTCGCTCGTCCAGTTTCTTGTCTTGGTATGGAAGAAGCTGGCCAGCGTGTGCG 17940

D L G E N K L A A V Q N G Y P A L A L I
CGTCCAGTCCCTCATTCTTGAGTGTGCGACTTGGTTGCCATAGGGAGCCAATGCAAGGA 18000

R Y G P Q D E T K G H N M A E N V S S L
TCCGATAGCCGGGCTGATCTTCTGTCTTGGCGTGGTTCATCGCCTCGTTGACCGAGGAAA 18060

L Q V A R D V S Y T K G T G A D G Q I G
GCAGTTGCACCGCTCGATCCACGGAGTAGGTTTTTCCGGTACCGGCATCGCCCTGGATTC 18120

V F R N P T S V I T E V A Q R Q G T T L
CGACGAACCTATTCCGGGTGCTGACAATGGTCTCGACCGCTTGGCGTGGCCAGTGGTGA 18180

T S G E L A K A V Q E Q S M L P A I Q G
GGGTCGAGCCTTCGAGTGTCTTGGCTACCTGCTCCTGAGACATGAGCGGCGCGATCTGGC 18240

R G T R E I A L I A K E R K L G K Q T T
CCCGCCTGTACGCTCGATGGCGAGGATCGCCTTTTTCTCGCTTCAGCCCTTTCTGCGTGG 18300

Y R K E A A V L S G R D I A K A V Y Q Q
TGTAGCGCTTTTTCCGCCGCGACCAATGAACCCCGGTGATGGCCTTGGCCACGTACTGCT 18360

A Q K D T W G K L E K L H S Q W G A P S
GCGCTTGTGTGTCTGTCCAGCCTTTCAACTCCTTCAGGTGGGATTGCCAACCTGCAGGAG 18420

L V P D E A S G K A M K Y A P T S E I L
ACAGCACCGGGTCTTCTGCGGATCCCTTGGCCATCTTGTAGGCCGGTGTGATTCGATCA 18480

T G Q K V L R D I E A S V Q D P T A L G
GCGTTCCTGCTTACCAGACGGTCAATCTCTGCAGAACTTGGTGGGTGTGGCCAAGC 18540

V A R R L A V T K M D Q E G V V Q E R E
CAACCGCACGGCGAAGCGCGACGGTTTTTCATATCCTGCTCGCCGACGACCTGCTCAGTT 18600

T L H N I A Y Q V V A Q G P T M G T P L
CGGTCAGGTGATTGATTGCGTACTGCACCACGGCTTGGCCGGGTGTCATGCCGGTGGGTA 18660

N S D A H V R A G P E A R S E G Y E R G
GATTGGAATCGGCGTGAACCTCGCGCACCTGGTTCAGCGCGGCTCTCGCCATACTCGCGGC 18720

D L R S R A G Y D I G L E R S K T V W Y
CATCAAGCCGACTGCGCGCGCCGTAGTCGATCCCCAGCTCGCGGCTTTTTCGTGACCCAAT 18780

Q K V L E A D R E D K R P R T A M A I I
ACTGTTTACCAGCTCGGCGTGCAGCTCATCCTTGCAGCGGCTGGTTCGCCATGGCGATGA 18840

Q K E L T T A D A R T K G D K A L A D E
TCTGCTTTTTTCAGGGTGGTTCGCTGCTGCGGAGTCTTTCCGCTTTTGGCCAACGCATCCT 18900

I V K S R G S F A E I Q E R T I H N L E
CAATGACCTTGCTACGGCCTGAGAATGCCTCGATCTGTTTCGCGGGTGTGTTGTTTCAGCT 18960

F N G E N D L V R I E Y G L E R L E Y A
CGAAGTTGCCTTCGTTGTCCAGCACACGGATTTTCGTAGCCCAGCTCGCGCAGCTCATAGG 19020

L L G K Y M A D V E H Q V V F I D D N F
CCAACAGGCCTTTGTACATGGCGTCAACTTCGTGCTGAACCACAAAAATGTCGTCATTGA 19080

L A R W E G D A R Q T M N M V V A H T H
ACAAGGCGCGCCATTTCGCCATCGGCCCCGCTGTGTCATGTTTCATGACCACGGCGTGGGTGT 19140

M Q P D K G R S M E H R F K G I V M N G
GCATCTGCGGATCTTTACCACGGCTCATTTTCATGGCGAAATTTGCCAATGACCATGTTCC 19200

T R E R M T K G Q E K R R A Q A L K E V
CCGTTTCGCTCCCGCATGGTCTTGCCTGTTCTTGCAGCGAGCTTGAGCAAGCTTTTCAA 19260

Anhang III

H E M A K T V A R D H A L V V S K D G A 19320
CGTGCTCCATGGCCTTGGTCACTGCGCGATCATGGGCGAGGACAACCTGATTTGTCGCCCGG
V L A Q M S V S K P A S F T L D L G M R 19380
CGACAAGTGCCTGCATCGAGACAGATTTTCGGCGCTGAGAATGTCAGATCCAGGCCCATGC
K K G S K P D F T T A I R K G N P L K G 19440
GCTTCTTGCCGGACTTCGGGTCTGAAGGTGGTTGCTATGCGCTTGCCGTTCCGGTAGCTTTC
D L L K A L E V S D I L G T L G L R E A 19500
CATCGAGCAGTTTGGCCAGCTCCACGCTGTCGATCAGGCCGGTCAAACCGAGTCTTTCGG
G E G Q W E G P S E K A Y Y D D A A S F 19560
CACCTTCGCCTTGCCACTCGCCCGGCGATTCTTCGCGTAGTAGTCATCTGCGGCAGAAA
Y H A A A Y Q N N G K I P T V N F M ← *traC*
AATAGTGCCTGCCGCATACTGGTTGTTTCCCTTGATGGGCGTGACGTTGAACATGCCGA 19620
* A Q G A I V I S P A R E K H D V Y
CCCCCGTTATGCCTGACCGGCTATGACGATGGACGGTGCCCGTCTTTGTGATCGACATA 19680
P L K I K T I P F D E G F K L Y A E L D
GGGCAGCTTGATCTTGGTGATTGGGAAGTCTTACCGAATTTTCAGATAGGCCTCAAGGTC 19740
N L N S I E S A M V V Y E K K I E Q A R
GTTGAGGTTGGAAATTTTCGGAGGCCATCACCACGTATTCTTTCTTGATCTCTGCGCTCG 19800
T Q R G A T F S V R A R R V E Q E G L I
CGTTTGGCGTCTCTGCAGTAAACGAAACCCGGGCGCGCCTAACCTCCTGCTCGCCGAGGAT 19860
A S A K I A T E A N A A A L I V Y N R F
CGCACTGGCCTTGATCGCTGTTTCGGCGTTCGCGGCGGCGAGGATGACGTAATTTTCGGAA 19920
C S L V T E A D E K G Y S A I L Q S W D
GCAAGAGAGCACTGTTTCGGCATCCTCCTTGCCATAACTGGCAATGAGCTGCGACCAATC 19980
Q L S G V M R L G H K R G K T A A P V F
CTGCAGGCTGCCGACCATGCGCAGGCCGTGCTTACGGCCTTTGGTTGCAGCGGGCACAAA 20040
S E L K G L S Q L E D L F L W L R K G T
GGACTCAAGTTTGC AAGCGATTGCAGCTCGTCCAGAAACAGCCAGAGGCGTTTCCCGGT 20100
M P E Y S L I T A C I T D I W M A V L P
CATGGGTTTCGTAACCTGAGGATCGTTGCGCAGATGGTGTGATCCACATGGCTACCAGCGG 20160
Q M T S R M D E R W T I Y L N G A D P D
CTGCATGGTGAACGCATGTCCTCCCGCCAGGTGATATACAGGTTGCCCGGCTCTGGATC 20220
T V W K H I S F N G K T M F R L P R I Y
TGTCACCCATTTGTGGATAGAAAAGTTGCCCTTGGTCATGAAGCGCAACGGGCGAATGTA 20280
K N M M F Q I S A I A K E A N D R F Y G
CTTGTTTCATCATGAACCTGGATGCTGGCAATCGCCTTTTCGGCGTTGTGCGGGAAGTACCC 20340
E S D T N A L F A R I T D G D E R V L L
TTCGGAGTCCGTGTTGGCCAGGAACGCCCGGATGGTGTGCGCGTCTTCCCGTACCAGTAG 20400
N V L T D Q N P N N T E K L K R M T D A
ATTTACCAGCGTGTCTGTTTCGGGTTGTTGGTTTTCCTTGAGCTTGCGCATGGTGTGCGG 20460
L V D R A Y A C W Q E D G P D V Q P P I
CAGCACGTACGCGCATACGCACACCATTGCTCATCGCCTGGATCGACCTGCGGCGGGAT 20520
I S K A M R D F D H V G K I E N F L T W
GATCGACTTGGCCATGCGGTCAAAGTCGTGGACACCTTTGATCTCATTGAACAGCGTCCA 20580
G A S R A D F P N L I V D G K F S F K S
ACCGGCTGAACGAGCGTGAATGGGTTGAGAATCACGTCGCCCTTGAAGCTGAATTTTCGA 20640
Y F T G N P D V V A L K D G R K L A S A
GTAGAACGTCCCCTTGGGATCGACCACGGCCAGCTTGTACCCGCGCTTCAGCGCCGAGGC 20700
M M S E M S V S K G A G I S A C I M T N
CATCATGCTTTCCATGGACACGGATTTACCCGCACCGATGGACGCGCAGATCATGGTGTT 20760

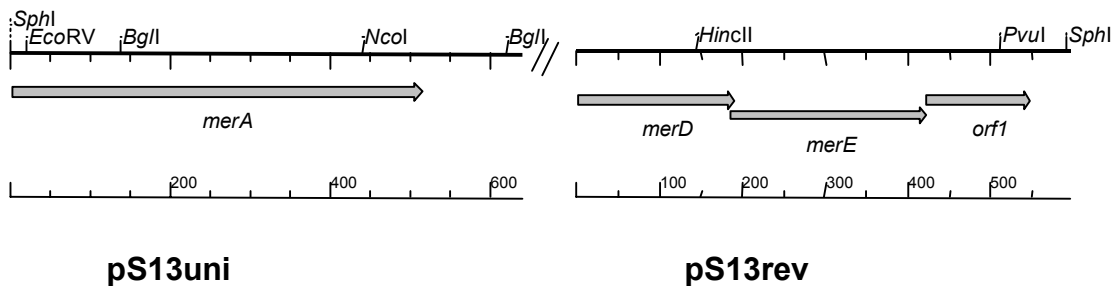
Anhang III

R D E L H L P M P V K G I M I P D L K P
 ACGGTCTTCAAGGTGCAGCGGCATCGGTACTTTGCCGATCATGATCGGGTCGAGTTTCGG 210820
 M G K K R R Q R N T Q G N R T R V K S D
 CATGCCTTTCTTGCGCCGCTGCCGATTGGTTTTGGCCGTTTCGAGTGCGTACCTTGCTGTC 210880
 V F H W N R I R S G R L H Q Q F R E G R
 TACGAAATGCCAGTTGCGAATGCGCGATCCCCGCAAGTGTTGCTGGAAGCGTTCGCCTCG 210940
 F G D D C Y E N L Y Y V L A G A A A V S
 AAAGCCATCGTCGCAATACTCATTGAGGTAGTAGACCAGCGCACCAGCCGCCGCGACGCT 211000
 A V T C S A M I P N Q L T Q H I T E R L
 GGCCACCGTGCAACTGGCCATGATGGGGTTCTGCAGTGTCTGGTGGATTGTCTCCCGAAG 211060
 A D P F P T F P M Q A L H A G G L W G A
 GCGTCCGGGAATGGGGTGAATGGCATTTCGCGGAGGTGAGCGCCGCCGAGCCAACCAGC 211120
 L P L G I G A T M T A N E V D Q K H M * D
 CAACGGCAACCCTATGCCTGCCGTCAATTGTGCGTTTTCAACATCTTGTTCGATCAG 211180
 E G S L R E I D K A L E P L L T A L V E
 TCCTCTCCTGATAGACGTTCTATGTCCTTAGCCAACCTCCGGCAGTAGGGTGGCTAACACT 21240
 E N S V L A S L E A R L E N L K G Q T S
 TCCTCGTTGCTTACCAATGCGGAAAGTTCGGCCCCGAATTCGTTGAGCTTTCCTTGTA 21300
 N Q R L L Y V V I A L I T R N T A Q A Q
 CTGTTCTGTGCGCAGCAGGTAGACCACGATGGCCAGAATGGTTCGATTTCGTCGCTGGGCC 21360
 D L S E L L A L T R Q Q D A W Q D V G G
 TGGTCGAGTGATTTCGAGCAAAGCCAAGGTGCGCTGCTGGTCGGCCCATTGGTCTACGCCG 21420
 Q H S D T K S P E L L R D R M Y T S L H
 CCTTGGTGACTGTGCGTTTTGGACGGCTCAAGCAGGCGATCACGCATGTACGTAGACAGG 21480
 K Y G A L A A S E E V R A L Q Q D N L R
 TGTTTATAGCCTGCCAAAGCAGCCGATTCTCGACCCTGGCCAGCTGCTGATCGTTCAAA 21540
 I P V T K G V
 CGTATCGGTACTGTCTTCCCCACGGTGCCCCCTTTTGGCGGTTGAAAACCTCCCTGAAAC 21600
 GGGAGTTTTTTGTTGCTGGCATCTTGATAACAAACGTAACACAAAATGCTAGTAAAA 21660
 TATGGCTTGTATGGTATATCTGTAATACAAACGTATCACGCTGCATTACGCGCAATTGG 21720
 CGCTGTAGCCCGTAGTGTACGCGGGGCCACACCTCCCGACAGGGTGGTGCCTGTTGTGTA 21780
 TTGAGATTTTGTATCCTGTTAAGGATCAAAAATCATGCTCTTAAGAGGGCGTATTCAGTGC 21840
 CTAGGCCGAAGGCCGTAGCAGGGGGGATACAAAGTAGGTGCAGAATGGGTGCTGTAAGGC 21900
 TTCATAGTGATTGCAGTTAGGGTTTAGATTGACTACAGATAGGGGGTGAGTAGGATGCAC 21960
 GTAGATAGCAACAAGGGTGCATAGAGGGTGCAATATGGCAAGGTTACGCCTAGCAGCTGC 22020
 M A R L R L A A
 ACTGAAGGCAGTTGAACCGGAAACCAAGGCAGCACAGATACGCCAGGTGATGCCGATTAT 22080
 A L K A V E P E T K A A Q I R Q V M P I
 TGAGCAACAACCTGAAGGCTGGAGTGAGACGCCAAGCGATCCTGAATGTGCTCAAAGAGCA 22140
 I E Q Q L K A G V R R Q A I L N V L K E
 GGGGATCGAGATCGGCATGGAGACGCTGAAAAGTTACCTGTATCGGTATCGGAAGGCGCT 22200
 Q G I E I G M E T L K S Y L Y R Y R K A
 CAAGGCAGAGGGAAAAAGTGACGCGGTGGATGTACCCAAACAACCAGCGATGGAAGCCCA 22260
 L K A E G K S D A V D V P K Q P A M E A
 GCCCAAGTCCAACCTAGAACCAAAACCGGAATCTGTATCGTACGATTCAGACAAGGACAA 22320
 Q P Q V Q L E P K P E S V S Y D S D K D
 TCAGCAGCAACCCACGCCAATGGCGCCGAGCGAACTGAGCAAAAATCATGAACCCTGGGGA 22380
 N Q Q Q P T P M A P S E L S K I M N P G
 CGATGTGAACGCCTCAGAAGTGGCCCCGTACGAAAGTGCGGGCCGTAGCAGAAGGAAAAG 22440
 D D V N A S E L A R Y E S A G R S R R K

Anhang III

hpp11 →
CACATGAGCAAGATCGCAGTAGTCAATTTTCAGCGGCAACACCGGCAAGACGACCGTATCG 22500
S T *
M S K I A V V N F S G N T G K T T V S
GATCAACTGCTGACGCCACGGATGAACGCGCCTCGGTTTCTATCGAGACGATCAACGCG 22560
D Q L L T P R M N A P R F A I E T I N A
GGTGCATCTGACACCGCTGCCGAGATCGAGCGCATGAAAGGTCGCCAGTTCGGCGAGCTG 22620
G A S D T A A E I E R M K G R Q F G E L
CAGGAATGGCTGATGGTTGAAACCAATGCCGTGGTTCGATGTGGGGGCTCGAACGTCGAG 22680
Q E W L M V E T N A V V D V G A S N V E
GACTTTTTCAAGTACATGGGCCAGTTCGCAGGCTCGCATGAGGAATTCGATTACTTCCTG 22740
D F F K Y M G Q F A G S H E E F D Y F L
GTGCCACGGTCGGCGAGAAAAAGCAGCATGCCGACACCATCAATACGATCAAGACGCTG 22800
V P T V G E K K Q H A D T I N T I K T L
GCCGCGCTGGGTG 22813
A A L G

Das Hybridplasmid pS13



Physikalische Karte des sequenzierten Bereichs aus dem Hybridplasmid pS13.
merA Gen für die Quecksilberreduktase, *merD* Regulatorgen, *merE* Resistenzgen
unbekannter Funktion, *orf1* hypothetisches Gen von *X. campestris*.

Sequenzen:

uni:

merA →
GCATGCGCAGCAGCGCAGTGGATATCTATGCAGCCGGCGACTGCACCAACCAGCCGCAGT 60
M R S S A V D I Y A A G D C T N Q P Q
TCGTCTACGTTCGCGGGCGGGCGGGCACCCGTGCGGCGATCAACATGACCGGCGGGCGAGG 120
F V Y V A A A A G T R A A I N M T G G E
CTACGCTCAATCTCGATGCCATGCCGGCGGTGGTGTTCACCGATCCGCAGGTGGCCACCG 180
A T L N L D A M P A V V F T D P Q V A T
TCGGTTACAGCGAAGCGGAAGCACAGCGCGCAGGCCTCGAAACCGACAGTCGCACGCTGA 240
V G Y S E A E A Q R A G L E T D S R T L
GCCTGGACAACGTGCCGCGTGCCTGGCCAACTTCGACACCCGAGGGTTCATCAAGCTGG 300
S L D N V P R A L A N F D T R G F I K L
TCGCCGAAGCGGGTTCCGGCCGGTTGCTCGGCGTACAGCGGTGGCCCCGGAAGCGGGCG 360
V A E A G S G R L L G V Q A V A P E A G
AGCTGATTCAGACGGGGTGCTGGCTATTTCGAAACCGCATGACCGTGCAGGAGCTGGCCG 420
E L I Q T G V L A I R N R M T V Q E L A

Anhang III

```

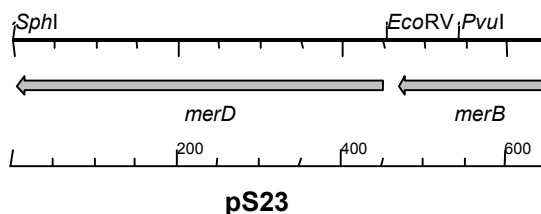
ACCAGTTGTTCCCTACCTGACCATGGTTCGAGGGCCTGAAGCTCGCGGCGCAAACCTTCA 480
  D Q L F P Y L T M V E G L K L A A Q T F
CCAAGGACGTGAAGCAATTGTCCTGCTGCGCCGGTAATGGCAAAGAGCGAGGTGGAAGC 540
  T K D V K Q L S C C A G *
ATGAGCAACACGGCAAGCGAACTCAGTAGGTGCGACAGCTTACGCCAGACCTGGCAGGTG 600
ATCAGCTTCTGGGGACTGCCTGCCGCGGTGGCGACGCTAACG 642
  
```

rev:

```

merD →
TCGAGTCCGGTATCGGGCTCGACGAATTGGCGCGGCTCTGTGCGAGCGCTCGATGCGGACG 60
  E S G I G L D E L A R L C R A L D A D
ATGGCTCCGACGTGATCGGCTGTGTGCGAGCGCCTGCTCCGGCTAATCGCGGGCCGGCAGG 120
  D G S D V I G C V E R L L R L I A G R Q
CGGCGTTAGCCGAGTGGAAACGCAGTTGACCGGACTGACCCACTGTGCCAACGAAGGTC 180
  A A L A A V E T Q L T G L T H C A N E G
merE →
ATGCCCATGCGTAACGCCGCCCGGACGAATCGACCAAGGGCTCCCGCTGGCGCGCTTAC 240
  H A H A *
  M R N A A P D E S T K G S R W R A Y
GCCTGGGGCGTGCTCGCCGCGCTCACTTGCCCCTGCCATCTGCCGCTGCTGGTCATTGCG 300
  A W G V L A A L T C P C H L P L L V I A
TTGGCTGGCACGACCGCCGGCGCCTTCTCAGCGCGCATTGGGGCGTCGTCGCGGTGGCG 360
  L A G T T A G A F L S A H W G V V A V A
CTGGTCGCCGTGTTTCAGTTTTTCTGTGCGGTTGGCCTGGCGTGCTGCACATACGGCCGGC 420
  L V A V F S F S V A L A W R A A H T A G
orf1 →
TCATGAACGTCGAGGCTTCTACGGCGCGCACCCGCACTGGTCTTGTGCGGGGGTGGCGTAC 480
  S *
  M N V E A S T A R T A L V L C G G G V
GAGGCGGATGCAGGTTGGCTTCTATCGAGCGATCGTCGAATTGGGATTGTCGTTTCGATC 540
  R G A M Q V G F Y R A I V E L G L S F D
TGGTAGTAGAAGTTCGGTGGGGGCCTTGAACGGCACCCCTGATCGCAGCCGGCATGC 596
  L V V E V R W G P *
  
```

Das Hybridplasmid pS23



Physikalische Karte des sequenzierten Bereichs des Hybridplasmides pS23. *merD* Regulatorgen, *merB* Gen für die Quecksilberlyase.

Sequenz

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Gegenstranges ist über der DNA-Sequenz dargestellt.

```

  H Q A P A T P M A A L Q V E L N A L A E 60
GCATGCTGTGCCGGCGCGGTTCGGCATGGCGGCCAACTGCACTTCCAGATTGGCCAACGCT
  R R R E V F Q R L V A L Q A A T E D C N
TCGCGCCGGCGGTTTCGACGAAGTACGCGAGCACAGCAAGCTGCGCGGCAGTTTCATCGCAG 120
  
```


Anhang III

```

A A D L A R C L R A L A G L G I G A E F
TTCGCCGCATCCAGCGCCCGGCACAGCCGCGCCAATGCGCCGAGGCCGATGCCCCGCTCG 180

A A R V F C L R Q L A A D D F L G Y G G
AAGGCGGCCCGCACGAAGCACAGTCGCTGCAAGGCGGCGTCATCGAACAGGCCGTAGCCA 240

T T C A V P R L L G R L L Y D R V I H V
CCCGTGGTGCAGGCGACTGGCCGCGAGCAATCCGCGCAGCAGGTAGTCGCGCACGATATGC 300

S V G A D L A L R S V T Y A N M S C R R
ACGCTCACCCCGGCATCAAGGGCCAGCCGGGACACCGTGTAGGCGTTCATCGAACACCTC 360

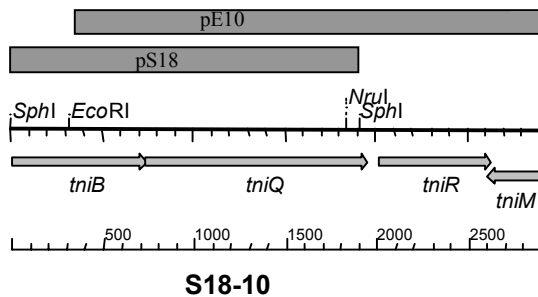
K T P E R C H M Y R K A S N L G R A A F
CTTTTGGTTCGTTTCACGGCAATGCATATAACGTTTTCGCCGAGTTCAATCCGCGCGCTGCG 420
      ← merD
G I G T G Y F M * P T R S S M
AATCCGATGCCGGTGCCGTAGAACATTGGGTCGATATCCGATCACGGTGTCTAGATGAC 480

T Q L L H R N F E Q G L G F A E H V S V
ATGGTCTGCAACAGATGTCGATTAAACTCCTGGCCCAAGCCGAAAGCCTCGTGGACACTG 540

I A L G E L G Q H K S A W D E A T P V S
ACGATCGCCAATCCTTCCAATCCTTGATGCTTGGAGGCCAGTCTTCCGCCGTCGGGACA 600
      ← merB
A F F H V H C C F S Q R V
GATGCAAAGAAATGTACATGGCAACAGAAGGACTGACGAACGT 631

```

Die Hybridplasmide pS18 und pE10



Physikalische Karte der sequenzierten Bereiche der Hybridplasmide pS18 und pE10. Transpositionsgene *tniB*, *tniQ*, *tniR* und *tniM*. Das Insert des Hybridplasmides pE10 hat eine Größe von ca. 10 kb und ist in der Zeichnung verkürzt dargestellt.

Kontig-Sequenz S18-10

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz und die des Gegenstranges über der DNA-Sequenz dargestellt.

```

tniB →
GCATGCCCAACCTGCTGTTGGTTCGCTCCAACCAACAACGGCAAGTCGATGATCGTCGAGA 60
  M P N L L L V G P T N N G K S M I V E
AGTTCGCCGCGCCACCCGGCCAGCTCCGACGCCGACCAGGAGCACATCCCGGTATTGG 120
  K F R R A H P A S S D A D Q E H I P V L
TCGTGCAGATGCCGTCCGAGCCATCGGTGATCCGCTTCTACGTCGCGCTGCTCGCGGCGA 180
  V V Q M P S E P S V I R F Y V A L L A A
TGGGAGCACCATTGCGACCGCGCCACGGCTGCCGAAATAGAGCAACTGGCGCTGACAC 240
  M G A P L R P R P R L P E I E Q L A L T
TGCTGCGCAAGCTCGGTGTGCGTTTGCTGGTGATCGACGAGCTGCACAACGTCTGGCCG 300
  L L R K L G V R L L V I D E L H N V L A
GCAACAGCGTCAACCGCCGGGAATTCCTCAACCTGCTGCGCTTCTCGGCAACGAATTGC 360
  G N S V N R R E F L N L L R F L G N E L

```

Anhang III

GCATCCCGCTGGTTCGGTGTGGGCACACGCGACGCCTACCTGGCCATCCGCTCGGATGACC 420
R I P L V G V G T R D A Y L A I R S D D

AGTTGGAAAATCGCTTCGAGCCGATGATGCTGCCGGTGTGGGAGGCCAACGACGATTGCT 480
Q L E N R F E P M M L P V W E A N D D C

GTTCACTGCTGGCCAGCTTCGCGGCTTCGCTCCCCTGCGGGACCTTCGTCGATTGCCA 540
C S L L A S F A A S L P L R R P S S I A

CGCTGGACATGGCTCGCTACCTGCTCACGCGCAGCGAGGGCACTATTGGCGAGCTGGCGC 600
T L D M A R Y L L T R S E G T I G E L A

ACCTTTTGGATGGCGCGGCCGTGGCCGCCGTGGAGAGTGGTGAGGAAGCGATCAACCACC 660
H L L M A A A V A A V E S G E E A I N H

GCACGCTCAGCATGGCCGATTACACCGGTCCCAGCGAGCGGGCGGCAATTTCGAGCGGG 720
R T L S M A D Y T G P S E R R R Q F E R

miQ →
AACTGATGTTGAAGCCAGCGCCACGCTGGCCACTGCATCCGGCACCCAGGGAAGCCGAAGC 780
E L M *
V K P A P R W P L H P A P R E A E

CCTGTCTTCGTGGCTCAACCGCGTGGCCCTTTGCTATCACATGGAAGTGTCCGAGCTGCT 840
A L S S W L N R V A L C Y H M E V S E L

GGAGCACGATCTTGGTCACGGCCAGGTTGATGACCTGGACACCGCGCCACCACTGGCGCT 900
L E H D L G H G Q V D D L D T A P P L A

GCTGGCGATGCTCTCCAGCGGAGCGGTATCGAGCTGGATCGGCTGCGCTGCATGAGTTT 960
L L A M L S Q R S G I E L D R L R C M S

CGCCGGCTGGGTGCCTTGGCTACTGGACAGCCTTGATGATCAGATTCCAGCCGCATTGGA 1020
F A G W V P W L L D S L D D Q I P A A L

AACCTATGCGTTCAGCTCTCGGTACTGCTGCCGAGACTCCGCCGTAAGACGCGATCCAT 1080
E T Y A F Q L S V L L P R L R R K T R S

CACGAGCTGGCGTGCCTGGCTGCCCACCCAACCGATAACCGCGCCTGTCCGCTCTGCCT 1140
I T S W R A W L P T Q P I H R A C P L C

GAACGATCCGGAGAACCAAGCCGTACTGCTCGCGTGAAGCTGCCCCCTGATGCTGAGCTG 1200
L N D P E N Q A V L L A W K L P L M L S

CCCCTGCATGGCTGCTGGCTGGAATCCTATTGGGGCGTGCCAGGGCGGTTTCTCGGCTG 1260
C P L H G C W L E S Y W G V P G R F L G

GGAGAACGCCGACGCCGAACCGCGCACTGCCAGCGACGCGATTGCGGCGATGGACCAGCG 1320
W E N A D A E P R T A S D A I A A M D Q

TACCTGGCAGGCACTGACGACCGGCCACGTGGAGTTGCCGCGCCGACGCATCCACGCCGG 1380
R T W Q A L T T G H V E L P R R R I H A

ATTGTGGTTTTAGGCTGCTACGCACGCTGCTCGATGAGCTGAACACCCCGCTTTCGACGTG 1440
G L W F R L L R T L L D E L N T P L S T

CGGCACCTACGCGGGGTATCTCCGCCAAATCTGGGAATGCTGCGGGCATCCGCTGCGTGC 1500
C G T Y A G Y L R Q I W E C C G H P L R

TGGGCAAAGTCTGTGGCGACCGTATGAAACCCTGAACCCGGCAGTACGGTTGCAGATGCT 1560
A G Q S L W R P Y E T L N P A V R L Q M

GGAGGCGGCGGCAACCGCAATCAGCTTGATTGAGGTGAGGGATATAAGCCCGCCAGGCGA 1620
L E A A A T A I S L I E V R D I S P P G

GCACGCAAAGCTATTCTGGTCCGAGCCCCAAACCGGGTTACACAGTGGCCTGCCGGCGAA 1680
E H A K L F W S E P Q T G F T S G L P A

AGCGCCGAAGCCCGAACCCGTGCATCACTGGCAGCGTGCAATCCAGGCCATTGATGAGGC 1740
K A P K P E P V D H W Q R A I Q A I D E

CATCATTGAAGCACGACACAACCCCGAGACGGCACGCTCGCTGTTTCGCGTTGGCTTCCTA 1800
A I I E A R H N P E T A R S L F A L A S

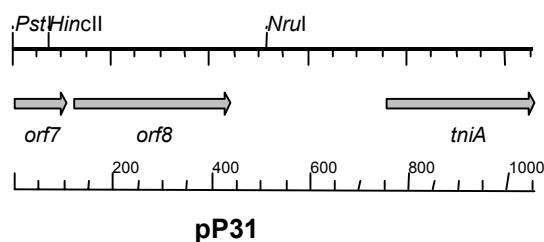
Anhang III

```

TGGTCGGCGCGACCCCGCTTCCTTGGAACAGTTGCGCGCCACCTTCGCGAAGGAAGGCAT 1860
Y G R R D P A S L E Q L R A T F A K E G
CCCCCGGAATTTCTGTACATTATGAGCCTAGCCTACCCTTTGCATGCCTTAGACAGAA 1920
I P P E F L S H Y E P S L P F A C L R Q
TGACGGGTAAAGTGACAAATTTTGACGTGCAGAGCTTCCCGATGCAAACCTGTCACATAAT 1980
N D G L S D K F *
CGAACGTATATGTGACAGGTACAAGATGCTGATTGGCTACATGCGAGTATCGAAGGCGGA 2040
M L I G Y M R V S K A
TGGCTCCCAGGCGACGGACTTGACGCGCGATGCGCTGGTTCGCGGCCGGTGTGATCCGGC 2100
D G S Q A T D L Q R D A L V A A G V D P
GCATCTCTATGAAGACCAAGCGTCCGGAACCGCGAGGATCGTCCCGGTCTGGCGAGCTG 2160
A H L Y E D Q A S G K R E D R P G L A S
TCTGAAGGCACTACGGCCAGGCGACACGTTGGTTCGTTTGGAAACTGGATCGGCTCGGGCG 2220
C L K A L R P G D T L V V W K L D R L G
CGACCTGCGCCATCTGATCAATACCGTCCATGACCTGACCGGACGCGGCATCGGCCCTCAA 2280
R D L R H L I N T V H D L T G R G I G L
GGTGCTGACCGGGCACGGCGCGCCATTGACACCACGACCGCCCGCCGGCAAGCTGGTCTT 2340
K V L T G H G A A I D T T T A A G K L V
CGGTATCTTCGCCGCGCTGGCCGAGTTCGAGCGCGAGTTGATCGCCGAGCGCACCGTGGC 2400
F G I F A A L A E F E R E L I A E R T V
GGGCCTGGCCTCAGCACGGGCACGCGGCCGGAAAGGCGGCCGGCGTTCAAGATGACCGC 2460
A G L A S A R A R G R K G G R P F K M T
CGCCAAGCTGCGGCTGGCGATGGCGGCAATGGGGCAGTCAGAGACCAAGGTTCGGCGACCT 2520
A A K L R L A M A A M G Q S E T K V G D
GTGCCAGGAACTTGGCATCACGCGGCAGACCCTGTATCGGCATATTTACCCAAAGGGCGA 2580
L C Q E L G I T R Q T L Y R H I S P K G
* E A S N S A S M L R R L
GCTACGTCCAGATGGCGAGAAGCTACTCAGCCGAATTTGATGCCGACATGAGGCGACGTA 2640
E L R P D G E K L L S R I *
S L T T Q R L K V A P S G C A N P E G S
GCGAAAGCGTGGTTTTGTCTCAATTTGACGGCGGGCGAACC GCAAGCGTTTCGGTTCGCCGC 2700
T E T A T S A R A Q F R Q Y C E L G C F
TCGTTTCGGTTCGAGTGTCTGGCCCCGCGCCTGGAAACGTTGATAACACTCCAGCCCGCAGA 2760
H E V Y E A G E P T F A A D L P I E K C
AGTGCTCGACGTACTCCGCGCCTTCCGGTGTGAAGGCGGCATCGAGCGGAATTTCTTGC 2820
C V C C S T A T P D N A N M T A G E M S
AGCACACGCAGCAACTGGTGGCGGTCGGATCATTTGCATTCATGGTGGCACCCCTCCATTG 2880
Q R ← tniM
ACTGACGA 2888

```

Das Hybridplasmid pP31



Physikalische Karte des sequenzierten Bereichs des Hybridplasmides pP31. Die Genprodukte ORF7 und ORF8 zeigen Ähnlichkeiten zu hyp. Proteinen von pWW0, *tniA* Transpositionsgen.

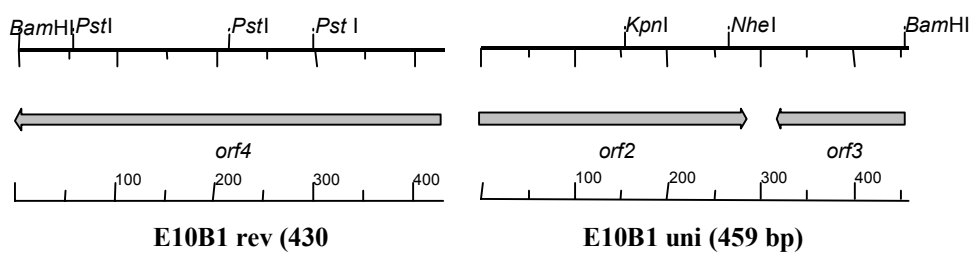
Sequenz

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *tniA* ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.

```

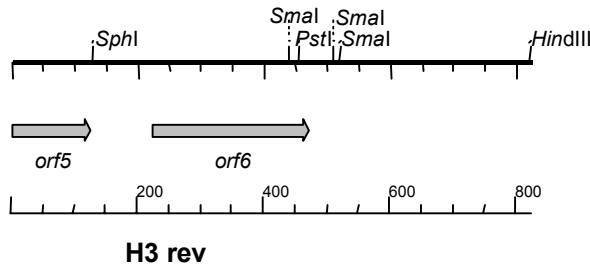
GGCTGCAGCGTCAATATGGCCGCACGGCAACGGTTCCGAGCTGTTGCGCAAGGCCGAACA      60
GTGCCGCTCGCTGGTTGACGTGGACACTCCAGACGAAATGGATATTTGAGGATCTGCAAG      120
CATGGACGAACAGACTGAGCGTGAACGACTACCTAAGCCTCCTTTTCTGGACGGA      180
AACCGCCTCGGTTGCCGAGATTCAAGGCGCTATGTTGGTTCGCATCTGGTGTCAACAAAGA      240
AGACCTGAAAATGGCGATCAGGTGCATGATGGATTGAGACCGTCCGGCCCTGGCGAACGA      300
CTTTCCCGAACTGCTCGCAAATCGAGTCACGTTGTTCGGGACTTCGGAGCCAACACATCGA      360
GTTAGCAGAAGCTATGTGTAACGGCTTGCATTTGAAAACGGCCGGACTCGCAATCATCTC      420
CATTTCCAGCTCAGATTAACGCGACTGACGATGCGCTCGGGCTCACATTCGCTGCGAGT      480
GAACTTGCATTACCCGCGCCGGCTTGCATTCCATCGCGATGGGCTCACGCTTTCTGCAA      540
CTGAACATCACCACCACAATCCGTCCAACAAACCAGGGTTTGGTGGACGCCAGCCTCTCG      600
GCAGGCAACCTGTCATTTTTCAGAAGACGACTGCACCAATTGACGGGGCGTAACGCCAGGT      660
GTGCAGTCGGCTCCTGACCACGCAATATCAGAAGTCATCTGCACCAATCTCGACTATGCT      720
                                     tniA →
CAATACTCGTGTGCACCAAAGCGAGGTGTGAGCATGGCGTCAGACACATTACCAATTGCC      780
                                     M A S D T L P I A
GAGCAGGGCGTGGCCACCCTGCCCGATGCGGCATGGGCACAGGCCCGGCACCGGACCGAA      840
  E Q G V A T L P D A A W A Q A R H R T E
ATCATCGGGCCGCTGGCAGCGCTTGAAGTGGTTGGGCATGAAGCCGCCGATGCCGCTGCT      900
  I I G P L A A L E V V G H E A A D A A A
CAAGCGCTGGGCCTATCCAGGCGGCAGGTGTATGTCCTGATCCGGCGTCCCCGCAAGGT      960
  Q A L G L S R R Q V Y V L I R R A R Q G
GCTGGGTTTGTGACGGACCTGGTTCCCGGCCAGTCCGGCGGGGAAAAGGCAAGGGACGC      1020
  A G F V T D L V P G Q S G G G K G K G R
TTGCCGGAATCAGTTGAGCGCATCATCCGCGAGTT      1055
  L P E S V E R I I R E
    
```

Das Hybridplasmid pE10B1



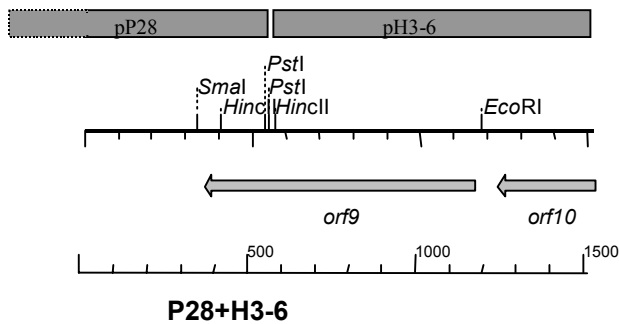
Physikalische Karte des sequenzierten Bereichs des Hybridplasmides pE10B1. Die Genprodukte ORF3 und ORF4 zeigen Ähnlichkeiten zu hyp. Proteinen von pWW0, ORF2 zu einem Protein von *Pseudomonas* sp. TW3.

Das Hybridplasmid pH3



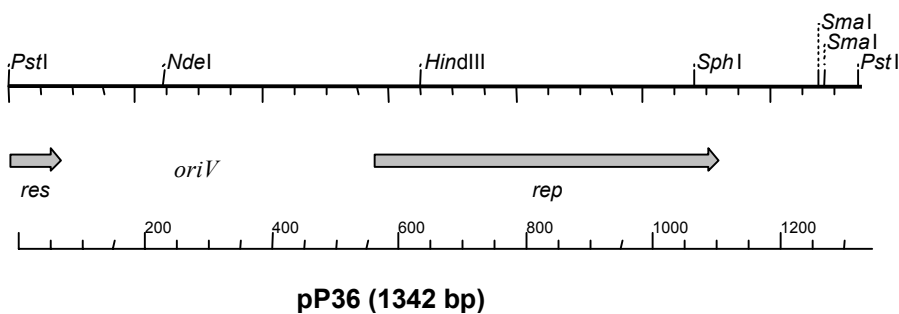
Physikalische Karte des mit dem reverse Primer sequenzierten Bereichs des Hybridplasmides pH3. Die Genprodukte ORF5 und ORF6 zeigen Ähnlichkeiten zu hyp. Proteinen von pWW0. Das Insert von pH3 hat eine Größe von 11.5 kb und liegt in der Transferregion von pBI709 (siehe Abb. 21).

Die Hybridplasmide pP28 und pH3-6



Physikalische Karte der sequenzierten Bereiche der Hybridplasmide pP28 und pH3-6. Die Inserts der Hybridplasmide sind durch Balken angedeutet. Die Genprodukte ORF9 und ORF10 zeigen Ähnlichkeiten zu hyp. Proteinen von pWW0. Das Insert des Hybridplasmides pP28 hat eine Größe von 8 kb.

Hypothetische oriV-Region von pBI709



Die DNA-Sequenz dieser Region ist auf der folgenden Seite gezeigt.

Die DNA-Sequenz des sequenzierten Bereichs des Hybridplasmids pP36.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind unter der DNA-Sequenz dargestellt. *direct repeats* (DR) sind unterstrichen, *res* Gen für eine putative Resolvase, *rep* Gen für das Replikationsinitiationsprotein.

<i>res</i> →		
CTGCAGCCAGGCACGCGAAATGCTCGACAACCACTGTGCTCAAAATCCGTGACCAGTTGA		60
A A R H A K C S T T T V L K I R D Q L		
GCCGGTCGGAAGTGACTGACTAGCGAAGGCGTAGCCGTAGTCTGTTCGGGCGCTTACGAGT		120
S R S E V T D *		
GGCTGCTGCCGCAGGCGACTTTGCCTGATTAACAGCAAACGCAGAAGGTGACAGGTTGAG		180
ATCATAAGAAGCAGGAGTTGCGAACCCCTTGATTTACGGGGCTTCCAGAGCAGTAGG TAGC		240
TCA ACATATGAGCGAACCTTCGGTCATGGTTGATGAACCAACCTCGCTCATAGTGCGTGA		300
	DR1 DR1 + DR2	
CCTAACCTAGCTCACCTGAT TGAGCTACCC AAAC ATGAGCTACCC CCTGGCTCATCCTTG		360
	DR1 + DR2	
CTCGATAGCAAACAGCCAT TGAGCTACCC GTAGCTCATACGG TGAGCTACCC CCTAGCTCAT		420
	DR3 DR4	
<u>TTCTTGACGCTATCTGACAAGCCTGTGAGATAGCGAACAAATTTGATCTACCCATAGAG</u>		480
	DR3 DR4	
CACTGTG TGAGCTACCC CCTGGCTCATTCTTGACGCTATCGCGCAAGTTTGAGAGATAGC		540
	<i>rep</i> →	
<u>GAACACA</u> ACTTGGATGATCTGACAGGAGGGTCAATGTCTGAGGAAATCCGCAACCTACAC		600
	M S E E I R N L H	
CAACCCGCGCCACGCGGGACATGGGTACAGACAGAGCGTGCTGGGCACGAAGCTTGGGCA		660
Q P A P R G T W V Q T E R A G H E A W A		
CAGCTCATAGCGCACGCTCCGCGTGCTGCTCAGTTGCTACACATCCTAGTTGCAAACATG		720
Q L I A H A P R A A Q L L H I L V A N M		
GACAAAAGCGGTGCTCTGATCGCCAGCCAAGCCACATTGGCCAAGCTGATGGAAACCTCG		780
D K S G A L I A S Q A T L A K L M E T S		
ACCGCGACCACCAAGCGAGCCTTGTCGGTGCTGATCGATCAGGCGTGGATTCAAACCATC		840
T A T T K R A L S V L I D Q A W I Q T I		
AGGCTCGGCAGTGATCGAGGCGGCGCACTGGCGTACGTGGTCAACAGCCGAATCGCTTGG		900
R L G S D R G G A L A Y V V N S R I A W		
GCTGATAGCCGCGAGAACATCCGGTTTGC GCGTTTCAATGCGCGAGTGCTGGTGTCTGTCG		960
A D S R E N I R F A R F N A R V L V S S		
GAAGATCAAAGCGATCTTGGCACCGGGAAGCTGCTGAAAGCGCCAGTCATGGAACCAGGT		1020
E D Q S D L G T G K L L K A P V M E P G		
GATATGCAGTTACCTGCCGGTGATGGCATGAACCCGCCAGTTCAAGAAACACTGGAAGGC		1080
D M Q L P A G D G M N P P V Q E T L E G		
ATGCTGCCTGATTTGCCGTGATCACGGACAAGGCCTAAAAACGACGAAACCCGCAGCAC		1140
M L P D L P S I T D K A *		
GGCAATGCTTGCGGGTTTCTAGGTTTCTGCGAAGGAGCAAAGACCGTAGCGCCATTCTA		1200
CCCCGGCACGTGTTTTTTGCCACTGCTCGTACTTGCGGTTTATATCGTACGATACAGAA		1260
AAATGCTATTGGCCCGGGCCAGCCGGGCGATGCAACAGCCGCGATCAGGATCTGTGCC		1320
GGCTCAGGAAATCCCCCTGCAG		1342

Sequenzvergleich der Plasmide pBI709 und pWW0

Die Alignments wurden nach der Wilbur-Lipman Methode, mit den folgenden Parametern: K-tuple 3, Gap 3, Window 20, durchgeführt.

Gen/Bereich	% Übereinstimmung
<i>mpfA</i>	57.2
<i>mpfB</i>	59.8
<i>mpfC</i>	72.4
<i>mpfD</i>	86.8
<i>mpfE</i>	64.8
<i>mpfF</i>	65.0
<i>mpfG</i>	74.9
<i>mpfH</i>	53.8
<i>mpfI</i>	70.0
<i>mpfJ</i>	63.3
<i>nuc1</i>	76.4
<i>nuc2</i>	68.3
<i>traA</i>	61.8
<i>traB</i>	72.4
<i>traC</i>	70.6
<i>traD</i>	57.2
<i>oriT</i>	54.3
<i>oriV</i>	53.4
<i>parA</i>	60.0
<i>parB</i>	54.6

Sequenzen von pBI1063

Im Folgenden wird die DNA-Sequenz der in Abb. 22 (Seite 129) gezeigten Transferregion von pBI1063 dargestellt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Hinstranges sind unter der DNA-Sequenz, die des Gegenstranges über der DNA-Sequenz dargestellt.

Die Transferregion

```

G M M L S A I E A R L E E R A Y G A S G
CACCCATCATCAGGGAGGCGATTTTCAGCACGCAGTTCCTCGCGCGGTATCCCGCAGACC      60
F P H S L D R G L R Q P H G T W H G L E
CGAACGGGTGCGAAAGGTCGCGGCCAAGCCGTTGCGGGTGACCGGTCCAATGCCCCAGCT    120
H L A T S Y Y G S P E H F Q E R D P L T
CGTGCAGCGCAGTAGAGTAGTACCCGCTCGGTTTCATGGAAGTCTCGCGGTCTGGCAGGG    180
I A D A S P S Y Y A K D G G H Q I R A G
TGATCGCATCCGCCGAGGGGCTGTAGTAAGCCTTGTCCCCGCCATGCTGAATCCGGGCAC    240
S S R L I A E A A A H R E M E P A M P R
CCGAAGTGCAGGATCGCTTCAGCGGGCGGTGCCGCTCCATCTCGGGCGCCATCGGGC      300
A E A P P L G E I Q Q A N F V V A H F V
GCGCCTCCGCCGGCGGCAGTCCTTCGATCTGCTGGGCGTTGAACACCACCGCATGGAAAA    360
R P S T Y E V K Q Q K I S G D P N K V Y
CGCGCGGACTGGTGTATTCCACCTTCTGCTGCTTGATTGAACCGTCCGGATTCTTCACGT    420
E G T E D R V P E T G H F K W Y E I K T
ACTCGCCGGTCTCGTGCGGACCGGTTTCAGTGCCGTGGAAGTTCAGTATTTCGATCTTCG    480
G K Q G R R V Q A G Q A Q A Q K Y T L W
TGCCCTTCTGCCCACGGCGCACCTGGGCACCTTGGGCCTGGGCTTGCTTGTAGGTCAGCC    540
R S D S F G R S M L Y V S N I G R Y E N
AGCGAGAGTGCCTGAACCCGCGGCTCATCAGGTACACGGAATTGATGCCGCGGTACTCGT    600
G S T P N Y P R F R E G P K W P R Q W P
TGCCGCTGGTTCGGGTTGTAGGGGCGGAATCGCTCACCAGGCTTCCACGGTCTCTGCCAAG    660
A V G R Q L Q D I L S Q S V E D A Y N S
GGGCAACACCGCGCTGCAGCTGGTCGATAAGCGATTGGCTTACCTCGTCGGCGTAGTTAC    720
← traC2
A M
G D N G G R V P A L K S V T L G A K H R
TTGCCATCGTTGCCGCCACGGACGGGAGCCAGCTTGCTGACGGTCAGGCCGGCCTTGTGC    780
S Q A V A E P T T D A D D L S A N A D W
CGGGACTGGGCAACTGCTTCCGGCGTGGTGTCCGCATCGTCCAGTGAAGCATTTGCATCC    840
A S E E S L A T E E F A G M R E A E D A
CACGCGGACTCTTCGAAAGCGCCGTTTCTCGAACGCACCCATGCGTTCGGCTTCGTCT    900
G V Q V M V G P I S A D Q V S R S Y V I
GCGCCGACCTGGACCATGACGCCTGGAATGCTGGCGTCTGCACGCTGCGCGAGTAGACG    960
T D D G A G P Q T D T T P Q Q N M R K T
ATCGTGTACATACCGGCACCCGGCTGGGTGTCGGTGGTTCGGTTTCATTCGCTTG    1020
E K R T F V T T E T S P D Y S P A T Y Q
GTCTCCTTGGGGTAAAAACGGTGGTTTTCGGTACTGGGGTCATAGCTCGGTGCGGTGTAC    1080
M A V P P G D I R Q I Y R N V Y G N S F
TGCATTGCGACCGGTGGGCCGTCGATGCGCTGGATGTAGCGATTGACGTAGCCGTTAGAA    1140
G N R F N G T N Y A S L S A L L A Q Q G
AATCCGTTGCGGAAGTTGCCGGTGTGTAGGCCGAGAGCAAGCAAGCAAGGCCTGTTGT    1200

```


Anhang IV

G G F Q G S A S R Y F T T L I Q A G A S
 CCACCGCCAAATTGGCCCCGACGCTGATCGGTTAGAACGTGGTGAGGATCTGAGCGCCTGCC 1260

I N T C P E F M E A V S F G L K P L N H
 GAAATGTTTCGTGCATGGCTCGAACATCTCTGCGACTGAGAACCCCAACTTGGGGAGGTTG 1320

S N V Q M L G M D V S Y G A Q I L P T V
 TGGCTGTTTACCTGCATCAAACCCATATCGACGCTGTAACCCGCTTGGATCAGCGGGGTA 1380

I A V A E A A T T P A R Y S P K A H G K
 ACGATCGCGACCGCCTCGGCGGCCGTGGTGGGCGCCCGATAGCTGGGCTTCGCGTGCCCC 1440

R A N V N I A L P N G R S E V H I I H Q
 TTTTCGCGGTTGACGTTGATCGCAAGGGGGTTGCCCTGCTCTCCACATGAATGATGTGC 1500

← *virB1*

V T E P A V Q P A C M L L L D L G L M
 * P R A H
 TGCACTGTTTCGGGCGCAACCTGGGGCGCGCACATGAGAAGAAGATCAAGGCCGAGCATG 1560

T S S R D S F I A A S D G R V L L P T A
 GGTGCTGCTCCTGTCACTGAAGATGGCTGCGGAGTCGCCACGCACCAACAACGGTGTTCG 1620

I G R V D Q Q H L P G F Y R S D F S H D
 GATGCCGCGAACGTCCTGTTGATGCAAGGGTCCGAAGTACCGCGAATCGAAGCTGTGATC 1680

T Y S S V V W L Q D R Q V V Y R G E K V
 GGTGTAGCTGGATAACCACCCACAACCTGATCGCGCTGCACGACATAACCGCCCTCCTTGAC 1740

A P I G L I L D A S G S N R L P H G N V
 GCGGGTATGCCAAGAATCAGATCGGCCGATCCGCTATTTTCGAGCGGGTGCCCATTCGAC 1800

S I A G R L V E V T D G E V A V V P K L
 CGAAATGGCACCGCGCAGTACCTCGACGGTGTACCTTCGACGGCCACGACAGGCTTCAG 1860

F P V T A S P C P R P A I W H F V G W D
 GAACGGAACCGTCGCGGATGGACAGGGCCTCGGCGCAATCCAGTGAAACACCCCCCAATC 1920

A A I H G A D R L R T V L E I D P P C I
 AGCTGCGATGTGTCCCAGCTCTCGCAGCCGGGTAACCAGCTCGATGTCCGGCGGACAGAT 1980

A V T A G R S V P L A V D A V R W V G A
 GGCCACAGTGGCGCCTCGGCTCACCGGGAGCGCTACGTCCGCCACTCGCCACACGCCGGC 2040

P A S A S V N L R F G A S Y G V L A L V
 CGGCGCCGAGGCGGACACATTCAGCCGAAACCCTGCCGAGTAACCGACCAACCGGAGTAC 2100

← *traF*

G L S V A A G M L V G A A P R R S L M
 * H
 ACCAAGGCTTACGGCGGCACCCATCAGGACACCTGCTGCAGGTCGACGGCTCAGCATCAG 2160

V R F E E V A V G A D M G Q D H G D E L
 TGCACCCGGAACCTTCGACCGCTACGCCCGCGTCCATGCCTTGGTCATGCCATCTTCG 2220

Y P N D E D P A L L P A P A S W A P S E
 AGATAGGGGTTGTCCTCGTCGGGCGGAGGAGCGGCGGGGCGGCTCCAGGCTGGCGAT 2280

Y P L G W R K S M Q P D L F Y V S Q V G
 TCATAGGGCAGACCCCACCGCTTGCTCATCTGCGGATCCAGGAAGTAGACCGACTGCACG 2340

R I V A T G A V F I L M E G P A I V R G
 CCGCGAATGACAGCAGTACCAGCGACGAATATCAGCATTTACCTGGTGCAATAACGCGG 2400

E K T K K A G P L T R I E D A T M L P R
 CCTTCCTTGGTCTTCTTGGCACCTGGCAGCGTCTGATTTTCGTCGGCCGTCATGAGCGGT 2460

Q Q E E I S V S V N Q H M A A M R K G S
 CGTTGCTGCTCCTCGATGCTCACCGAAACGTTCTGATGCATCGCCGCCATTCGCTTGCCA 2520

L T T K E K M Y T S T G T M K S L I D A
 GAAAGCGTGGTCTTCTCCTTCATGTACGTGCTCGTACCGGTCATCTTCGACAGGATGTCT 2580

T E P R N P A F A A L I H C N A I I Q E
 GCCGTCTCCGGGCGGTTGGGGGCAAACGCAGCCAGGATGTGGCAGTTTCGCGATGATCTGT 2640

Anhang IV

E P G Y A E R S R L Q S F D Q M I L M A 2700
 TCTTCGGGGCCGTATGCCTCACGGGAACGCAGCTGGGAGAAGTCCTGCATGATGAGCATC
 K I G Y G A M Y A L N E Q L V E L K G F 2760
 GCCTTGATGCCATAGCCGGCCATGTAAGCGAGATTTTCTGCAGGACCTCCAGCTTGCCG
 S P L E D F L L L L R R K H P S V E R G 2820
 AAGCTTGGAAGTTCGTCAAACAGCAAGAGCAAGCGGCGCTTGTGCGGAGACACTTCGCGG
 N V M Q I S P R L L V R L I Q S K V L R 2880
 CCGTTGACCATCTGAATCGAGGGCCGCAACAGAACCCCGCAGGATCTGGCTCTTGACGAGC
 I L P K M R D K N E P S P C L Y L T I P 2940
 CGGATCAGCGGTTTTCATGCGGTCTTTGTTCTCGGGGGACGGGCACAGATAGAGCGTAATG
 D D A N M L D M V Q F D S H A V N G R V 3000
 GGGTCATCAGCGTTCATCAGGTCCATGACCTGGAAGTCGCTGTGTGCAACATTGCCGCGC
 I P D D Y L S F F S Q A T S L V S G Q E 3060
 ACAATCGGGTCGTTCGTACAGCGAGAAGAAGGACTGCGCCGTCGACAACACCGAACCCCTGC
 E E P R D A Q T R G Q K A V A M H V Q G 3120
 TCTTCTTCTGGCCGATCAGCCTGCGTGCGACCCTGCTTCGCAACGGCCATGTGCACCTGG
 N L H T N N M M E E Y L E T H A R Q P N 3180
 CCATTGAGATGAGTGTTGTTTCATCATCTCTTCGTACAGCTCGGTGTGAGCACGCTGGGGA
 S M A D S V D G L N A C R G E G D R V Q 3240
 TTGGACATCGCGTCGCTTACATCGCCGAGGTTGCGGCATCGGCCTTACCATCGCGAACC
 Y L V H L V L G V L F Q Q A T K E F H G 3300
 TGGTAGAGCACATGCAGAACCAATCCGACCAGGAAGTCTGGGCGGTCTTTTCAAAGTGG
 L R D M G K G S P D V I V T T I N Q V D 3360
 CCAAGCCTGTCCATGCCCTTGCCGGATGGGTCCACGATCACGGTGGTGATGTTCTGCACA
 G V E Y P T G L R V E A L P N F R T P S 3420
 TCGCCAACCTCGTATGGCGTGCCCAACCGGACCTCTGCGAGGGGATTGAACCGGTTGGT
 T P S S P A F K L I R N K A Y K S R W G 3480
 GAGGTAGGGCTGCTCGGTGCGAACTTGAGGATCCGATTCTTGGCGTACTTCGAGCGCCAT
 A T G N F L E E K L D G V V V S D P W S 3540
 CCGGCGGTGCCGTTGAAAAGCTCCTCCTTCAAGTCGCCGACCACAACACTATCCGGCCAG
 L L T N N V I S I G K G S R T P A V V A 3600
 GAGAGCAGCGTGTGTTGTTACGATGCTGATGCCCTTGCCAGAGCGGTGGGTGCAACAAC
 V H E P G N H R L Y R L V G K E D R W G 3660
 GCGACATGCTCGGGCCCGTTGTGTCTGAGGTAGCGCAAAACGCCCTTCTCGTCGCGCCAG
 G V F V G T G K K G E A P L L G A E E I 3720
 CCACCGACGAATACACCAGTGCCCTTCTTTCTTCTGCCGGCAGCAATCCGGCCTCCTCG
 E A R K A F H A T G H A D L H Q K L K R 3780
 ATTTTCAGCGCGCTTGGCGAAGTGTGCGGTGCCATGCGCATCGAGGTGCTGCTTCAACTTG
 N K L G H T L V Y A G L G I G A G S L F 3840
 CGATTCTTCAGGCCGTGGGTGAGCACATAGGCGCCCAACCCGATACCTGCGCCGGACAAG
 G V Y T N N F T A P A S N Y F K A Q W S 3900
 AACCCGACGTAGGTGTTATTGAAGGTCGCGGGAGCAGAGTTGTAGAACTTTGCCCTGCCAG
 F W S W P A Y F H A F L P E G L A P H Y 3960
 GAGAACCATGACCAGGGGGCATAAAAATGGGCGAACAACGGTTTCGCCCAATGCCGGGTGG
 K L R G A A Y Q T C L S S V V G W Y L T 4020
 TACTTCAAACGGCCTGCCGCGTACTGCGTGCAAAGCGACGAAACAACACCCAGTACAGA
 L A P I G I A H F R K E R D K I E E T V 4080
 ← *traG*
 *
 GTCAGCGCAGGGATGCCGATGGCATGGAACCGCTTCTCTGTCTTGCCTTGATTTCTTCTGTC

Anhang IV

R R R G R S T D V F R G R E D L V V A Q
ACCGTCTTCGACCTCGTGATGTATCGACGAACCGACCACGCTCGTCCAACACGACGGCCT 4140

G V K F R S A K A A V A A T V P K V L T
GGCCAACTTTGAATCGGCTGGCCTTGGCAGCAACAGCAGCGGTGACTGGCTTTACCAAGG 4200

Q G Q R G L L V V E S G D E M R R R G Q
TTTGGCCTTGGCGACCCAGCAAGACCACCTCGCTTCCATCCTCCATCCGGCGGCGACCTT 4260

Y T A E G A D T S V W L R T Y D I D S V
GGTAGGTTGCCTCGCCGGCATCGGTGGATACCCATAGCCGCTATAGTCTATATCAGATA 4320

R H A T N N R Q A V W K I V A P S P T E
CGCGATGGGCGGTGTTGTTCCGCTGAGCGACCCATTTGATAACGGCCGGGCTGGGCGTTT 4380

K A G T K L V A D G I S G D A V Q G V K
CTTTCGCCCCAGTTTTGAGAAGTGCATCGGTCACCGATTGACCCATCCGCAACCTGCCCCACT 4440

T P K S T P Q Q G S D P S P Q V T P A P
TCGTGGGCTTGGATGTTGGCTGTTGGCCGGAATCGGGGCTTGGCTGCACCGTAGGAGCGG 4500

G A A Q N P T A A V T N S P Q P K A Q K
GTCCGGCGGCCTGGTTCGGTGTGCTGCGACTGTGTTGCTGGGCTGCGGCTTGGCCTGTT 4560

A L A A A R D A S A K A A Q Q R H A E M
TGGCCAGCGCGGCTGCGCGATCGGCCGACGCTTCGCTGCCTGCTGGCGATGTGCTTCCA 4620

G A D A F R V Q V A K T G A L E A V Q L
TGCCGGCGTCCGCGAACCGCACCTGTACGGCCTTGGTGCCAGCCAGCTCAGCGACCTGTA 4680

R F E E T G E V V L P Q G P F K A A A L
GGCGAACTCTTCTGTCCCCTCGACGACTAGGGGCTGCCAGGAATTTGGCCGAGCCA 4740

S L A I F A A T A T S K V S R V E G G R
GGCTCAAGGCAATGAATGCCGCGGTAGCGGTGGACTTTACCGACCGCACCTCTCCTCCTC 4800

D I V L G G D S T K Y H I E G S R A V R
GGTCGATGACCAAACCACCATCGCTGGTTTTGTAGTGGATCTCCCCACTCCGAGCTACGC 4860

P K L H K F V I A R A K E A D P A T L L
GGGGCTTCAGATGCTTGAAAACGATTGCCCTTGCCTTCTCGGCATCAGGGGCAGTGAGCA 4920

D L H T K I L R N A R A R M L A L A D Q
AATCAAGATGGGTCTTGATCAGCCTGTTGCGCGGGGCACGCATCAACGCCAATGCGTCCT 4980

D G T A A R Q R V F D D W S P A V N S Q
GGTCACCCGTGGCCGCCGTTGCCGAACGAAATCGTCCAGCTCGGGGCCACGTTGGACT 5040

V A T K R A K A L E A R I A A V N A Q H
GGACTGCTGTCTTCCGGGCTTTGGCTAGCTCAGCCCGGATGGCTGCGACGTTGCTGCTGAT 5100

E M R L A Q Y S I Q K A H R P I G G I L
GCTCCATGCGAAGTGTGGTAGCTGATCTGCTTGGCATGCCGAGGGATGCCCCGATGA 5160

K L A K R K A A H V A R A H E L K A A G
GCTTTAGCGCCTTGCCTTTGGCGGCATGTACCGCACGCGCATGCTCAAGCTTGGCGGCGC 5220

Q K N I A D L A S R R Q A Q Q N D R H R
CCTGCTTGTGATTGCATCGAGCGCGCTGCGGGCGCTGCGCCTGCTGGTTGTCTCTATGCC 5280

Q Y E T Y L G S S D L G P S R P S R S Y
GCTGGTACTCGGTGTAAAGACCGCTGCTGTCCAGCCCCGGCGAGCGAGGGCTGCGGGAAT 5340

G K G P A V S H A S P T F Q G L R D S L
AGCCCTTCCCTGGAGCGACAGAATGGGCAGATGGAGTGAAGTGCAGTCCGATCACTGA 5400

S K M S L S R D V S S P R I G I R A A P
GCGACTTCATCGAAAGCGAACGATCCACGCTGCTGGGTGCGATGCCGATGCGAGCTGCCG 5460

D Y I T L G A G R L K L E L G L E G V V
GATCATAAATGGTCAAGCCAGCACCGCGCAGCTTCAGTTCCAAGCCAGCTCCCCAACGA 5520

R H V Q E W S A A S K L D E L A H K R V
CGCGATGCACCTGCTCCAGCTCGCCGCGGACTTCAGATCCTCCAAGGCATGCTTTCGCA 5580

Anhang IV

W T Q M S D E G T Y A E M S A V R A T P
 CCCATGTCTGCATGCTGTCTTCGCCGGTGTACGCCTCCATGGACGCAACGCGAGCGGTTCG 5640
 * G M A A M M K A R R E A L A M E R G
 R V G D R G D D K G E A R G V G D G A R
 GCCTCACCCCATCGCGGCCATCATCTTTGCCCTCCGCTCGGCCAACGCCATCTCCC GCC 5700
 D C Y K L E Q P N E L T Y T T V H M I R
 R L V E I G A P K G A H V N D R A N N Q
 GTCGCAATACTTCAATTCCCTGCGGGTTTTCCAGCGTGTACGTTGTACGTGCATTATTCT 5760
 C Y C T V A G P S A F W V S A P C T Q C
 L L V D G G R T V R V M R L S S V N P L
 GCAGTAGCACGTACCCGCCCGGGTGACGCGAACCATACGGAGGCTGGACACGTTTGGCA 5820
 A T Y N V P R M G E P I L L L T P S V Y
 S H L Q G P A H R R P D F A L D S E R L
 GGCTGTGTAGTTGACCGGGCGCATGCCTTCGGGGATCAAAAGCAAGGTCGGACTCACGTA 5880
 D L L S A G D T T V P P H F D D P E E H
 G A L E S W R D N G P P P L R G A G R A
 GTCCAGCAAGCTCGCTCCATCGGTCGTTACCGGGGGGTGGAAGTCGTCCGGCTCCTCGTG 5940
 E I E I E I D S M
 ← *traH*
 R D R D R Y R E N T R E Q Q Q Q L R K E
 CTCGATCTCGATCTCTATATCGCTCATTGGTACGTTCTCTGCTGCTGTTGAAGCCGCTTCT 6000
 H L Q Q R G H N T P Q L G H K V E L R D
 CGTGAAGCTGTTGGCGGCCATGATTGGTGGGCTGAAGACCGTGCTTAACCTCCAGGCGAT 6060
 C A E M L R K H D Y F P E F N R Y T K P
 CACAGGCCTCCATCAGGCGTTTGTGGTTCGTAGAAAGGCTCGAAGTTGCGATAGGTCTTGG 6120
 H V K N I A V H V H L H D T D I H V A S
 GGTGAACCTTGTGATGGCCACATGGACATGCAGGTGGTCTGTGTTCGATGTGGACAGCTG 6180
 I R Q H D A M G I A A C L E D E I A H L
 AAATGCGTTGATGGTTCGGCCATGCCGATGGCGGCACACAGCTCGTCTTCGATCGCGTGCA 6240
 V A M P P Q E G P P F S F V L H Y T K D
 ACACAGCCATGGGCGGCTGCTCACCAGGCGGAAAGGAGAAGACCAGGTGATACGTCTTGT 6300
 A K S R T N L A Q T A L I E L T A A V P
 CCGCCTTGAACGGGTGTTTCAGCGCCTGCGTGGCCAGGATCTCCAGGGTGGCCGCAACCG 6360
 E T S H C N S V R M G G V K E G N S R T
 GCTCGGTTCGAGTGGCAGTTGCTCACACGCATGCCGCCGACCTTCTCGCCGTTGCTGCGGG 6420
 A L I Y E A T N T W S R P D E R G Q A D
 TGGCCAGGATGTACTCGGCGGTGTTTCGTCCAGGAGCGTGGATCCTCCCGGCCCTGGGCGT 6480
 V V Y R V L K A M N S T A R D R P I R K
 CCACAACGTACCTGACCAGCTTGGCCATGTTTCGAGGTGGCGCGATCACGGGGTATGCGTT 6540
 ← *tral*
 A I V
 * S R L V E G M V N L M E V Q G D R
 TGGCGATCACGACCGCAGGACCTCGCCCATGACGTTTCAGCATTTTCGACCTGCCCGTCAG 6600
 I G D L V A Q V D S P K A G R G R R D P
 AATCCCATCCAGGACGGCCTGCACATCGCTGGGCTTGGCGCCGCGGCCGCGCCTATCCGG 6660
 D T L W L K L L G G L R G L D A N V K A
 ATCTGTTCAGCCACAGCTTCAGCAGACCGCCAAGGCGCCCCAGGTCTGCGTTGACCTTCGC 6720
 L R A V A Q L D V K S R I P Q N L G V L
 CAGCCGGGCGACAGCCTGCAGGTCCACCTTGGACCGGATCGGCTGATTGAGGCCGACCAA 6780
 K L Y G S R S L G A E E A R A S I A A K
 TTTGAGGTAGCCCGATCGGGACAAGCCGGCCTCCTCAGCACGAGCTGAGATCGCTGCCTT 6840
 E E D N V W V E I P K G R R R A K K A P
 CTCCTCATCATTGACCCATACCTCAATCGGCTTGCCCCGCGTTCGACCTTCTTCGCTGG 6900

Anhang IV

← <i>traJ</i>	
A A T S D T M	
TGCCGCAGTGTGTCTAGTCACTCTGTTGCCTTCTTGGAGCGCTCGTATCGCTGTTGCTGGG	6960
CTTTGGCTATGGCTTCTGTGCGGGCAGCGACCGTGTGCGTTCGAGACCAAGATGACGTCG	7020
AGCCGAAGGCGAGTAAGGCCAGGTGATGGATGGGTGCGGGCTTGCCCGCACCCGTACATC	7080
ACACATCTTGTTCATCTTCTTCTCCGCGATTTTATGCGTTTGTCTGCCCCATCTCCACCCC	7140
AGCAAAGCTGACCGCACCACAAGCTCTGCGGTGGTTCGGAATGCGGCTTCCAAATCAGCT	7200
GCGGAGCAGCTGACACGGATCCGAAGGCATTGAAAATCAGGCTCTCGCCCTCTGTTTCGAC	7260
AACCTGGTGAGGCATCCCGACCGATCCCAAAGAAGTTCTAGGATGAATGGATACTAAATA	7320
GCGCTACTTAGCGCTACGTTGCATTGTGTTGCATTAATTTGCGCTAAGTGGCATACTTTC	7380
ATTGCACCGTAGCGCTAAGTAGCGCTATCGTCTCACCCTGAAGCCGGGAAAGGCCAT	7440
<i>traK</i> →	
GAAATGAGTACGCCAGAGAAGAAGTTCGCGGGGCGGTGGGCGAGTCGCGTTCTGAAGCAC	7500
M S T P E K K S R G G G R V A F L K H	
CGCGCCGCGATCAAAGAAAAAATCGAAGCCGGGCATGTCCGGCGCCACATTTACGACGAC	7560
R A A I K E K I E A G H V R R H I Y D D	
ATCCCGGACCTGGGGATTAGCTACAGCCAGTTCATCCGGTATGTAAATCACTTCATCACC	7620
I P D L G I S Y S Q F I R Y V N H F I T	
CCAGGGGATCCCAATGTCACCCAAGCCGCGCCGAGCAGACCCCAAAACCCCGAGGCCAA	7680
P G D P N V T Q A A P Q Q T P K P R G Q	
GCTGACGCCGGCCAGGAACAAGCCCTCCCTCCCCTGCCCGACCCGAACCAGCCCAGCCA	7740
A D A G P G T S P P S P A R P E P A Q P	
GGCACCCAGCAAAGCCCGCCTCAACAAGCGAGCGCCGCTCAGGAGCCCAACCCGACTC	7800
G T P A K P A S T S E R R S G A Q P R L	
CAGCACACCAGCGCAGCCAGCAAAGACGACCTCGTTCGGCTAAACCCACTGAAGGATCAAT	7860
Q H T S A A S K D D L V G *	
<i>traL</i> →	
CCAAAAATGAACGCCATCGTGAACAACAACCAGTCCGCTTCGTCCGCTCGCGGCCCGAT	7920
V N N N Q S A S S A R G P	
CGTCCATTTTCGTCTGTCAGGGCAAGGGCGGCGTTCGGCAAGAGCTTTGTTGCCTCCCTGAT	7980
I V H F V L Q G K G G V G K S F V A S L	
CGCCAGCACGCGCGCGATGCATCCGTCCCCCTGGGCTCATCGACACTGATCCGGTCAA	8040
I A Q H A R D A S V P L G L I D T D P V	
TGCCACGTTCTGCGGTATAAGGCCCTGAACGTCGACCGCCTGGAGCTGATGGAAGAGGG	8100
N A T F C G Y K A L N V D R L E L M E E	
CACGTTGGTTGAGCGCCGTTTCGATCAGGCGATCGAACGCATCCTGGGCGAGGACGCGAC	8160
G T L V E R R F D Q A I E R I L G E D A	
CTTCGTGCTGGACAACGGTGCTGCAAGCTTCATTCGCCCTGAGCAGCTACCTGCTGGAGAA	8220
T F V L D N G A A S F I P L S S Y L L E	
TGACGCCATCCAGATGCTCCTGGATAGCGGCAGGCGGTCATGATTCATAACCGTTGTTAC	8280
N D A I Q M L L D S G R R V M I H T V V	
GGGTGGCCAGGCGATGACCGACACCTTGAACGGCTTCAACACGCTGGCATCGCAGTTGCC	8340
T G G Q A M T D T L N G F N T L A S Q L	
GGATGGGGCTGAACTGATCGTTTGGCTCAACGAATTCCTTCGGCCCCATCGAAGCCAACGA	8400
P D G A E L I V W L N E F F G P I E A N	
CAAGTCCTTTGAAGAGATGCGGGTCTACCTTGAGCACAAGGACAAGGTGAAGGGGCTGAT	8460
D K S F E E M R V Y L E H K D K V K G L	
CACGATTTACCGACAGACCGGCTCCACCTTCGGGACTGATGTGCAGCTGATGCTGGAAAA	8520
I T I Y R Q T G S T F G T D V Q L M L E	
CAAGCTGACCTTCGATGAAATCGCCACGTCGAGCGAGTTCGGATTGATGGCCAAGCAACG	8580
N K L T F D E I A T S S E F G L M A K Q	
CCTGAAGACCGTCCAGAAGAGTATCTGGAAGCAGCTCGACATCATCCTCTAAAGCACGGA	8640
R L K T V Q K S I W K Q L D I I L *	

Anhang IV

	<i>traM</i> →	
	GAGGGTCACATGGACGACATGCTCGAACCCCTCTGCCGCACGCATGGCCCTGATCGAAAAG	8700
	M D D M L E P S A A R M A L I E K	
	ATCAGGGCCCCGCGTCTGCTGGAGCAGCACGTCTTGCTTGCCAAGAACGATCCCATTCTG	8760
	I R A R V A V E Q H V L L G K N D P I L	
	TCGGTAGTCCTCATCATGGAAGAGGTCATCAAACAGTATGGCGAAGCAATTGCGGACGAC	8820
	S V V L I M E E V I K Q Y G E A I A D D	
	ATCCAGCTGAATCAGGAACAGCTGGGGATACAGCTACAAACGGTAGTGGAGGGCGCCAAG	8880
	I Q L N Q E Q L G I Q L Q T V V E G A K	
	GAGAGCGCAGGAAAGCTCATCACCGACTCGGCCGGCTACATGAGCAAACAGATGGTTGCA	8940
	E S A G K L I T D S A G Y M S K Q M V A	
	GCTGGCGACCAGGTGAAACGCGACATCTTGCAGGCTGCGAGTGAGATTGCGGCCCAAGCA	9000
	A G D Q V K R D I L Q A A S E I R A Q A	
	ACCAATGACAGCAACCGCATGCAAGAAGACAGCCGGCGCGTGCATGACCAAGTGCATAGC	9060
	T N D S N R M Q E D S R R V H D Q V H S	
	ATGCGCACAGAAGTGGTCGACGCCAAAAAAGGGATCAATCTGGCGATGATTGTGACGGTG	9120
	M R T E V V D A K K G I N L A M I V T V	
	ATCTCGGCAGCAATTGCTGTGCGGTGCTAGTGTCAATTGCTCTCTTGAAGTAACCACCACTG	9180
	I S A A I A V G A S V I A L L K *	
	ACGCAACAGGAGATGTCTGATGCGGCTCTTGAAGTACATCGTTCACTGGGGCATTGTTGGC	9240
	ACCAATTCTGGCGGTGCTGTACTCGACCGTCTGTATCTGGCTCTTTAAGGATGGCGCACT	9300
	GGATAGCGTGCCCGTCTCCTCCAGAACATGGTTGGACTGAGCTGCTTCGTCATGCTTG	9360
	AGCGGGATCCTGGTCGTTGGGTTCTTCTCGCCAAGTACCGCTGCTATCAACAGGAAGAG	9420
	GGAACAGGCCAGGATGTTCTGGGCGCAACGCGGGTAGCGGCCTGCCGAAAATCAGGTATG	9480
	AACCTCCAAAGCCCCGCCCTGGCGGGCTTTTTCATTTGCCAATTAGGCAGCACCCCTTGCAT	9540
	TTGGCACGCGCACGCGGCACGGCACTGTGTGCGACCGCACATCACTGGGTACGCCGCGCT	9600
	CGATGTGCGGCCTGGGGCGGGCACTCACCGCTGCGGCCCGGCCGCGCTCGATGCCGGCG	9660
	CCGACGCCGGCGTTGGCCAGCGGGTCTACCTGCAGACCGCCCCGGGGCGGATCCACGTCG	9720
	CCGGCAGCTGCATGACCTGGTGCATCGGCACCGCATGCGCATGTGGTCACCACCGTGC	9780
	AGCTGCAGGCCGAGCTGGGGGCAGGCGGTGCAGTCACTGCCGCGGCCCGGCCGCGCTCGA	9840
	TGCCGGCGCTGGCGTTGGCCAGCTGGTGCAGCTGCCCCGGGGCAGATCCACGT	9900
	CGCCATCGCCGCCGTTGCTGCAGGACCTGGTGCATGCGCTGCAGCTGGGCACGTGGCC	9960
	ACCGCCGCGCCAGCTGCAGGCCGTGCTGGGGGCAGGGCGGTGCACTCACTGCCGCGGCC	10020
	CGGCCGCGCTCGATGCTGGCGCTGGCGTTGGCCAGCGGGTTCGACCTGCAGGACGCCCTGG	10080
	GCGGATCCACGTGCGGGCAGCTGCATGACCTGGTGCATCGGCACCGGCATGCGCATGT	10140
	GGTCACCACCGTGCAGCTGCAGGCCGAGCTGGGGGCAGGCGGTGCACTCACCACCGCTGC	10200
	GGCCCCGGCCGCGCTCGATGCCGGCGCTGGCGTTGGCCAGCTGGTTCGACCTGCAGAACGCG	10260
	CCGGGCGGATCCACGTGCGCCGTTGCCCGCCGAGCTGCATGACCTGGTGCATCGGCACC	10320
	GTCATCGCATCGTGGTCAACCACCGCAGCTGCAGGCCGAGCTGGGGGCAGGGCGGTGCA	10380
	CTACCCCGCTCGCCCTGGCCGCGCTCGATGCCGGCTTGGCGCTGGCCAGCGGGTTCGACC	10440
	TGCAGGGTGTCTGGGCGTATCCACGCGCTCCGACAGCTGCGGAACCTGAGCGCGAATGTG	10500
	ACGGGGACACCGTGAGCACCGTTCGCGCCAGCGGGCGGGCCGGAGCAGAGCGACGCGCTCA	10560
	ATGTCGATTGTATCAGCGGGTTCGATGGCCTCTCGCGTCTCAGCACCGACCCGCCACT	10620
	GCTTCATTTGGAGCGGCACCTTTATTTGTTTCTTTGTTTCTTTGTTTCTTTGTTTGTAG	10680
	<i>kfrA</i> →	
	TATCATGCTACACTGCAATCAACCACCCGAAGGAGACAGGTATGCGACCCCGCAAATCA	10740
	M R P A E I	
	GCGATGCCGAAATCATTGAAGCCGGCACACAACCTGCAGGCCCAAGGCACGAACGTGACTG	10800
	S D A E I I E A G T Q L Q A Q G T N V T	
	GGTTCTCGCTTCGCAAGCGCACAGGCCGTGGCAGTCCGGCGCGGCTGAGTCAGGTCTGGC	10860
	G F S L R K R T G R G S P A R L S Q V W	
	AGACCTATGTGGCCACGGCGAGCGTGGCACCGGCGGTGGCAGCCGAGCTGCCCGTCGAGG	10920
	Q T Y V A T A S V A P A V A A E L P V E	
	TGGCTGACGACGTGGCCAAGGTCGTGGCTGATGTAGGGGGTCAACTCCATCGCGTAGCCA	10980
	V A D D V A K V V A D V G G Q L H R V A	

Anhang IV

CCCTGATGTACGACAAGGCTGTGAGGACAGCGGAGCGTTCGAGTGGCAGAACTGGTTAGGG	11040
T L M Y D K A V R T A E R R V A E L V R	
CGACCAAGGAACAGCAAGCCCAAGCAGACCAGGAGCTGGCCGATGCGTCCGTGGCCTTTG	11100
A T K E Q Q A Q A D Q E L A D A S V A F	
AGGAGATGGAGGACCGATTTCGACACCCAGTCCGCTGAGATCGAAAGCCTGAAGGAACAAC	11160
E E M E D R F D T Q S A E I E S L K E Q	
TGGCGTCCGCACGCTCCAGCATCCAAGGCCAAGCAATCGAACTGGCCAAGGCTGGCGAAC	11220
L A S A R S S I Q G Q A I E L A K A G E	
ACCTGGTCAGTGAGCGGCAGCGCAATGAAATCCTGAAATCCGAGCTTGCTCAGGCCCGCT	11280
H L V S E R Q R N E I L K S E L A Q A R	
CAGATGGCCGGGATGCAGCCGTTCTACAAGGGAAGGTTGACGCTCTCACGGAGCAAAAATG	11340
S D G R D A A V L Q G K V D A L T E Q N	
CCAACCTGATGGCACATCTGAATGGGCGTGGAGCAATCGCGCCATCGCACGACTAAGGAT	11400
A N L M A H L N G R G A I A P S H D *	
GTTCTCAAGGAACATTTCAGCCAGCCATTAACGCGATTTAATGCAATTTTTCGGGTTTAA	11460
ATGCAACACAGTGCACCTTTAGTGCATCTAGAGCGGGTCGGTTGGAGAAGGGATTCAGTCC	11520
GGTTTGGCCGTGGTTACCGGGCTCGCCCATAGCCGGCCGCCCTTGATGACTCCCGGCCCG	11580
TCGCTGCGTAGCGGGCTGAATTGTAGGTTCGCCCTGGGTGAGTCCACGTTCGCTGCCGGCGC	11640
CGGCGCTGGCCAGCCGGTTCGATCTGCAGGACCCCGCGGGCGGATCCACGTTCGCGGCAAC	11700
TGCAGGACCTGGTGCGCGATCGACACCGGCCGCGCAGCTGGCCAATACCGCTTCAGCTG	11760
CAGGCCGAGCTGGGCAGGGTGGTGTACTCACCGCCGCGACCCGGCGCGCTCGATGCCGCC	11820
GCCGGCGTTGGCCAGCGGGTAGACCTGCAGGGCGCCCCGGGCGGATCTACCCCGCCGCA	11880
GCTGCAGGACCGGTGCATCGCCACCGGCCCGCGCACGTGGCCCCCGCTGCCCCAGCTG	11940
CACTCCGAGCTGGGGCAGGGCGGTGCGCTCACCGCCGCGGCCCGGCCGCTTCTATGCCG	12000
GCGCCGCGGGGAGAAGTTGTCTCGCAGACTCCCCGGCGCTTGCCGCTGTTGCTCTTCCA	12060
GGCTCTTTGATCCCCTTGTAATCGCCTGGCGCCTTATCAACTTGTTTATATACAAACAT	12120
GAAGAGCTACTTGGGAAGAGCTACGTGTAAGCCTACTTGTGTGCGATCTCTAACGCCTA	12180
AATGTTCTTTGAAAACATGTGGTTGTATGACATTTTCGGTCTTGATGCATTAGAGATTGC	12240
ACGTGAAGACGTTAGAGATTGCACGTGAAGACCGTTAGCGATTGCACGCAAATGCATTAG	12300
CGGTTGCACGTGGATAAATGTTTAAAGTAGATGATTTTAAAGGAAATTCTATGCGTTAGAG	12360
AACGGCGGTGGATAAGTCGGTCTTATCCACAAGGTATACATACCTTATCCACAACCACTG	12420
TGTATAAGTGCGGTAGCCCTTGGGGCGCCAATGCTCTGACGCGATCACCGTGGGTCTCT	12480
GACGCACCCATCGGAAAGTGACTACGGTTACTGGATCGTACATTCCAATCCTTTTGGATC	12540
GTTTATTCCAATACAGGCCTAACGGTGCCTGGCAGGCTGGCGTTAGCGATTGCACGCGCT	12600
CGCCAGGCCAATATCAGCCTGGACACCGTTAGAGATTGCACGCGAGAGGAAGCCGTTAGA	12660
GATTGCACGCACCCTTTCGTCTATCGGGTCTGCGCTGAGTAGGTACTCTCGCGGAAATGT	12720
TCGCCAAGGAACAAATCAGTGGACCAGCTCGCCGAGATTGAGCGCCTGCAGGCTGCAGGG	12780
<i>par</i> →	
V D Q L A E I E R L Q A A G	
AAGCTACAGCGGGAAATGGCTGTCATCCTGGGGCTCAGCCGGCCACGGGTGGCCAACCTG	12840
K L Q R E M A V I L G L S R P R V A N L	
GTCCGCGTGTGGCGCTGCCGGCGTTCTTGCTTGAAGTGGTTCGCTCGGGTGAGTTGACC	12900
V R V L A L P A F L L E L V R S G E L T	
CCTAAGCATGGCGAGCTGCTCGCGGGTATCAAAGACAGCGCCGTTTCAGCGTCGCCTTGGC	12960
P K H G E L L A G I K D S A V Q R R L G	
GAAAGCGCGTTGGCTGGCAGGTGGACAACCTGCCAGGCTGGCAAAGGAGATCGACCGATCA	13020
E S A L A G R W T T A R L A K E I D R S	
CGAGGGAAGCGTGATCGGGATGATGTCCACAAGGACGCGGACATAGCGCATCTGGAGCGT	13080
R G K R D R D D V H K D A D I A H L E R	
CGCCTTGGAGAGCATCTGGGAACAACCGTGCAAATAGAAAACAGGCGCAGGCCACGGGGGG	13140
R L G E H L G T T V Q I E T G A G H G G	
GCGCTGCGCCTGTTTTATACCGATCTGGATACGCTGAGCGGGCTCCTGGAGCGGCTTGA	13200
A L R L F Y T D L D T L S G L L E R L G	

Anhang IV

* R T P L K A M I H L P A P T L V L N D
TTCAGCGAGTAGGGAGCTTTGCCATGATGTGCAGCGGCCCGGTGTCAGCACCAGGTTGT 13260
F S E *

R D D T I H G R A E P Y F V L V E D L R
CGCGATCGTCCGTGATGTGGCCACGAGCCTCGGGATAGAACACGAGGACTTCATCAAGGC 13320

K L F Y Y R F S R V G A A T D A Y N S G
GCTTCAGGAAGTAGTAGCGGAAGGACCGCACGCCGGCCGAGTGTCCGCGTAATTGCTGC 13380

I Q G K L G L W P I K V S P K R S H R L
CGATCTGCCCTTTCAGGCCACGCCACGGAATCTTGACCGAAGGCTTCCGCGAGTGCCGAA 13440

V Y M R Y T L W T Y I D M A L P S K S I
GGACGTACATGCGGTAGGTGAGCCACGTGTAGATGTCCATCGCCAGCGGTGATTTGCTGA 13500

S H F V R L D M P V P R E T V E R F F E
TCGAGTGAAACACGCGCAGATCCATCGGCACGGGTGCTTCCGTGACTTCACGGAAGAACT 13560

D T L N L S S V W L S Q V D P N H H W F
CGTCCGTGAGGTTTCAGCGAACTGACCCACAGCGACTGCACGTGAGGGTTGTGGTGCCAAA 13620

V K E S T S I P L R V S N E S L D D D E
ACACCTTTTCTGAGGTGCTGATCGGAAGGCGAACGCTGTTCTCCGACAGGTGCTGCTCTT 13680

Y E I S I V S R F L S M A Q K R F R A I
CGTACTCGATGGAGATGACCGACCGGAACAGGGACATCGCCTGCTTGCGGAAGCGGGCGA 13740

D S G N S H L G I R K L F E A Q S R G L
TGTCCGAGCCATTGCTATGCAGACCGATGCGCTTCAGGAACTCCGCCTGACTGCGGCCCTA 13800

D L Q K N Q T R V A E T C I W A L L V R
GATCGAGCTGTTTGTGGTCCGCACCGCTTCGGTGCAGATCCACGCCAACAGCACGC 13860

P I S G Y P I G Y K R T T A V I N L T A
GGGGTATGGACCCGTAGGGGATGCCATACTTTCGGGTTGTGGCGACAATGTTGAGGGTTG 13920

R G T S R S Y M T G P P L K P D M H P L
CCCCCGGTGGATCGGGAATACATGGTGCCAGGCGGAAGCTTGGGGTCCATGTGGGGCA 13980

T A Q A L I R A M Y G L A G A S V A D E
GGGTGGCCTGAGCCAGGATGCGAGCCATGTAGCCCAAGGCCCCAGCTGACACGGCATCCT 14040

R E I A M W D D L M A R H R P G L L S K
CACGCTCGATGGCCATCCAGTCCGATGGCACGATGACGGGGTCCCAGGAGGGACT 14100

D P T L I L T D S E V Q V P R K N S E D
TGTCCGGGGTCAAGATCAACGTGTCGCTTTCAACCTGAACGGGTCTTTTGTAGATTGCT 14160

← *repA*
T A M

CAGTAGCCATGCTCTGTAGCCGCTCCTTATTGGTGTGCAGAGTGTGGTTTCGTGTCGGTC 14220

trbA →

GAGGGCTGCAACCCTCGGCCGACTTTACTTTAGCCTGATTGTATGGGAAGGGCAAAACTTT 14280
M E G Q N F

GCGATTCCGCGAGCGGAAGTGGCCAAGCAGCACACAATGAAACGACTTCCAGCCAGCGTA 14340
A I P R A E V A K Q H T M K R L P A S V

GACGAGTCCGAGATCCCCGAGATGCGGAAGAAGTTTCGAAAGAAGTTCGCGCAGCCAGG 14400
D E S E I P E M R K K F A K N F R A A R

ATCAGAGCGGGTCTAACACAGAAAGACATCTGCGAAAAGGCGGGCCTGACCCAGCCATAC 14460
I R A G L T Q K D I C E K A G L T Q P Y

CTCAGCGAAGTTGAGCGGGGCTTGAGCAACATCAGTCTCGACAACATGGAAGTCCTCGCA 14520
L S E V E R G L S N I S L D N M E V L A

GGCCTGGTGCACAAGCCACTATGGGTCTGCTTAGGTAATGACCTGATCCGAAAAGAAGA 14580
G L V H K P L W V L L R *

AGCCGCGCTGGGCGGCTTTTTTTTTTGGCCGATGATCCTTGCAGCTAAAGGCGAACAAGC 14640
CAAACGTTGGCAAGTTCTGTGATCGTGTTCGAAAAACAGGGGTGTTGGACGCTGAGAAT 14700

Anhang IV

trbB →

TATAGTCTATAGACTATAACGCGGGGAATCCTTCCCGTGGAGATTTGCTGGGATGGAACA 14760
V D G T

GGCACACCCTCGCAGCCAAGTAATAGCGGCAGCTCGGCCGATCGCTTGAGGGAAAAAGTTG 14820
G T P S Q P S N S G S S A D R L R E K L

GAACGAGAGCTGGGCCGGTCCGTAATGGACCTTCTTCGGGATCCAACAGTTGTTGAAATC 14880
E R E L G R S V M D L L R D P T V V E I

ATGCTCAATCCTGATGGCGTGTCTGGGTAGAGCGCCAGGGCAAGCAAATGGAAGAGATT 14940
M L N P D G V L W V E R Q G K Q M E E I

GGACGAATGGCGTCACATTCCGGCGCTGTCCGGTATGGCTACCGTGGCCACGTTCTTGCAC 15000
G R M A S H S A L S V M A T V A T F L H

ACCGAGATCACTCGGGAAAAACCAATCCTCGAATGCGAGCTGCCGATCGACGGCTCTCGC 15060
T E I T R E K P I L E C E L P I D G S R

TTCGCTGCGCTGCGCCCCCGGTGGTGTCCGGCGCCACCTTCGCAATCAGAACGAAGGCA 15120
F A A L R P P V V S A P T F A I R T K A

AAGCGCATCTTCACCCTGCAGGAGTACGTGCGACAGCGGAATCATGTCGCCAATGCAGATG 15180
K R I F T L Q E Y V D S G I M S P M Q M

CAGCAGCTTCTGTCCGGCCGTGCGCAGCAGGAAAAACATCCTGGTCCGTCGGTGGTACCGGT 15240
Q Q L L S A V R S R K N I L V V G G T G

AGCGGCAAGACAACGCTGTGCAACGCCATCATCCACGCGATCTCACAAGAGCACCCGAAC 15300
S G K T T L S N A I I H A I S Q E H P N

GACCGAATCCTCATCATCGAAGACACCGGGGAGCTGCAATGCGCGGCCCGGAATGCCGTC 15360
D R I L I I E D T G E L Q C A A A N A V

GTTATGCGCGCTGTGCGAGGACGTGACGATGGAACGGCTGTTGAAGGCATCGTTGCGACTT 15420
V M R A V E D V T M E R L L K A S L R L

AGGCCGGATCGAATTCTCGTCCGGCGAAGTCCGTGATGGATCCGCGCTGACACTCATTGAG 15480
R P D R I L V G E V R D G S A L T L I E

GCCTGGAACACCGGCCATCCAGGTGGCATTGCCACCATCCATTCCGACGTAGGAGACCCG 15540
A W N T G H P G G I A T I H S D V G D P

GAAGCGGCGCTCCTGCGAATGGAAAGCCTGGTGGCTCGCGCCACTCAGGCACCGCAGCAG 15600
E A A L L R M E S L V A R A T Q A P Q Q

GCTCTGATCGCCAAAGCGGTCAACGTGATCGCCTCGATCGCGAAGACCGCAAATGGCCGA 15660
A L I A K A V N V I A S I A K T A N G R

AAGGTGCATGCAATCACCGAGGTGACGGGCTACGACAGCCTGAAAAACACCTACTCGTTT 15720
K V H A I T E V T G Y D S L K N T Y S F

trbC →

CAACATGGAGATGAAACATGAAGTTCAATCGCGCGGGCAGCAAGCTGGCTCGCATCCTGA 15780
Q H G D E T *

M K F N R A G S K L A R I L

CCCATCCGGGAACCCGTACGTTCCCTCATGATGCTGCTGTTCCCTGTGCGCCGCCAGGTGA 15840
T H P G T R T F L M M L L F L C A A Q V

TGGCGAGTGATGCTGGTTCCGGCGGTGGCGGCAGTGGGCTGCCCTGGGAAAAGCCGATCG 15900
M A S D A G S G G G G S G L P W E K P I

AGAAGATCGTGGCATCGATCAGCGGGCCGGTTGCATTCCGCATCTCTCTGCTCGGCCTGA 15960
E K I V A S I S G P V A F G I S L L G L

TCGGCGCCGGCGCGGGTCTGATTTGGGGTGGCGAGATGTCCACCTTCATGAAGACGCTGC 16020
I G A G A G L I W G G E M S T F M K T L

TGTACGTGGTGTGTTGATCAGCCTCATCGTGTTCGCTAAGGGCCTGATCGGCGGCGCCC 16080
L Y V V L V I S L I V F A K G L I G G A

TGTTCAAGTGGTGGTTCGTTGCCGGACGGCGTAATGACCTACCTGCATGCCGCTCGTGGCG 16140
L F S G A S L P D G V M T Y L H A A R G

Anhang IV

trbD →

CGACGGTAGGAGGCTAACCCGTCATGGAAGAGGAGCTTGAGCAAGCAAACCTTCTACTACG 16200
 A T V G G * M E E E L E Q A N F Y Y

CCTTACACCGGCCGAGGAAGTGCTTGGTGGTGAGCGAGAGCTGACGCTTTTCAGCATGC 16260
 A L H R P Q E V L G G E R E L T L F S M

TGCTCGCCGGGGCGTTGATCTTTACCGGTATGAACTGGACCACCACATTTGTTGGTGGAT 16320
 L L A G A L I F T G M N W T T T F V G G

CCATCTGGACGGTGTGCTGGTACTTCCCTCAAAAAGATGGCGAAATCGGACCCGATCATGT 16380
 S I W T V C W Y F L K K M A K S D P I M

CCAAGGTCTACATCACCCAGCTTAAGTACCGGCCGTACTACCCCGCGCACTCAACTCCAT 16440
 S K V Y I T Q L K Y R P Y Y P A H S T P

TCGCCGAGTGACCGCCTGGGGCGGCCTAGCCGCCCTTGC GACTCAGAACAGGACACGAA 16500
 F A E *

trbE →

ATGAACAAGCTCCAAGAGTTCCGGTCCAAGGCGAAGAGCCTGCCTGACCTGCTCAACTAC 16560
 M N K L Q E F R S K A K S L P D L L N Y

GCCGCATTGATCGAACCTGGCACGGTGTCTGCAAAAGCGGTGCGCTGCTGGCCGGGTTC 16620
 A A L I E P G T V L C K S G A L L A G F

TTCTTCCGCGGCGACGACCATGCCTCATCTACTGCAGCCAACAAGAACTACGCTGCACAT 16680
 F F R G D D H A S S T A A N K N Y A A H

GCGGTCAACGACGCACTGAAGTCGTTGGGCTCGGGCTGGACGTCCTGGACTGAAACTGTT 16740
 A V N D A L K S L G S G W T S W T E T V

CGCTACCGGGCCCCAGGGTACTACCCGGCGGACACGTCACATTTACCAAGGAGGTGCCA 16800
 R Y R A P G Y Y P A D T S H F T K E V P

AAACTCATCGAAGCTGAAAGACGGGAAACCTTACCGGGCAGAACGTGTTCAAGTCCGAG 16860
 K L I E A E R R E T F T G Q N V F K S E

AACATCCTCATTCTGCAGTACCTCCCGCCCATGCGTCCCGAGCTGAAAGCAGGCTCCAAG 16920
 N I L I L Q Y L P P M R P E L K A G S K

ATGAAGACGGTGAGTGAGATGGTCATTGAGGGTGACGACGTCGATGACGACACCGTGCAG 16980
 M K T V S E M V I E G D D V D D D T V Q

GAGCGAATCCTTGCTGAGTTCAACAAGGCCCTTAAGGACACTGAAGACAGACTCGGCAAT 17040
 E R I L A E F N K A L K D T E D R L G N

GCCGTGATGATCCGGCGCATGGGTCGTTACGATGGCGTCGATGACTTCGGTGGTGAGTAC 17100
 A V M I R R M G R Y D G V D D F G G E Y

GTCGCCGATGAGCTGGTCAATACGTTGCGCTGCATTGTGTGACGGGAATCCATGGAAGTC 17160
 V A D E L V N T L R C I V S G E S M E V

GCACTGCCAGAGTGCGGCATGTATATGGACAGCTGGCTCTTTGGTGAGGATCTGTATGCC 17220
 A L P E C G M Y M D S W L F G E D L Y A

GGCACGACGCCAAGGCTTGGCGACAAATTCATTGGCGTTATTGGCATTGAGGGATTCCCG 17280
 G T T P R L G D K F I G V I G I E G F P

GCTCGTTCCCTATCCGAGCATCCTCAGCATGCTCAACGAAATGGCCCTGCCTTACCGCTGG 17340
 A R S Y P S I L S M L N E M A L P Y R W

TCGAATCGCTTCATCCACCTGGATCGGCATGAAGCGGAGTTTCGCGCTCGGCCGCTACGTG 17400
 S N R F I H L D R H E A E F A L G R Y V

AGCAAGTGGAAGCAGAAGATTTCGCGGCTTTGTAGCGCAGATGACGAACAAGCAAGGCTCG 17460
 S K W K Q K I R G F V A Q M T N K Q G S

ATCAACACTGACGCGTTGAGCATGACGCAGCAGGCAGAATCTGCTGTGAATGAAGTCCGC 17520
 I N T D A L S M T Q Q A E S A V N E V R

AGTGGGGATAGCGCTTATGGCTACTACACCTCCTGCATCGTGCTGATGCACGAGGATCCG 17580
 S G D S A Y G Y Y T S C I V L M H E D P

Anhang IV

GCATGGGTTGCAGCCAAGGCGCGCCTGGTGCAGAAAGCCCTGCGTCGGATCAGGTTTGCA 17640
A W V A A K A R L V Q K A L R R I R F A

GGCCGCATCGAGTCCATCAACTGCATGGAGGCTGGCTCGGATCCATCGCCGGTCACGCG 17700
G R I E S I N C M E A W L G S I A G H A

CACGCGAATGTTTCGTCGCCCTCTGATCAGCACGCGCAATCTCTCGCACCTCATGCCTCTC 17760
H A N V R R P L I S T R N L S H L M P L

TCGGCGCCGTGGGCAGGGCTTGCCACGAACCCGTGCGATCTCTACCCGAAGGGATCGCCG 17820
S A P W A G L A T N P C D L Y P K G S P

CCGCTGATGATGACCGCGACAACGGGGTCGACGCCGTTCAACCTGAACCTCCACGTCAGC 17880
P L M M T A T T G S T P F N L N L H V S

GACGTTGGGCACACCCTCATCTTCGGCCCAACGGGTGGCGGTAAATCAACGTTGTTGGCG 17940
D V G H T L I F G P T G G G K S T L L A

ACCATTGCCGCGCAGTTCAGCGCTACCCGAACCTCCAGCGTGATGGCGTTTGATAAAGGT 18000
T I A A Q F Q R Y P N S S V M A F D K G

CGATCGCTCCTGCCGCTGGCCCTGGGCATGGGCATGCACTACGACATCGGCTCAGAGGAA 18060
R S L L P L A L G M G M H Y D I G S E E

GGGGGGCCGAGTTCTGCCCGCTTCAGCACCTTGAGAACGCTGCTGACATTGCGTGGGCG 18120
G G P Q F C P L Q H L E N A A D I A W A

CAAGAATTCATTGAGATGTGCTACTCGCTGCAAGCTGGTGAGGACATGGTTCCGACGCAG 18180
Q E F I E M C Y S L Q A G E D M V P T Q

AAGCAGGCTGTATACGAGGCGCTGTTGAGCCTGCAGAAGAAGGACCACAGATCGCTCAGC 18240
K Q A V Y E A L L S L Q K K D H R S L T

GATTTTCGTGTGACACCTGCCCGAGGATCTGCGCGCCGCGCTGAACTACTACACCATTTCC 18300
D F V S D L P E D L R A A L N Y Y T I S

GGCCCCATGGGCTACTTGGCTTGACGCGCAGACGGATGGGCTGAAGGACACACCATTCAAC 18360
G P M G Y L L D A Q T D G L K D T P F N

GTCATTGAGGTTGATGAGCTGATGAAGCTCGGCGACAAGGCCCTCACTGCCAGTGCTGAGG 18420
V I E V D E L M K L G D K A S L P V L R

TACTTGTTCGCGAGGTTTCGAGAAGAGCCTCAAGGGCCAGCCTGCCATGCTGATTCTGGAT 18480
Y L F R R F E K S L K G Q P A M L I L D

GAGGCATGGATGGCCCTGGGCAATCCGGTGTTCAAAGCGGCACTCAAGATGTGGCTGAAG 18540
E A W M A L G N P V F K A A L K M W L K

GAACTCCGCAAGGCCAATTGTGCTGTGCTCCTTGCAACGCAAAGCCTCTCTGATGCGGCG 18600
E L R K A N C A V V L A T Q S L S D A A

AACTCGGGGATCCTGGACGTTCTTCGGAATCGTGCCCGACAAAGATTTTCTGCCAAAC 18660
N S G I L D V L R E S C P T K I F L P N

AAAGACGCCCTGCAGGACACCGCGCTTTACAAAAGCTTCGGCCTCAACGAACAAGAAATC 18720
K D A L Q D T A L Y K S F G L N E Q E I

AAACTCATTTCGAAGGCAAAGCCCAAGGCCGAGTACTACTACAAATCAGCCTTGGGGTGC 18780
K L I S K A K P K A E Y Y Y K S A L G S

CGGGTGTTCAACCTGCGTCTCGGTCGACTCGCCCTGGCTTTCACAGCCGCATCCGACAAA 18840
R V F N L R L G R L A L A F T A A S D K

GTCTCCATCGCGGTATCCGGGCTCTCCACAAGCAACACGGCACCAGGTTGGCACCAGCAC 18900
V S I A R I R A L H K Q H G T G W H R H

TGGTTGGCAGAGAACGAGATCGATTACCACAAATATCTCAACGAAAGAGGTGAAGCAGCA 18960
W L A E N E I D Y H K Y L N E R G E A A

trbJ →
TGAGCACGAACATTCGCACTACCTGGAACGCCACCATCGCTGCTGCCAGCGCTTCGCC 19020
*

M S T N I R T T W N A T I A A A Q R F A

Anhang IV

GCACGGGTGTGATGTGTGTGTCGCGCTGACCGCCGCGGGCGCGGCATGCATCGCCGTTGGCC 19080
R T G V M C V A L T A A G A A C I A V G

CGGCCAACGCGCAGTGGGCGGTAACCGACTTGCCGACAGACCATTTCAGGTCATGCTGGCTG 19140
P A N A Q W A V T D L P Q T I Q V M L A

ACCTGAAGCGTGCCAGGACGACTCCAAGTCGTTCCAGGCACAGTCCCAGCAGCTTTCAA 19200
D L K R A Q D D S K S F Q A Q S Q Q L S

CGCAGCTGCGCCAGTACGAAGACATGGCGCGCAACAGCGGCCCGCCTGAGTGAGTCGCAGT 19260
T Q L R Q Y E D M A R N S G R L S E S Q

GGGCATCGGTACCCGGCGATATGAAGAAGCTGCGCAACGTCTACAACAAGACCAAAGCGT 19320
W A S V T G D M K K L R N V Y N K T K A

TGGCCTACCAGGCTCAAGATTTTCGACAAGCAGTTCAAGGGCACGTTCCGCGACTACAAGG 19380
L A Y Q A Q D F D K Q F K G T F R D Y K

CATTCGCCAGTGCACGCCGGGACAAGAATTTTCGAGGACGAGTACGCCAAATGGGCGGAGT 19440
A F A S A R R D K N F E D E Y A K W A E

CGGGCTTTGACAACGCCAAGAACGCGATGGAAGCCGGCGGCATGCAGGTCGAGATGATGG 19500
S G F D N A K N A M E A G G M Q V E M M

ACGACGAGGATGCCGTGCTCGCTGACCTGGTCGCGCAGAGCCAGAGTGCCGGCGGCCGCA 19560
D D E D A V L A D L V A Q S Q S A G G R

TGCAGGCGCTTCAGGTGGGTAATCAGATGGCCGCGCAGCAAGTCCAGCAGACGCAGAAGC 19620
M Q A L Q V G N Q M A A Q Q V Q Q T Q K

TCCGCCAGCTGCTGGCTGCCCAAACCAACATGCAGGCGCAGGCGCTTGCCAGCAAACCC 19680
L R Q L L A A Q T N M Q A Q A L A Q Q T

AGCGGCAGGCTGCTGAAGACGCAAACACAAACCGCTTCTTCAACCAGCCCAAGAAGAGCA 19740
Q R Q A A E D A N T N R F F N Q P K K S

orf2 →

AGGGCAAGGAGTTCTGATGCGAATCCTGGACAACCGTAGGCGGCTCGGCTGGCAGCGGAT 19800
K G K E F * M R I L D N R R R L G W Q R

CGGCGTAATGGCTGGCGCGCTGTTTCATGGCAAGTGCCATTTTCAGGCTGTGACAAGCCGCA 19860
I G V M A G A L F M A S A I S G C D K P

GCCTGTTTTTAAAGCTTGATCTTGAGGCCCTGCAGACCAAGTGCTATGCCGGCAGCGTGCA 19920
Q P V F K L D L E A L Q T K C Y A G S V

TCATTGCGACACCTACGAGAACGCAACCGGTACGGATCTTCCGTACGCGGAGAATGTCCG 19980
H H C D T Y E N A T G T D L P Y A E N V

trbL →

CAAGGCCCATTCCAAACCCAAGACCAAGGGAGCTGAGTTCTGATGGCTGGCCTCCGTGTA 20040
R K A H S K P K T K G A E F * M A G L R V

TGCCTGCAAGCGGGTGGTTGGGCCTTGGTCGCGAGTGTGGCGGTTGCCGACACCCGCC 20100
C L Q A G G W A L V A V L A V A A A P A

TTCGCGGCAGACCTTCAAGATCCAACCGCGTCGTTTTCGATGGTCTGCTGCAGCTCGTGCAG 20160
F A A D L Q D P T A S F D G L L Q L V Q

CAGACCTCGGCCGCATGGGGGCCCAAGTTGCAGGGCTACGCCGTGAAACTGTTCTGGCTA 20220
Q T S A A W G P K L Q G Y A V K L F W L

TTAGCCACGATCCAGTTACCTGGAGCATGGGCATGCTGGCGTTCAAGAGTCTGATTTT 20280
L A T I Q F T W S M G M L A F K S P D F

GGCGAGCTTTTCGGGGAGCTTTTTCGACAGGTGATGGTGTATCGGGTTCTGGTTTCGCATTC 20340
G E L F G E L F R Q V M V I G F W F A F

CTGATGTTCTCGGTGCAATGGAACACCGCCATCATCGACAGCTTTTCGGAAGCTGGGGCC 20400
L M F S V E W N T A I I D S F R E A G A

GCAGCAGCCGGATCGTCAAGGCGCTGGTTCCCTCGGACATGTTCTCGCTGGCGGTCGAC 20460
A A A G S S K A L V P S D M F S L A V D

Anhang IV

TTCCGCCACCAAGATCGCACAGTCCGGTGCGGGGCTGGTATCGCCAATGAATCCGTTTCGCG 20520
F A T K I A Q S G A G L V S P M N P F A
CAAGTCCTGACGTCCATCTCCGCGATCATTGTTCTTCTGTGCTTTGCCTTCATTGCGGTT 20580
Q V L T S I S A I I V L L C F A F I A V
CTGATGCTGGTTGCGCTTTTTGAGAGCTACATCGTGGTCAATGCTGGCGTGATGATGATG 20640
L M L V A L F E S Y I V V N A G V M M M
GGATTTGCGGGCTCGTCTGGACGCGCGACATGACCCTGCAGTTCCTCAAGTACGGCGTT 20700
G F A G S S W T R D M T L Q F L K Y G V
TCCGTAGGTGCGAAGCTGTTTCGTCCTGACGCTCCTGGTGGGATTGATCACGCAAGCGTCC 20760
S V G A K L F V L T L L V G L I T Q A S
AGCACCTGGGCGGACGCGTATCAACCGATGTCGGCAGATGGTTCTTCTACCTTCACGCTG 20820
S T W A D A Y Q P M S A D G S S T F T L
CTGGGGCTTTCGCTGTGTTGTGCCTACTGCTGCAAGACGATCCCGGAGCTGATCCAGGGC 20880
L G L A L C C A Y C C K T I P E L I Q G
GTCATCGCAGGCGTCTCACCCGGCGGGCGGGCGCGATCGGTGGTATCGCGGCCGCTGGC 20940
V I A G V S P G G G G A I G G I A A A G
ATTGCGGGCGCCGCTGCAACGGCTGCGGTGGCAAAGACGGTTGCGACTGGTGGTGCCGCG 21000
I A A A A A T A A V A K T V A T G G A A
GCACCCGCAGCTGCAGGTGCTCTCGGCAACGCAGCCAACTCGGTTGGGTTCGGCTGCCGCT 21060
A P A A A G A L G N A A N S V G S A A G
GTGGGAGCGGGCGAAACACTCACCCAGTACAGGCGGTGCCGCTGGTGGTGAAGGCGCAGGC 21120
V G A G E T L T S T G G A A G G E G A G
ACGGCGCTGAATGAACTGGGTGAGGGCGTGGGCCGCGGTGGCGCGGCTCCTGGTGATGCT 21180
T A L N E L G E G V G R G G A A P G D A
GCGGATAGCTCGGAGGGTGGCGGGCGGGGATGTGGGTGATTCCGCAAGCGAATCTGGC 21240
A D S S E G G G A G D V G D S A S E S G
GATGGCGGCGATGGTCAAGAGTCGGGCGAGGACGAAGGCGGGCCTTCGGCAGCGAACGAT 21300
D G G D G Q E S G E D E G G P S A A N D
GAAGAGTACAACCTCCGGCACCGACGTGCAGGACGAATCCGGTGATGGTTCCGGACGTTGAG 21360
E E Y N S G T D V Q D E S G D G S D V E
GATGGCGCTGCAACATCTGGCGGCGAGGGCCAGGGAGACGCTAGCAAGAACGAAGGCAAAA 21420
D G A A T S G G E G Q G D A S K N E G K
TCTTCCTTGGGCGGCTTGTGTTGAGGCCGGGCGGCACGCCGGCCGAGGCGCCTATGCGGCC 21480
S S L G G L F E A G R H A G R G A Y A A
GCCGCAATGGTGACGCCAGGGATCGATAACCAGCCCCTCAGCGGATGGGTTGGCCACCGGC 21540
A A M V T P G I D T S P S A D G L A T G
CCAGGCAACTTGAAGGGCGGCGGCGGAAAAGGGCGGTGAAGACGGTTCCAATCCGTCAGCA 21600
P G N L K G G G E K G G E D G S N P S A
GCGCCGAGGCGGACAACGTCAAGCCGGATACACAGCCTGAAGGAACGGACAGCAAG 21660
A P Q A D N V I K P D T Q P E G T D S K
AGCGGCGGAAAGACGGACGATCTGAAGCCGCTGCGAAGGACTAGCCCGGTTATTCGACA 21720
S G G K T D D L K P P A K D *
GCGGTACAGAACCCTGTTAGGACACCCGATCCCTAAAGAATGCGCGCTGCCAGCCGTT 21780
trbF
ACTGGGCTGGTCAGCGCGTAGCAAGCCATATATGATAAAGACTATATGAAGCGCGACGCT 21840
M K R D A
CAGAAACCGAAATCCAAGCCCTCGGCCAGCCCCTACGATTCCGCAAAGCAGGAATGGTTG 21900
Q K P K S K P S A S P Y D S A K Q E W L
GAGCGGTACGGCACCTACATCGCCCAAGCCCGAAACTGGCGCTATGGGGCCTTCGGAGCC 21960
E R Y G T Y I A Q A R N W R Y G A F G A

Anhang IV

CTGGCAATCGCATTCTGTTCGGTAGGGCGCCTGGTTCATGGTCAAGAACGACCAGCGTGTC 22020
 L A I A F L S V G G L V M V K N D Q R V
 GTCGCCTATGTCATTGCGACGAACGGCGATGGCAGCGTGACCGAGGTACGTCAGATGCAG 22080
 V A Y V I A T N G D G S V T E V R Q M Q
 GCCGGCGTTTCGTCCGGAACAGAAGCACATTCGCGCTGCCCTGAACGAGTGGATCACGGGT 22140
 A G V R P E Q K H I R A A L N E W I T G
 GCACGTGTGGTCTACGTTCGATGGCAAGGCGATCGAGAGCGTGGTGGCCAAGACCTACTCG 22200
 A R V V Y V D G K A I E S V V A K T Y S
 ATGACCCTTCCGGGGTACCCGGCGTTTCAGGAGCTGAGCCAGTACCACCGGGCCAGTTCG 22260
 M T L P G S P A F Q E L S Q Y H R A S S
 CCGTACACGCGTGCAGCACAGGAAACAGTTGATGTCCGCGTGAATCCGTCTGCCCTG 22320
 P Y T R A A Q E T V D V R V E S V L P L
 AGCGATTGACCTGGCGCATCGAATGGATTGAGGTAATTCGCGCGCGTGGTGGCCGGGAA 22380
 S D S T W R I E W I E V I R A R G G R E
 GTGCGCCAGCGCCGCTGGCAGGCAACTGCCACGGTTCGAGATCCGCACGCCGACTGAAGCA 22440
 V R Q R R W Q A T A T V E I R T P T E A
 TCGGAGCTGATGAAAACTCCTTTGGTGTTCGTCACCAACTTCTCCTGGGCCGAACGG 22500
 S E L M K N S F G V F V T N F S W A E R
 CTCTGATGAAAAACGCATTTAGGACCATGAACATGAAGATGAGCATCGGCGTGCTTTCGG 22560
 L *
 CCGCACTGGCGATTGCAGCATTGCCAGCTGCGGCGCAGGAGGTCCCCGCGCTGGGCAAGC 22620
 GAGTGCTTGAGGGCGTTGTGGTGGCGGAGGTCAACATGATCTCCAATGCGCCGGTGAAGC 22680

trbG →
 TGTCGGATAAGGAGCAGCATGCTGGTGGCGCTTGCCGCGAAGTGGATGGATAACCCGGAC 22740
M L V A L A A K W M D N P D
 AAGCCCCGCTGGGAGTCGGATGGCAGCGTGCCTTACCTGTTTGGAGCAACGCTACCGACC 22800
 K P R W E S D G S V R Y L F G A T L P T
 CTCGTCTGCGCGCCGATGCAGATTTGCGTGATTTCGCATGGAGCCAGGCGAGACGGTCAAT 22860
 L V C A P M Q I C V I R M E P G E T V N
 CAGATTGACGCTGCGGATAAAACCCGGTGAAGTTCAAGCCGACCATCGTCGGCTCGCCG 22920
 Q I D A A D K T R W K F K P T I V G S P
 CAGGGTGAGATCACGAAATCGTTCGTGAAGGCGACGGATTCCGGCCCTTGAGCAGAGCATC 22980
 Q G E I T E I V V K A T D S G L E Q S I
 CGCATCGCAACGGATCGCCGTGGCTACACGATCAAGCTTCGGAGCACGCCTTCGACCTGG 23040
 R I A T D R R G Y T I K L R S T P S T W
 ATGCCGATGCTCGCATTTCGACTATCCAGAGGACGTTGATCGTGAGTGGGCCGATATGCA 23100
 M P M L A F D Y P E D V D R E W A A Y A
 GAAACCCGCTCCAAAAGGTGGTTGCGACGACCCTCCCCACCGGCCAGACGTTTGGCGAG 23160
 E T R S K K V V A T T L P T G Q T F G E
 TTGGATTTTCGGTTTCCGGATGAGTGGGGACAAGCCAGCGTGGTTGCCGCTTCGCGTCTAT 23220
 L D F G F R M S G D K P A W L P L R V Y
 ACCGATGGCGTGAAGACCTACATCCAGTTCCCGGACACCATGCAGCATGGCGAATCTCCA 23280
 T D G V K T Y I Q F P D T M Q H G E S P
 GCGCTTGTGGCGATGGATGGTGGCCAGGAGCAACTGGTGAACCTACCGTGGCCGCTGGTGAT 23340
 A L V A M D G G Q E Q L V N Y R A A G D
 CGATATGTCATCGATAAGGTGATCGAACGGGCCGCTCTGATCTCCGGTGTGGCCGCGAT 23400
 R Y V I D K V I E R A A L I S G V G R D

trbH →
 CAGCGCCGCGTGACCATTTCCCGGACCAGGGCACGATGATGCGACGCGTGCTACTGATGA 23460
 Q R R V T I S R T R A R * M R R V L L M
 CATGCGTGGCTCTCGCGCTAAGCGGCTGCAGCGGGATGCTGCGCAAGCCTTACATCTCGC 23520
 T C V A L A L S G C S G M L R K P Y I S

Anhang IV

GAGGGGTTTCCGAGGCGGATGCCGCGTCGATAGCGGTGGAAGTGGCGACATACATTGGGC 23580
R G V S E A D A A S I A V E V A T Y I G

GAATGCACCCGCCGGCTCGCACGCTCATCGCCATTGATCTACCCCGGTTTGCACGTTGGC 23640
R M H P P A R T L I A I D L P R F A R W

GCGACCCTGTTGCACCCGTTCTCGCGGAGTCTCTTCGGCGTGGTGGTTTCGCGGTCATGG 23700
R D P V A P V L A E S L R R G G F A V M

AGAGCGATACGGGCGTGATGATTCCGGCCAACGCTCATCGCGTTAGCTATTTCGGTCTCTG 23760
E S D T G V M I P A N A H R V S Y S V S

CATGGTCGGATGGCGTATCGGTGCAGGTAGAGCTGGACGGAATTATTGCCTCACGCTGGT 23820
A W S D G V S V Q V E L D G I I A S R W

ACGTGCGTAGCGCCAATGGTGGGCTGTTGGCAGTTTCGCCGTTTCGCGGTCCGGGAGGTTG 23880
Y V R S A N G G L L A V S P F A V R E V

GCTATGTCGCTGAAGAAGT^{*trbI* →}GAGCCAGGTTTCAGGACGACATCGGCGGACCGGATGACTCG 23940
G Y V R * V S Q V Q D D I G G P D D S

CCCGATTTCCAGATCCACCCGAAGCCACGCCGCAAAGGGCCTGAAGCGGATCAACAAG 24000
P D F Q I H P K P T P P K G L K R I N K

ATCCCATTTGGTGATCGTTGGTGTGATCGTGGTGGCTATCGTCTTCGCCATCACCTACACC 24060
I P L V I V G V I V V A I V F A I T Y T

ATGAGCGAGCGCCAGGCTGCCGAGATGCAGCAGAAGTCGACGCCGAAAACACCGGTTTCG 24120
M S E R Q A A E M Q Q K S T P K T P V S

CTCAACGAGGCTGCTGCTGCACCGACCACGGCCGGCTCCGCGATGTCGGGCGACGGCTAT 24180
L N E A A A A P T T A G S A M S G D G Y

ATCGCGCCGGATATGCCCGCCGATCCGGTTATGCCAGCTGGTGGTCCGCCGCCGCCGAG 24240
I A P D M P A D P V M P A G G P P P P Q

GATATTCTGACGGCGCGCCTTCAGATGGATCGGGCGGGCGGCCCGGGCCTGATCGATGCA 24300
D I P D G A P S D G S G G G P G L I D A

TCGCCGAGCCATCGCCCCGAGGAACAGTTTCGCTGCTCAGTGGCGCATGGCACGTCTGGAG 24360
S P E P S P E E Q F A A Q W R M A R L E

AAGCTGAAGGAGCTGGAAGAGTCGAAGTTTCGAGGCGCAGCGGGCTGCGCTCCAGGGCGAC 24420
K L K E L E E S K F E A Q R A A L Q G D

TCCACATCAGGCGGAAAGGGCGAGCAGAATGCCGCTGCGGGCGGGTCTTGACCCGGCCACG 24480
S T S G G K G E Q N A A A A G L D P A T

ATGGCGGCTCTTTTCGGGTCTTTCAGGGGTGAACACGGGCGGGATGGACCCGGCCACTGCC 24540
M A A L S G L A G V N T G G M D P A T A

GCGCAGATCGCGGAGCTGCAGAAGCTCAGCAGTGCAGCCCTTGGCGGTGCTGCTGGTCAG 24600
A Q I A E L Q K L S S A A L G G A A G Q

GACGCCGGGCGCCAGGCTCAGGCCGATAAGCGTGCCTTCTTGGAACAGGGTGGAAAGCTCG 24660
D A G R Q A Q A D K R A F L E Q G G S S

GAAACGTACCTGAAGGCAACCCGGGAAGTGGCGCTGTCGCCATATGAGCTGAAGGCCGGT 24720
E T Y L K A T R E V A L S P Y E L K A G

TCGTTGATCCCGTCGATGCTGATCAGCGGCATCAACTCGGACCTGCCGGGCCAGATCATC 24780
S L I P S M L I S G I N S D L P G Q I I

GGCCAGGTGCGTGAGAACGTCTACGACACGGCCACCGGGAGGCATCTGCTGATTCCGCAG 24840
G Q V R E N V Y D T A T G R H L L I P Q

GGCTCCAGGTTGGTTGGCACGTATGACATTGGGATCAGCTTTGGCCAGAACCAGGCTGCTG 24900
G S R L V G T Y D I G I S F G Q N R V L

GCCGGCTGGACCCGTGTCATCTATCCGGATGGCTCTTCTTTGAACATTGGCCTCATGCCG 24960
A G W T R V I Y P D G S S L N I G L M P

GGTTCGGATCGGGCTGGATACGCGGGCTTCGGCGACAAGACCAACAACCACTATCTCAGC 25020
G S D R A G Y A G F G D K T N N H Y L S

Anhang IV

ACGTTTGGGAGCGCGTTTCTGATCGCGGCTTTCACCTCCGGTGTCCAGCTTTCACAGCCC	25080
T F G S A F L I A A F T S G V Q L S Q P	
AGGAGCAGCGGAACGAATGGCGCGTATGACTCGCAGCAGATCCTGGCCGGGGAGCTGGGT	25140
R S S G T N G A Y D S Q Q I L A G E L G	
CGCCAGCTTGGCCAAGTCGGTGCCGAGCATGCGAAGCGCAGCTTGGACCGCGCTGCAACG	25200
R Q L G Q V G A E H A K R S L D R A A T	
GTGGAGGTACGCCCCGGGCTACAAATTC AACGTGATGGTCAGTAAGGACATCATCCTGCCG	25260
V E V R P G Y K F N V M V S K D I I L P	
CCATACAGCCGT CAGCGATAAACGCAAGGAATCACTACACATGCACGTTTCAATTTTTTG	25320
P Y S R Q R *	
CGCGCTGGCCTTGGTGCTGGGGCTTGGATGGACGCCGATGGCCGCGGCACAGCAAAGCGA	25380
TGCTCAACGATGCCTCGACGCGGTGAAGCCCGTCTGCGCAACGAGGACGGGTGCTGTC	25440
CCCCAACCCGGCCTTTCGACGAGTGCCTGCGCAATCCGTTGATCACGGCGCGGCCAGCGCC	25500
CCGGCCAGCGCAGTTGCTGCACGCGCGGCCGCGGTGCTGCAGCCGTGCCCCAGCCGT	25560
TGTGCCCCAGCGCAATGGCGCGCGATGGCGAATGTGACTGTGCAATCCACGATCCGCTC	25620
ATGGTTGCCGCAAGGCTGGCAGCTGAAGTGGGACACCAAGGAAAAGCCCCGTGGCGTCGA	25680
GCTGCACATCACCGGGGAGTTCCTGGACGCGATGAAGGCACCTTGCCGGTAGTCGCCGGCA	25740
GTGGACGGACAGCGATGGCGGGCGCTGCAGGTGCTGGTCTTCAAAGCCGACCGAATCGT	25800
CCAGGTCCGCGAGGCCACCGCAATCGTCGAACAGGGGGCAGGCAGTGCSCCCGAGTTCG	25860
CACCGAATCCCTTTCTGGAGCAACCCCGTGAATAAACGATCTGTCTTCTGCTGCGCCGGC	25920
CTGCTTGCATTGGCGGCCTCTGCTGCATCGCATGCTGCCGATGCGCCGGGGCGGGCGGCA	25980
TCGGTCGATGACGACGGGTTCGTCGTCGTCGAGGCTGGCAACTACACCCCGCCACCGGTG	26040
GTCGTGCCGCCGAGGGTCTGAAGCAATGGAAAGTGCSCCGCAATACGCCGCTGAGGCAG	26100
GTCCTGGCGACCTGGGCCAGCTCGGAAGGGTGGGAGTTGTACTGGCCGAAGGCAGATGAA	26160
ACCACCGACCTGGTGTCTGAGGTGATGTCAGTTTTCGGTGCSCCGAATCTGGAGGACGCG	26220
GTGACCCGCTTCGCCAACGGCCTGCCGCCGACGTGAATATCGCCGTGACCTTCAACCGC	26280
GCCAACAATCCCAAGCTCCTGCACGT CAGCGAGTCCACCCGTATGCAGACCGTCATTTT	26339

Kontig-Sequenz E18S15

Die Kontig-Sequenz E18S15 besteht aus sequenzierten Bereichen der Inserts der Hybridplasmide p1063E18 und p1063S15. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der putativen Methylase ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.

meth →

TGCAATCGACCTGTTTTCGGGGCCTCGGGGGCTTCAGTCTCGGAGCGGAGCAGGCAGGCTG	60
A I D L F A G L G G F S L G A E Q A G	
TGAGGTGGTATGGGCGGCAAACCACTGGCCAGCGCCGTGGCGGTGCACAGCGCAAATCA	120
C E V V W A A N H W P S A V A V H S A N	
CCCGCGTACCCAGCACGCCTGCCAAGACCTGCAGCAGGCCAACTGGACGCTGTTACCTGA	180
H P R T Q H A C Q D L Q Q A N W T L L P	
CTTCGATCTTCTGCTGGCGTCGCCGGCGTGCCAAGGACATTCTCGTGCCCGTGGCAAGGA	240
D F D L L L A S P A C Q G H S R A R G K	
GCGGCCGCACCATGATGTGACGCGATCGACGGCGTGGGCGATTGTCGCTGCGCTGGAGTG	300
E R P H H D V T R S T A W A I V A A L E	
TCATCGCCCCGAAGCTGGGCTGGTAGAAAATGTACAAGAATTTTTGAGCTGGGAGTTGTT	360
C H R P E A G L V E N V Q E F L S W E L	
CCCCGCGTGGTGCAGCGATTACCGCGCTTGGATATGCCATCAGCCCGCACCTGGTCGA	420
F P A W C A A I T A L G Y A I S P H L V	
CGCCGACAGATTTTGGCGTGCCCCAGCATCGGAAGCGGATCTTCATTGCGCTCACCCGACG	480
D A A D F G V P Q H R K R I F I A L T R	
CAAGCATCCCATCGAGCTTTCGATCCCGCAGCTGGAGCTTACCCCGCCAGCAGCTTTAT	540
S K H P I E L R I P Q L E L T P A S S F	
CGATTTTACGCCGGCACGTGGTCTCCGATCGAGCGTGCAGACGTTCTCCGGCGACGTT	600

Anhang IV

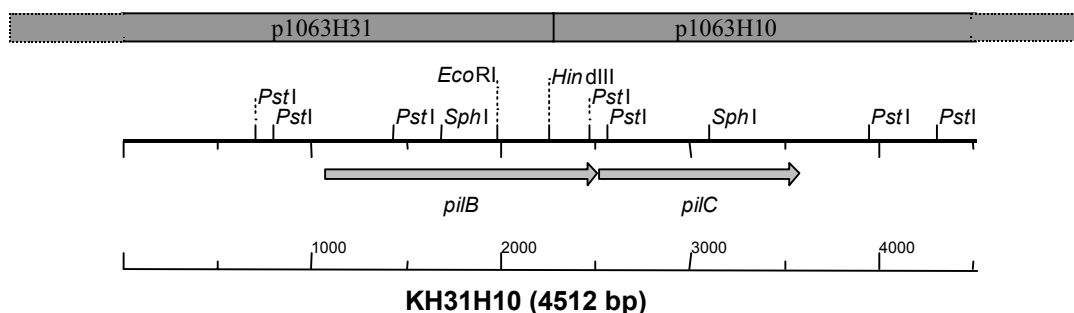
```

I D F D A G T W S P I E R A R R S P A T
GGCGCGAATTCGTAACGGTTCGTGCCGCTTTTCGGGGATCGCTTTCGTGGCGCCGTACTIONTCGG 660
L A R I R N G R A A F G D R F V A P Y F
GCGCGGATCCGGCCTCACCGGTCGATCCCTGGCGCGGCCGATTGGCACCATTACCACCCG 720
G R G S G L T G R S L A R P I G T I T T
CGATCGTTGGGCGGTGATCGACGGCAGCCGCATGCGGATGCTGTGCGGTGGCAGAGGGACG 780
R D R W A V I D G S R M R M L S V A E G
CAGCGCGATGGGGTTCCCGGACACCTATCAGCTTCCGGAGAACAAGCGGGACGCGATGCA 840
R S A M G F P D T Y Q L P E N K R D A M
CATGCTGGGTAACGCGGTGTGCCCGCCCGTCGCGCGGGAACCTTATCCGGTCGCTCGTGGC 900
H M L G N A V C P P V A R E L I R S L V
CGCCGCCTGACCAGGTGCAAAAAGCAGACCAAGGTGAGCTGAAAGCCCTTGACTAACTGT 960
A A A *
ATTGTATGCAATACAGTTAGTCATACACTAAAACAAGTTCTGTGATGCGTGCAACGTT 1020
TCATCAACGTCGTTTCAGATGCTACGGATTTCGCGCTTTCGCGGGATGCTGGGAAGCGCGCA 1080
GCGATAGCTTCAATGATCAGTAATTGGAAGGGGCTTTCGCGATCTCATTTCGATTTCGCCTTC 1140
ACGTTTCGGCGGAGTGACAGTGGGCACC 1166

```

Kontig-Sequenz KH31H10

Diese Sequenz besteht aus den sequenzierten Bereichen der Inserts der Hybridplasmide p1063H31 und p1063H10. Ca. 7 kb stromaufwärts von *pilB* liegt die Transferregion von pBI1063.



Physikalische Karte des sequenzierten Bereichs der Hybridplasmide p1063H31 und p1063H10. *pilB* und *pilC* Gene des Typ IV-Pilusbaus. Die nicht sequenzierten Bereiche der Hybridplasmide sind gestrichelt und verkürzt dargestellt.

Sequenz KH31H10:

```

ACGCTGACCAGCGCTGATGGTTTTGAGCATCTGCGAGCTGCCAGGAACCCCTGGCAGCGA 60
TACGAGCGTCGCGGTGCCATCAATGACGGCGTGTGGCGCTTCCAGCGAGCTGCCGCTTGG 120
ACAGCGGTGCGGAGCGATGGCGCTGCTTCATACCGGACTGAGAACGCGTGTGGTACCGGC 180
GACGTCGCCACCGCACAAAGCCTGGTGTGGTGGCGGACGACGGGACCTGGTACCGCACTGAA 240
TCAAAGGAAACCTATAACACCGAGATGTCCACTCAGCGTGTGCGCATGATGCGGACGCTG 300
CAACTGTTTTGCCGACCATTGGACGGCAAACCAGGCATTTCCCTCCACTGGAAACGACGGG 360
GTAGGGCTTGACCGGGGCGAGCAGCGCACGTTGGCGGCCTTGGCGGGCTACTCAGGCGCG 420
GCGGCGAAGTGTGCGGGCGTATTTCGTCTGGCGGGCATTCCACTCGATTGTGGCGCGTTG 480
TTCGACCACTGGGGCCAGCCAGTCAAATACCAATTCCAGTCGTCCAGCCTGATCGTCTCTC 540
ACCACCGAAACACCCCTTTACAGCCGCTGACGGTACCCCCGTTGTGGTTGCAACCCCTTG 600
CAGGTCCAGGAGTAACCGTGTCCGCGATGATGAAGAGTTCCAGTAGCCCCGTCGACCAGC 660
TCGTAGCCGAGTGGGGCTGGTTGAATCCTCCGCGAGAAATACTGCAGCTGGCTGAGCTGG 720
CGTGGCTGTGGGACCCAGCCAGGCGAAGCCCTCCGTGCGCTGAAGGTTTTGAACGATG 780
CTGATCTGGCAGCCTGCAGGCGAACAAGCCGGCATCGAAGGACCTGCTTACCTACGCCG 840
CAGAGCAGCACCCGTCACGGTGCAGCCGGTGCAGGAGCAAATTATCGCCATCACCGGCG 900
GATCGCCCTTCTACAGCCAGCTCAAGTACCTCAGTTCGCATCCGGATATGGTCAAGACGG 960
AGATCCGCGGCCGCTGCGATGCGCTTGAATGCGTGTGATGACCATCGAGAACGCCCGCC 1020

```

Anhang IV

pilB →

CGGTCCTGGTGTTCGCGACCCATACGGGCATGACCAAGTTCGAGACCATGGGCCGTTTCGG 1080
M G R S

AGCGGTCCGAGGATCCGCTGACCGCCGCGGCCGGTGAACGCCCGTTGCTCGCGGTTGGGG 1140
E R S E D P L T A A A G E R P L L A V G

CGCGTGACGACATCTCGGTGTTGTTGTTCGCGCCACCGCAATGGGGAAACCTACGCCAACG 1200
A R D D I S V L L S R H R N G E T Y A N

AACAAGCCCAGGTGTGGTACGCCGCAACTGAGGACACAGAGAACCATCCGGAGCGACGCG 1260
E Q A Q V W Y A A T E D T E N H P E R R

AGCTGATTCGCTTGCTCGATCATGCAATTTCCACGAAGGGGACCGACATCGCGCTGACGC 1320
E L I R L L D H A I S T K G T D I A L T

CCAACCTGGACGGCAGCTACGGCGTGTCCGTGCGCCGTTGGGGCGCGCTTGCCCCGGCCA 1380
P N L D G S Y G V S V R R W G A L A P A

TGACCGGTGCGACCTGGCCACCCGAGGTAGCGGACGCGGCAATCCAGGTGCTGCAGAACA 1440
M T G R T W P P E V A D A A I Q V L Q N

AATCGGGGGCCAATCCCGACAATGTCCAGTACAGGACACCGCTGGATGGCCAGATCACCT 1500
K S G A N P D N V Q Y R T P L D G Q I T

ACCGATCCACCGTTGGCGATGCCTTCATGCGGTTGTCTTCATCCCCTGAACCATGGCG 1560
Y R S T V G D A F M R L S F I P L N H G

GCGACATCAAGGGCCGCCCATCGGTGAGCATCCGATTGTTCTCGCGAAGTGAATCTAAGA 1620
G D I K G R P S V S I R L F S R S E S K

TCGACCTGGATGAGCTGAAGCTCCCGGCCGAGGTGAGGTCCGCGATCGAGGACGCCATTC 1680
I D L D E L K L P A E V R S A I E D A I

GCATGCCCGCCGGCGGGATCGTTCGTTGCCGGGCCCATGAACAGCGGCAAGTCCACAACGA 1740
R M P A G G I V V A G P M N S G K S T T

TCGGCGGCATGGTGGGCCTTACCACACCATCTACGGCGAATCGAAGAAGCGCGTGTCCG 1800
I G G M V G L H H T I Y G E S K K R V S

TCGAAGATCCCGTGAACGCTACATCTCCCACATCTCACAGTTCAATGTTCCCACCGTCA 1860
V E D P V E R Y I S H I S Q F N V P T V

TGCATCGCCGGGACGGCAGCAGATTGAAGACCAGGAGCGCTTCAACACGATCATGCGCG 1920
M H R R D G T Q I E D Q E R F N T I M R

GCCTGAAGCGCCACGACGTAATGTGTTCTGGATTGGTGAGGTCCGCGACAAGGAAAACGG 1980
G L K R H D V N V F W I G E V R D K E T

CCGAATTCTGCGTTAACGCGTTCGGTTTCGGGTTGTCTGGCCCTGTCCAGTATTCACGCAA 2040
A E F C V N A S V S G C L A L S S I H A

AAGACTGTGTTCTTTCGCTTTGATCTGCTGAGCCAGTTTCGTGGACGGTACCAAGCGATTCC 2100
K D C V L A F D L L S Q F V D G T K R F

AGCTCGCCGAGGCGATGTCCCTTGTTCATCAGCCAGCGCCTGGTACCCGCCCTGTGCGAGC 2160
Q L A E A M S L V I S Q R L V P A L C E

AGTGCAAGGTTCCGCACGACGCAACGGATGAAGACCGCCCGCGGTGGGATCTGTACATGC 2220
Q C K V P H D A T D E D R R R W D L Y M

AGTTTGCTGGCGAGGATCTGCCCCCTCCCGGGAAGCTTCTACCGATCGGTGCCCGATTCCG 2280
Q F A G E D L P L P G S F Y R S V P H S

AGTCCGGGTGCCAGCACTGTGAGAACGGTTTCACTGGTTACGCGCTGATCTGCGAGGTAC 2340
E S G C Q H C Q N G F T G Y A L I C E V

TGCCCTTCACTCGTGAAGTGCGCACCGCTGCCGGCACCCCTGGCTGCACGGGAAGCGGGTA 2400
L P F T R E V R T A A G T L A A R E A G

CCGCCCAGGCCCGGGAAGTGATGTTCGAGCGCGCACCCCTGACCCTGGTTGCATCGGCAC 2460
T A Q A R E V M S S A R T L T L V A S A

ATCGCGAGCTGCAGGCCGCAACGTCGACCTGAACTCCGTACTTACCTCTGAGGTAATC 2520
H R E L Q A G N V D L N S V L H L *

Anhang IV

pilC →
ATGGAACGACCAATGAACCTGAAGGAAGTGATCAGGTCTGCAGCGTCACTGCGATCGCAG 2580
M E R P M N L K E V I R S A A S L R S Q
CTGGCTGCGGGGCGGGCCCTGAGCTGGGCTGTGGGCAAGCTGATCAAGCAGCAGCCGGAG 2640
L A A G R A L S W A V G K L I K Q Q P E
TATGCGCAGTTTTGGGGCGGTGCCGCTCAGAAGATTGAGAATGGCACTCCGCTGTCCGAG 2700
Y A Q F W G G A A Q K I Q N G T P L S E
ATCATCGGCGGCGTGTGGCCAGAAGAGGGGCGTGGTGGTGGTGGGAGCCGGCGAAGCAACC 2760
I I G G V W P E E G V V V V R A G E A T
GGCAAGCTGCCTGCCGTTCTGGAGCACTACTGCGAATCGCTCAAGCTCCAGCAGCGCCTT 2820
G K L P A V L E H Y C E S L K L Q Q R L
ATCGCGTCCGGCCGACGCATGAAGTATCCGATCGGAATCGTCCGGCGGGCGCTCTTGCTG 2880
I A S A G R M K Y P I G I V G A A L L L
TTCCTTGCGCTTTTCGTGACCGTGGTCCCGGTGGTGGCGAGAGCATTGACCGTGCCAAC 2940
F L A L F V T V V P V V G E S I Q R A N
GGCCGTTCCGGATCAATGACCGGATTCACCGGCGCCGGGATCGCGACGCAGGCCCTGGCTG 3000
G R S G S M T G F T G A G I A T Q A W L
ATTGAGAACTGGCTGTTTCGCTCCGTAGCGCCGTGGCCCTGATCTTCGGTGTGCTGGCA 3060
I E N W L F A S V A A V A L I F G V V A
TGGCTGCGGTGCGCCAGCCTTCAAGTTGGAGGCCAGCGCATGCTGCTGGAAGCTCCCGTG 3120
W L R S P A F K L E A Q R M L L E A P V
ATCGGCCAGCTTTGACAGAGATGGCATTGTTGGGCTCTGGACCAAGTACGCCGAATGTCC 3180
I G P A L T E M A F G L W T K Y A A M S
TTTTCGGCCGGCATTCCGACCGCGACCAGTGTCCGGGCTACGTCCGCCGTTCTGCCGGCG 3240
F S A G I P T A T S V R A T S A V L P A
CCGCTTCGTGCGGGGTGCTTCTTCTTGCAGATGACCTTTCGGTGAAGCATCGCCCGCTG 3300
P L R A G V L L L A D D L S V K H R P L
TCTGAAGCCGTGAACCTCGAAAAGCTAGCTGCGGACGATCCCCGGCAGCGCTGGCCGGAG 3360
S E A V N L E K L A A D D P R Q R W P E
TACGTGATCGACGCGTTCGACGCGGTGATGTCACTGGCCGGCTCGATGAAGAGCTGAAC 3420
Y V I D A F S T G D V T G R L D E E L N
CGGGTGTGCGCGGAGCTGGTCAAGAACGGCGAAGAGGGCGTTCGACCAGGTGCTCAAGATC 3480
R V S P E L V K N G E E A F D Q V L K I
AGCCAGTACGTGGCGATGGGCATTTCTGCGGCGGTAGTGGGCGGCACGATGCTCATGCTC 3540
S Q Y V A M G I S A A V V G G T M L M L
TACCTGCCCATGCTCAGCAATATCAAAAACATCCGGTGAGAACGTCATGCTGAAGAACAT 3600
Y L P M L S N I K N I R *
TTTGAATAGATTGACACCGTCCAAAGGCGGCACCGCTGCGCAGCCTTCGATCGATGTCGC 3660
AGCAGCTCAGGAGCCTAACGATGTGGTGGACGACATTGAGCCAGCGGCGGAATGGAGCT 3720
GGAGGAGATGGTGC CGGCGGCCATCGCGCCGACGGGTAGGCGAAAAGAAAAGAAAGTTTCG 3780
CCAGAAAAGCCGCGAGGCGACCGGGCGGGCGTCTGCACGGACCGATTACGAGATCCTGGC 3840
ACATCCGGACATGCTGGACGAAGCTGGGCACAGGAAGCTGCTGCTTGTGGCCATAGTGC 3900
CTGGGCATCGTTGGATCCCGTGC GCGAAGTNCGAAAACGATGCTGCTGCAGGCCGAGCG 3960
CGGTACAAGCCGGCGGTAGCGGCGCTGGTGGGCCGTAAGGCTCGGGGATTGCGTGTGCG 4020
CTCGATCAGCGCCTGTTGAGCGTAGCCGCACCCGGTACGCGCTGGCACTGGACGCATAC 4080
CTGGCGTGGGGCCTGGCAAACGCGGCAGAGACCACCATCTGCTGGGCGGTGTCGAGAGC 4140
GCTGGCACCACTACCTGGACGTTTTGGTCTTCCAGAAGAAGACCCTGGTGGCGATCGAA 4200
GACCGGGAGCTGCCAGCAATGTCTGAGCAGCGGTTGAGCGTGCCTCTGCGTGTGCTGCTT 4260
GCCGAAATGCGCTCGCAGTTTCCACATGCCAGGATCGTTCGCTGCAGCCCCATTGCCGGAC 4320
TGGGGCCAAGACGGCATCGAGTATTTGGGGGTCAAACCCCTGCGCAGCCTTCGCTTTGCG 4380
CCGATCAATGCCCCGCTCGGTGTCTGCTGGCGCCTACCGACTGGGGGCATCGTGGCGGGC 4440
GTGGGCGTAGTCTGTACTGCACGCTGCTTGC GGTGGGCTGGCAGCAGTACAGCTCGGCC 4500
GGGAAGGAATAT 4512

Hypothetische *oriT*-Region des Plasmides pBI1063

6929 CTGTTGCCTTCTTGGAGCGCTCGTATCGCTGTTGCTGGGCTTTGGCTATGGCTTCTGTCTG

6989 CGGCAGCGACCGTGTGCGTCGCAGACCAAGATGACGTCGAG^{DR1}CCGAAGGCGAGTAAGGCCA
 IR1 → DR2 ← IR1

7049 GGTGATGGATGGGTGCGGGCTTGCCCGCACCCGTACATCACACATCTTGTGCATCTTCTTC
 DR2

7109 TCCGCGATTTTATGCGTTTGCTTGCCCCATCTCCACCCCAGCAAAGCTGACCGCACCCACA

7169 AGCTCTGCGGTGGTTCGGAATGCGGCTTCCAAATCAGCTGCGGAGCAGCTGACACGGATC

7229 ^{DR1}CGAAGGCATTGAAAATCAGGCTCTCGCCCTCTGTTTCGACAACCTGGTGAGGCATCCCGAC
 IR2 →

7289 CGATCCCAAAGAAGTTCTAGGATGAATGGATACTAAATAGCGCTACTTAGCGCTACGTTG
 ← IR2

7349 CATTGTGTTGCATTAAATTGCGCTAAGTGGCATACTTTCATTGCACCGTAGCGCTAAGTA

7409 GCGCTATCGTCCTCACCACTGAAGCCGGGAAAGGCCCATGAA

Inverted repeats wurden als IR bezeichnet und sind als Pfeile dargestellt, *direct repeats* sind mit DR abgekürzt und unterstrichen. Die konservierten Nukleotide der RP4 *nic-site* Familie sind mit Grau unterlegt.

Wilbur-Lipman DNA-Alignment der hypothetischen *oriT*-Regionen von pBI709 und pWW0

21619
 GCAT----CTGTATA**ACAAACGTA**CTACACAAAATGCTAG-----TAAATATGGCTTGTATGGTATATCTGTAAT**ACAAACGTA**TCACGCTGCATTACGCG
 GCA CTTGTA CAA GTA TACAC AATGCT G TAAA CTT TGTA TACAA CGTATCAC A A G
 GCAGATT**GCTTGTAAATG**CAAATGTATTACACGTAATGCTTGATTCCAAAGGTCTAAACAGCTACTT-----TGT**ATTACAAGC**GATCACATCATAAAAGAAG


GCAATTGG-CGCTGTAGCCCGTAGTGTACGCGGGGCCA**CACCTCCC**GAC**AGGGTGGTGC**GTGTT**GTGT**TATTGAGAT**TTTGATCCT**GTTA**AGGATCAAAA**TCATGC**TCTT**
 GCAAT CGC AGC C CGCGG C CACCTCCCG AGGG GGTGCGTGTGTGATTGAGA TTTGA CCTGTTAAGG TC AA T ATGCTCTT
 GCAATACTCCGCA--AGCTCAGGCACAGCGCGCTTC-**CACCTCCC**CA**AGGGAGTGC**GTGTT**GTGT**TATTGAGACTTTGACCCT**TGTTAAGGG**TCGAAGTTGATGC**TCTT**


AAG-AGGGCGTATTCAGT**GCCTAGGCC**GAAGGCCGTAGCAGGGGGATACAAAGTAGGTGCAGAATGGGTGCTGTAAGGCTTCATAGTGATTGCAGTTAGGGTTTAGATT
 AGGGCGT TT AG GCCTAGGCCGAAGGCCGTAGC G GG ACAA G GCA ATGGGTGC GTA GGCT A A TGA TGCAG GGGTTTAG TT
GTTAAGGGCGTTTTTAG**GGCCTAGGCC**GAAGGCCGTAGCAGCGGAGGACAAGGGGTAGGCAATATGGGTGCAGTATGGCTGTAGATTGAGTGCAGAAGGGTTTAGCTT

21993
 GACTACAGATAGGGGTGAGTAGGATGCACGTAGATAGCAACAAGGGTGCATAGAGGGTGCAA
 GACTAC G TAGGGGTGAGTAGGATGCA G A GCAA GGTGCA AGGGTGCAA
 GACTACTGGTAGGGGTGAGTAGGATGCAGGGTAAATGCAATGTAGGTGCAGGTAGGGTGCAA

Ktuple: 3; Gap Penalty: 3; Window: 20 (MegAlign-Programm, DNASTAR)

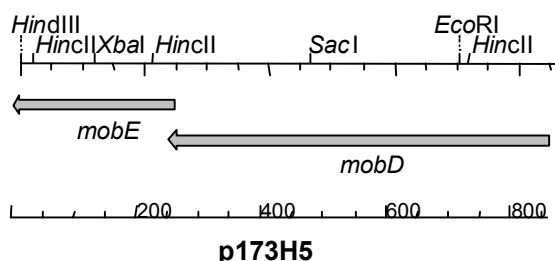
Die obere Sequenz stellt die *oriT*-Region von pBI709 dar, die untere die von pWW0.

inverted repeats sind durch Pfeile dargestellt, *direct repeats* sind unterstrichen. Die rot gekennzeichneten Nukleotide sind in der R388 *oriT*-Familie konserviert.

Sequenzen des Plasmides pKI173

Es werden nur die DNA-Sequenzen aufgeführt, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Übereinstimmungen zu Proteinen bekannter Funktion zeigen.

Das Hybridplasmid p173H5



Physikalische Karte des sequenzierten Bereichs des Hybridplasmides p173H5.
mobE und *mobD* Gene für die Mobilisierungsproteine MobE und MobD.

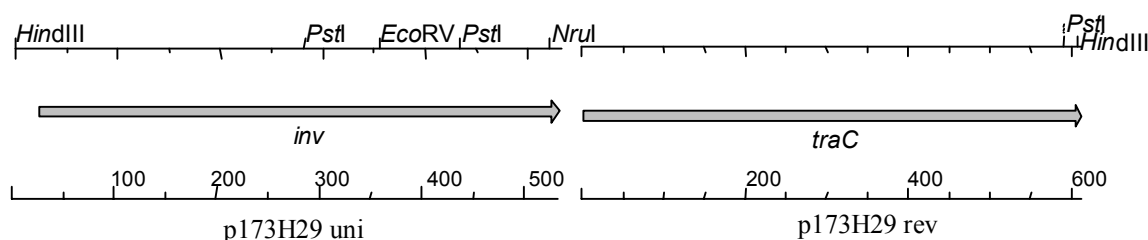
Sequenz p173H5

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Gegenstranges ist über der DNA-Sequenz dargestellt.
mobE, *mobD*: Mobilisierungsgene.

```

A K K S E A D V I E A I L E R Q K E I V
AAGCTTTCTTGCTTTTCAGCGTCAACGATTTTCAGCAATAAGTTCTCGCTGTTTTTCGATAA    60
V D V Q G A I L A P Y K S Y L T D Y S E
CCACATCGACCTGGCCCGCAATGAGTGCGGGGTATTTGCTGTATAGCGTGCATATGATT    120
L A M L I M W M A D N D R I N L A N K V
CTAGAGCCATCAGAATCATCCACATCGCATCATTGTCACGTATGTTTAGCGCGTTTTTAA    180
R Y L R E V E K E S P Q R G L L A K F S
CGCGGTATAATCTTTCAACCTCCTTTTTCTGATGGTTGACGCCCGAGTAATGCCTTAAAAC    240
      ← mobE
S E I D D M
      * G D I V E G I M R A A D R R W R
TGCTTTCAATGTCCATCCATCAATCACCTCGCCAATCATGCGCGCTGCATCACGCCGCAC    300
S L E A R N G I P L E V M A R S I S L R
CGGGATAGTTCTGCACGATTACCAATTGGGAGTTCGACCATCGCTCGTGAAATCGACAAA    360
K S Y L D D S V R D A L D P L L L S K G
CGTTTACTGTACAAATCGTCACTGACTCTATCTGCAAGATCAGGAAGTAATAGGGATTTT    420
G E S E I I E R T K S F N Y L E F K Q E
CCCCCTTCACTTTCAATGATTTTCACGCGTTTTTGGAAAAGTTGTAGAGCTCGAATTTCTGT    480
D G F Y G N R I V H V K T G P L A D R Y
TCGTCGCCGAAATATCCGTTTCTGATTACATGCACCTTGGTCCCAGGAAGCGCATCACGG    540
E K L L E L S D R Q R N I V W L T T L E
TACTCCTTCAGTAGCTCAAGGCTGTCTCTCTGACGGTTGATCACCCACAGCGTTGTAAGC    600
R G L E A L T S N L T E G Y A V V G K N
TCCCGGCCCAATTCTGCCAAGGTGCTATTAAGCGTCTCCCCGTAAGCCACCACCCCTTTA    660
N R A A T N I V V V H D K F E D C A N V
TTGTTACGCGCCGCTGTATTGATCACTACAACGTGGTCTTTGAATTCATCGCAAGCGTTG    720
L D I W G N A D D L D I L R T E I Q D K
ACTAGATCAATCCATCCATTTGCATCATCGAGGTCAATCAGCCTTGTTCATCTGGTCT    780
Y M K W V D P N S T D S E I V L V K V G
TTATACATTTTCCAAACGTCAGGATTTGACGTGTCCGACTCGATGACAAGGACCTTCACC    840
A Q E L S D      ← mobD
CCAGCTTGTTCCAGGGAATC    860
    
```

Das Hybridplasmid p173H29



Physikalische Karte des sequenzierten Bereichs des Hybridplasmides p173H29. *inv* put. Invasionsgen, *traC* Transfergen (Primase).

Sequenzen des Hybridplasmides p173H29

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz und die des Gegenstranges über der DNA-Sequenz dargestellt. *inv*: put. Invasionsgen, *traC*: Transfergen.

uni:

inv →

```

AAGCTTGGTGGCAACCAGGAAGGCGTGTGCTAAGGCACCTTCTAACGGATGCCTACGCAGCC      60
      V L R H L L T D A Y A A
CGCGGAATATATGTTGATAAGCCTCACACATGGCAGCGCCGTGAGGCGACGGATGACGAA      120
  R G I Y V D K P H T W Q R R E A T D D E
ATCAAAGACATCATCCAGCACAAAGCGCTGGGCCGAGCTGAAAAGGCGTCTACCCTACCCTT      180
  I K D I I Q H K R W A E L K G V Y P T L
TCCGACGTCGTTAGGCTGGCCAAGCGGAAGTTGCGCGCCCTTTGGATGGGAATTGATGAC      240
  S D V V R L A K R K L R A L W M G I D D
CAGGATGACGGCAAACAAGCTCTGAGCTGCTTCGAAGACTACTGCAGAACAATGGCTGCA      300
  Q D D G K Q A L S C F E D Y C R T M A A
ATGAACAAGCGACGTTTCAGATCTGGCCAAGTCAAAGGGGCGAAAACGACGACTCCGATATC      360
  M N K R R S D L A K S K G R N D D S D I
GAAGCTCTGGAAAAACGGCTTGAAACAGCGAAGACAAAGGCCGCTGAAGCTCACCAAACG      420
  E A L E K R L E T A K T K A A E A H Q T
TTCTTGAACAACCTGCAGACCGGGCGAGAGTTTGATGATGCGATGAAGTACCACAGCAAG      480
  F L N N L Q T G R E F D D A M K Y H S K
GATGTAATGCTGAGCGTCATTACTCGACTGGAGAACCTGATCGCGACTGGGAT              533
  D V M L S V I T R L E N L I A T G
  
```

rev:

```

L K V A W G A A D R H T L D A A D R D N
AAGCTTTACCGCCCAGCCTGCAGCATCACGGTGGGTAAGATCTGCTGCATCGCGGTCGTT      60
  E R M L K L L H P H Y K R L E D A D I K
TTCGCGCATCAGCTTTAATAAATGGGGGTGATACTTGGCGAGCTCATCTGCGTCAATTTT      120
  I T N G G L E A T A Y S S L A A K G A G
TATGGTGTACCACCCAGCTCGGCGGTGCGATAACTGCTGAGTGCTGCTTTTCCCGCACC      180
  P Q G G L I I A V P Q Q V P K S L M M A
AGGTTGACCGCCAAGGATGATTGCCACCGGTTGCTGGACGGGTTGCTCAGCATCATTGC      240
  H Q A I D E F I L R H E D A E L R F Q S
GTGCTGGGCGATGTCCTCGAAGATAAGCCGATGTTTCGTCTGCTTCGAGTCTGAATTGAGA      300
  
```

Anhang VI

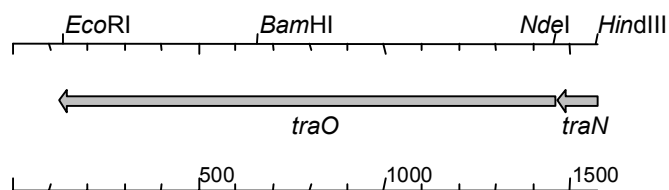
Q D D K P F T Q Q L R E G A K I G K A I
CTGATCGTCTTTAGGGAATGTCTGCTGTAGCCTCTCGCCAGCTTTGATTCTTTTGCGAT 360
A L A E I R L E H I T L T N D S V L G A
GGCCAGAGCCTCGATGCGCAGCTCATGAATTGTGAGGGTGTGTCGCTGACGAGGCCCGC 420
V K L I K Q M A A R T K D W A R G I F L
CACCTTGAGGATTTTCTGCATTGCAGCGCGGGTTTTGTCCCAGGCCCGCCGATGAACAA 480
R E D E A V Y A F V E E A R R M E S K D
TCGTTTCGTCTTCAGCTACATACGCGAAGACTTCCTCGGCCCGGCGCATTTCACTTTTGTC 540
H Y N D D V Y A W I H S L T P E N R T E
ATGATAATTATCGTCAACATAAGCCCAGATATGGCTTAGCGTTGGTTTCGTTGCGCGTTTC 600
L V R A ← *traC*
AAGAACGCGAGCC 613

Das Hybridplasmid p173H39

Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist unter der DNA-Sequenz dargestellt. *traE*: Transfergen (Topoisomerasegen).

traE →
AAGCTTTCTCGGCCAGCGGCACCACACCCGTGCAAATGGGTTGGAAAAGCAATCTATCAGG 60
A F S A S G T T P V Q M G W K A I Y Q
AGCCGCCACCTTTGGACGGCGCAGAACCAGGACAACTTCCCACGCTGACGTTGC 120
E P P P L D G A E P A E D N L P T L T L
CGACGCTGAGTGAAGGGGACACTGTTCGCATGCTTGTCTTGCGAACAAGTCGAGCAAATGA 180
P T L S E G D T V A C L S C E Q V E Q M
CCACGCCACCACCCCGCTCGATGACAATATGCTGCTGGATGCGATGAAGAACGTGCACA 240
T T P P P R L D D N M L L D A M K N V H
GGTACGTGATCGATCCGGAGCTTCGTAAGCTCAAAGAGGGTGAGGGCATAGGAACAA 300
R Y V I D P E L R K L L K E G E G I G T
CCTCGACCCGTGCCGGCATTATTGCGGACATGAAAAAGCGTGAGCTTTTCGTACCAGCGC 360
T S T R A G I I A D M K K R E L F V P A
CGAAGGGCAAGAAAAAAGTATGATGACCAAGTGTCTCAGGCTAGAAACCTCATCGACGCTCTAC 420
P K G K K K L M T S A Q A R N L I D A L
CGATGAAGGTTAAAGATCCTGCGCAGGCGGGACACTTCAAACAATCTCTGGATCAGGTCG 480
P M K V K D P A Q A G H F K Q S L D Q V
CAAGTGGCAGCTCACTCATAACAGCCTTCATGGCGTATGCCGAACGCTTTGTTTCGTGACG 540
A S G T L T H T A F M A Y A E R F V R D
TGTTGAAGTGGCAAAGTAGCTGAAATGGCAGCCCTACCACCTGCACCAAGGGAGCAAA 600
V V E V A K V A E M A A L P P A P R E Q
TTCCTTGCCCAATTGCGCTGGCGAGCTACAGAACAAGGTAAACGTAAGTCTGCTTGCAGCC 660
I P C P N C A G E L Q N K G K R T A C S
AGTGCAAATTTGTTCTCTGGCACGAAGCTTTCCGCAAGCTACTTGGAGCAAAGGATATTG 720
Q C K F V L W H E A F G K L L G A K D I
AAGCCTTACTGAAAAAGGGCGAAACGCGATTACTTCAAACCTTAGTTCGGACGT 773
E A L L K K G E T R L L Q N L V G R

Das Hybridplasmid p173H45



p173H45

Physikalische Karte sequenzierten Bereichs des Hybridplasmides p173H45. *traO* und *traN* Transfergene.

Sequenz des Hybridplasmides p173H45

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Gegenstranges ist über der DNA-Sequenz dargestellt. *traN*, *traO*: Transfergene.

```

GCAGCTCGNTGTCGGTTTTCGGAGCTGCGTCCGGTTGAACTACGCCTGCTTCCGGGCTGGG      60
GAAGCAAATACATCAATGTTCGCCCGCTGTCTGTGTTGTCATGTTGGCATCCTTTCAGCGC      120
    * Y R T S N M I N P Q G L G P T Y G P
AGACTCAGTAACGAGTTCGAATTCATAATGTTGGGTTGGCCAAGTCTGGTGTGTAACCCG      180
    Y S G S M G E E D G S G T A S P S L R Y
GATAACTGCCGCTCATAACCCTCTTCGTCCCCGCTGCCTGTTGCGCTAGGGGACAAGCGAT      240
    Q P K P Q G A P Q S L T N L E D K Q N A
ATTGGGGCTTAGGCTGTCCAGCAGGCTGGCTCAAGGTGTTCAATTCATCTTTTGGTTTG      300
    Q I A N K D L A D S A M V P G I F Q I G
CCTGAATAGCATTATTTATCCAATGCATCACTGGCCATGACGGGACCGATAAATTGAATAC      360
    I T T G L A R V V Q K Q P M N A A D N A
CAATTGTTGTGCCTAATGCTCTGACTACTTGCTTCTGCGGCATATTAGCGGCGTCATTTG      420
    L V K G A Q Q G I G G V F T G A V A A G
CAAGAACTTGGCCGGCCTGCTGTCTATGCCACCCACAAATGTTCCAGCAACTGCTGCAC      480
    D P T E P Y T Q I V A G E S T I I N Q A
CGTCCGGAGTTTCTGGATAGTTTTGAATCACTGCGCCTTCGCTGGTGATAATATTCTGAG      540
    S G Q Q Y L Q G T K G I A V A L A P L I
CGCTCCCCTGCTGGTAGAGCTGGCCTGTCTTGCCATCGCAACTGCAAGTGCAGGGAGGA      600
    I R Q F Y R N N V D G S L A T R M S D P
TGATTGCTTGGAAAGTAACGGTTATTCACATCTCCCGAAAGTGCGGTTCTCATGCTGTCGG      660
    D V A K A N I K Y S H G K W E M Y S F T
GATCCACAGCCTTAGCATTAAATTTGTAGGAGTGGCCTTCCATTCCATGTAAGTGAACG      720
    M D V T E N I R K Y G M A F C V A G A F
TCATATCGACAGTTTCATTAATGCGTTTGTAAACCCATCGCAAAACAAACGGCTCCAGCAA      780
    P G A A I E A R V M S N E D T D I E T K
ATGGCCCAGCCGCGATCTCTGCACGAACCATTGAATTTTCGTTCGGTATCAATCTCAGTTT      840
    L I S P A L T F G P V I V V D P A K A T
TGAGAATGGAAGGTGCAAGCGTGAACCCAGGAACGATCACCACGTCCGGCGCTTTCGCTG      900
    A T G N G A P Q N S A G S V G A V A L S
TAGCTGTGCCATTGCCTGCCGGTTGATTAGACGCTCCTGAGACTCCCGCAACCGCCAAGG      960
    A P M I S Q T Y A E D E S V K G S S H P
ATGCTGGCATGATCGATTGCGTATAGGCTTCATCTTCACTCACTTTTCTGACGAGTGCG      1020
    
```

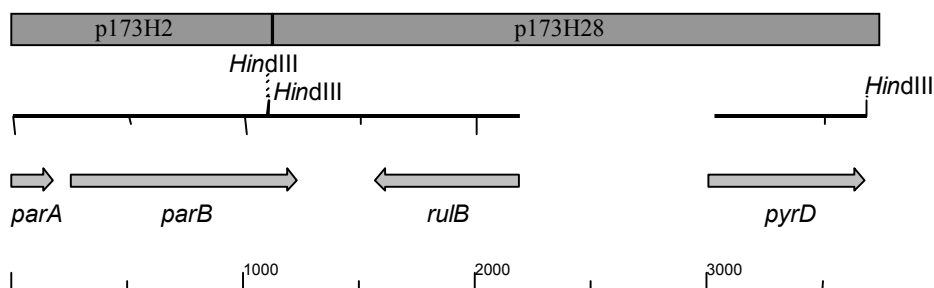
Anhang VI

```

K E V W A A M L G K V Q E A V Q K D Y E
GCTTTTCAACCCATGCTGCCATTAACCCCTTTACTTGTTCGGCAACCTGTTTATCGTATT 1080
K N R T V V Q Q Q Q Q P Q Q Y Y Y T V Q
CTTTATTCCGCGTTACTACCTGTTGTTGTTGCTGTGGCTGCTGGTAATAGTAGGTTACTTT 1140
Q P Q Q K P T S S I T E P K V S Q A S M
GTTGCGGCTGCTGCTTTGGAGTCGAACTAATTGTTTCGGGCTTAACTGACTGTGCAGACA 1200
V S M Y S G G S S E A Q Q A N T E N Y R
TCACCGACATGTAGGACCCACCGCTAGACTCAGCTTGTCTGCGGTTTGTCTCATTATATC 1260
N L V Q R Y Q E S E E T K T G K A N T T
GGTTAAGGACCTGACGATATTGTTCACTTTCTTCCGTTTTGGTCCCCTTCGCGTTTGTAG 1320
I G R I S S N T A N H N Q F W T Y A L Y
TGATACCGCAATGGAAGAGTTGGTTGCATTGTGGTTTTGGAACCAAGTGAAGCAAGAT 1380
G G G I V V A G I I A V I V K T Q R G I
AGCCGCCACCGATGACCACTGCCCTATGATGGCAACAATAACTTTGGTTTGGCGACCAA 1440
      ← traO
D A Q T S M          * N I D L Q L T V S Q G
TATCAGCTTGAGTACTCATATGGACCTCAGTTGATGTCAAGTTGAAGGGTAACTGACTGG 1500
M Q S L T V F P T A P L R Y V K T G D G
CCCATTTGAGACAGTGTACGAACGGAGTTGCTGGAAGCCGATAGACCTTGGTTCCATCT 1560
      ← traN
S A L S
CCTGAGGCTAAGCTT 1575

```

Die Hybridplasmide p173H2 und p173H28



Physikalische Karte der Hybridplasmide p173H2 und p173H28. Der nicht sequenzierte Bereich ist durch die Lücke in der oberen Linie angedeutet. *parA* und *parB*: Partitioning-Gene A und B, *pyrD*: Pyruvat Dehydrogenasegen, *rulB* UV-Resistenzgen.

Sequenz von pKi173H2

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz dargestellt. *parA*, *parB*: Partitioning-Gene.

```

parA →
GCTCAATGAGCTTTTCCCGGACCGCGTAACCGAGGAAAAAATATACGTCTCTGAGGAGTA 60
  L N E L F P D R V T E E K I Y V S E E
TGCCAAATCGTTGGATGAAGGCATTCCGTTGCTTCTTTGGAAAGGAGCGACCTCCAAGAG 120
Y A K S L D E G I P L L L W K G A T S K
TCTTGGTCCGGTACGCAGCGTTACCCGCGAGATCATCGACAAAATCCGCGAAGTCGCTTC 180
S L G P V R S V H R E I I D K I R E V A

```

Anhang VI

TGCCTGAGTTGTTGCTACTAGCAACACCAAGACCAAATGTTGCTACTAGCAACACTGATT	240
S A *	
<i>parB</i> →	
TTTGGAGATGAACATTATGAAATCGAACGATTACCTTGGAAAACCGAAGTCTGGTGTCGT	300
M K S N D Y P G K P K S G V	
TGGCCTTCGCAAGCCAGCCGAAATTCAGCGGGCACACCTTCGAGCGGAAGGGTAGGGC	360
V G L R K P A E I P A G T P S S A K G R	
CGCAATGCTTCAAAGCTGGATGCAAAGAGTCAGGAGCCGTTGATTGGTGAGTGGATTGG	420
A A M L Q K L D A K S Q E P L I G E W I	
CAAAGACCAAACCTGGAGGAGATCCAGGTATCCGGCGTCGATGTCTCCCCGTACCAGCC	480
G K D Q T L E E I Q V S G V D V S P Y Q	
CAGATTGGTGTGTTGACGCTGTTGCAATCTCGCAACTTCAGAGTCAATCCGTGAAATTGG	540
P R L V F D A V A I S Q L A E S I R E I	
CCTTGGGAAACCCATTCTTGTAAAGACCACTTCAGATGGCCGGTATGAGCTTGTAGGGGG	600
G L G K P I L V R P L P D G R Y E L V G	
TGAGAGACGCTGGAGAGCTGTCACCATCTTAGGATGGGACACCATAACGGCAGTTGTGAA	660
G E R R W R A V T I L G W D T I T A V V	
GCCTATGAGCGACGACATGGCTATGTTGCTCGCCCTCGCTGATAACGAACACGAACAGTT	720
K P M S D D M A M L L A L A D N E H E Q	
AACAGATTACGAACTTGGCCGTAGCTATGATCGGTACCTTCAAACCGGTAACGACAAGAG	780
L T D Y E L A R S Y D R Y L Q N G N D K	
CCAGAGCGCCATTGCTCGCCGCTTAGGTATTAATCGCTCCGTAGTAAGTCGGTGCATGGA	840
S Q S A I A R R L G I N R S V V S R C M	
CCTGATGAAGCTCCCGCCAGCGATCCGCCAGGTGCTGGATCAGCATCCAGGATTGATTAC	900
D L M K L P P A I R Q V L D Q H P G L I	
CGCGAATTACGCTAAGAAGTTTCGTTGAGCTTGC GGATCAGCACCCCTCACATCGTGAACG	960
T A N Y A K K F V E L A D Q H P H I V E	
ACAAGTCTGAGCATGGTTGATAAGGGTACAAAGCAGGAGCAGGCGCTGCGCCAGATTGC	1020
R Q V L S M V D K G T K Q E Q A L R Q I	
TTTGAAGATTTTCAGCATGTTCCAACCAGGGCGCACCCGGCATTTGTACCGCGTGCCGTCGC	1080
A L K I S A C S N Q G A P A F V P R A V	
CGGAATTGGCACAATAAGCTT	1101
A G I G T I S	

Sequenz p173H28

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz, die des Gegenstranges über der DNA-Sequenz dargestellt. *parB*: Partitioning-Gen, *ru1B*: UV-Resistenzgen, *pyrD*: Pyruvat-Dehydrogenasegen.

rev:

<i>parB</i> →	
AAGCTTTCAGGTCAGAACTGGAATTAAGTGCAGACAAAGGTGTGAATCCAAATTTGCTG	60
K L S G Q K L E L K C D K G V N P N L L	
ATGCAGCAATTTGAAGAATTCCTTAAGAATATTGACCGTAGCAAACCTGGCCGAGTGGAA	120
M Q Q F E E F L K N I D R S K L A A V E	
GCGGAGTAGGGCGCTAGTTCATGGAGGTTAACGGCCAATGGGTACTCAGCAGCGAATCTT	180
A E *	
ATTTGGTGATGAGGCGGATGCTCACGCTTATTGGAAAACCGGGAGTGGAAAACGTACGC	240
TGTGGACTTGGTGAAGTGGATCAGGGGAAAACGCAAGGTTCATCCACACCATGTATGTACG	300
TGCCAGAGACGAGGAGGGGGCAAGGGAGTGC GCCAGGGAGAACGATGTTACCGCTCTCC	360
GAAGCCCTTTTACTGCCTACGCCTCGCTGGACCTCGTGAACCTGGCTGTACACCGTAGAA	420
* R C S V K	
AAAAACGGCACGTTTCGATCCGAGCCGATTTTAAGCCCGTTCGCTATCTGCAACTGACCT	480

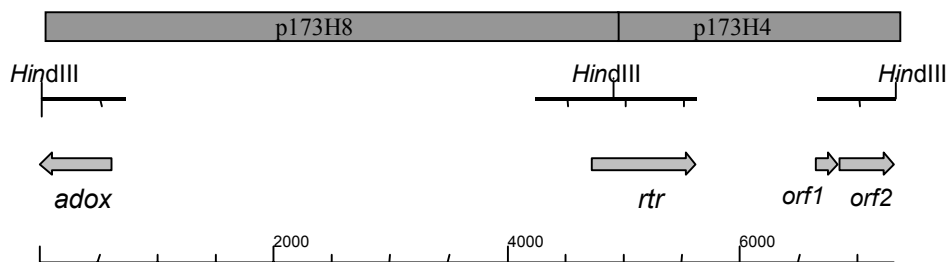
Anhang VI

W L Q N F D T M Y S P S L F D R R M G W
 TCCACAATTGATTGAAATCAGTCATATAACTCGGGCTGAGAAAATCCCTTCGCATTCCCC 540
 D P E S P V A A T R L C E R G W R R N V
 AGTCTGGTTTCGGAAGGAACGGCCGCGGTGCGAAGGCATTCTCGACCCCAGCGCCGGTTTA 600
 Q D M V Q M L A E S R A P Q N V S F L D
 CCTGGTCCATAACCTGCATTAAGGCTTCAGATCGGGCAGGTTGATTGACGGAAAAAAGGT 660
 D T F E G R C R L D I L L I E A K S Y R
 CATCTGTGAATTCGCTCGACACCGCAAGTCGATCAGCAGGATCTCAGCTTTGCTGTACC 720
 M G E R F I A D L G R L A A G T L V R T
 TCATTCCCTTCCCGAAAGATAGCATCTAAACCCCGAAGGGCAGCGCCGGTGAGTACTCGAG 780
 D D T P Y P L T C T I G Q A Y K P G D G
 TATCATCTGTGGGGTAGGGGAGGGTGCAAGTGATCCCTTGC GCGTACTTTGGGCCGTAC 840
 F F S T Q I S V R L V A C L S N Q A R L
 CGAAGAACGAGGTCTGTATGGAAACCCTCAAACGGCGCACAGTGAGTTTTGTGCCCTGA 900
 K G A A R H V Y S A V A E R L G L L T T
 GTTTTCCAGCTGCTCGATGCACGTAGCTGGCAACAGCCTCCCGTAGGCCTAGCAGTGTGG 960
 V R E G F S R S C C I S Q K P L G V P D
 TTACGCGCTCACCGAAAGATCTGCTGCAGCAGATCGATTGCTTCCGGTAATCCGACCGGAT 1020
 L D L C Q E G N L E R V T R E L V V S F
 CCAGGTCAAGGCATTGCTCACCATTCAACTCCCTGACTGTACGCTCTAGAACAACAGAAA 1080
 K ← *rulB*
 ACTTTT 1086

uni:

pyrD →
 CGACCGAAGGAGGGGAGAGGGGGAGAGAGTACCGTTTACGTACGTACGTACGCATGTGTA 60
 T E G G E R G R E Y R L R T Y V R M C
 TACTGTGCATCTCAGCAGACAAAGGAAGACACATGGCAAAGTTTGACGGATCAATCGGCG 120
 I L C I S A D K G R H M A K F D G S I G
 ACAATTTACCAGACCTCATGGCTGACTCACCTTTAGGAGTAGGCTTCGCGATAACTGCTG 180
 D N L P D L M A D S P L G V G F A I T A
 CCAAAGCGCTTGAAAAAGAATAGCGACGGTAGCGCATACTTTACCAATACTGCATAACG 240
 A K A L E K R I A T V A H T L P I L H N
 CTGCTTCGAATCGTATTAGGTACGTTTTACATTTTCAGTGAAAATACTCAGATAACGCACT 300
 A A S N R I R Y V L H F S E N T Q I T H
 TTGAGGACCTTGCATCGCAGTCGTGGGCAAACGTTATCAGCGCTGGTCATGAGAATGTAA 360
 F E D L A S Q S W A N V I S A G H E N V
 CGACGATCACGAACCTTGATAACCCCGCAGGATTACAAAGCTATATATATATCCTCCGTGTAG 420
 T T I T N L D T P Q D Y K A I Y I L R V
 GACTTGAGAAGATGAGCCATTTTTAGAAAGAGTGTGCTTTTTTCTGTGAGCAGCCTGAGC 480
 G L A E D E P F L E E C A F F C E Q P E
 TAAATCTCAGAGCTGGTTGCTTCGAATATGCATTACGTTACGCGATCAAAGGCGGAGACT 540
 L N L R A G C F E Y A L R Y A I K G G D
 TTGGTAAGGTCTTAATTGGTTTTGTCCCTTGCGGAAATACCTTTGTATGAAAATGATCAA 600
 F G K V L I G L S P C G N T F V *
 TATTGAACTTTAAAGTTTTTCATGGATGCAGCGGAAGACGCGCACACCAGTATTGACC 660
 AGCCCAAGCTT 671

Die Hybridplasmide p173H8 und p173H4



Physikalische Karte der Hybridplasmide p173H8 und p173H4. Die sequenzierten Bereiche sind durch Linien in der oberen Reihe der Zeichnung dargestellt. *adox*: Anthranilat Dioxygenase Gen, *rtr*: Gen für eine reverse Transkriptase, *orf1* hyp. Gen *P. syringae*, *orf2* hyp. Gen *D. radiodurans*.

Sequenz p173H8

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz, die des Gegenstranges über der DNA-Sequenz dargestellt. *adox*: Gen für eine put. Anthranilat-Dioxygenase, *rtr*: Gen für eine hyp. reverse Transkriptase.

uni:

```

* N G N F T Y T S V G K L V E L G D P
AAGCTTCAGTTGCCATTGAAAGTATAGGTTGACACTCCTTTAAGCACTTCCAATCCGTCA      60
  S Q E V L I D I F A K S D A L Y D E I A
GGTGACTGCTCCACCAAAATATCTATGAATGCCTTGGAAATCCGCGAGGTAATCCTCTATC    120
  E A E D N L T V F I F G K Y N E V K L R
GCCTCTGCTTCATCATTCAAGGTGACAAATATAAATCCCTTGTAGTTTTCGACTTTTAAT    180
  R L G L K T K D F G E P Y G G N E E N M
CGTCTTAGTCCTAATTTTGTCTTATCAAAACCCTCGGGGTAGCCGCCATTTTCTCATTC     240
  T A I L S G N D D F A W G H F P C V F N
ATCGTTGCTATTAAGGAACCGTTGTCGTCAAATGCCAGCCGTGGAAAGGGCATACAAAG    300
  A R T G K S V R C L T A G R H T C V N V
TTAGCACGTGTTCCCTTTTGAACGCGGCAGAGTGTTGCCCTCGGTGGGTACAAACGTTT    360
  F A N I E G K K N R N I I V P V R G V W
ACAAAGGCATTAATTTCTCCCTTTTGTTCGATTGATAATCACGGGCACACGCCCGACC     420
  R T V F S R P K S I E S E H A A Y V W I
CAACGGGTTACAAAGGAGCGAGGTTTGGATATCTCACTTTCGTGGGCTGCGTACACCCAT    480
  K E W I K S F E L E Y L E P N T F I E R
ATCTTTTCCCAAATCTTGAGAATTCAAGTTCATATAGCTCCGGATTAGTAAATATTTTCG    540
  S V R R P G S E T H E L F P L N N E L T
CGACTAACCCGCGGAGGCCAGATTCAAGTGTGCTCTAAAAATGGAAGGTTATTTTCTAAC    600
  T M ← adox
GTTGTCAATTCTATTTACCCCACTAACAATTAGTTGCAGATTGCTCGATAACCAAAATTGAA    660
ATACTGCAAGAGAGTAAATCTATGAATTACTCGAAATTTACACCAACTCA                710

```

Anhang VI

rev:

```
CGAGGAGCAATCTCCGTTCCGCCGTTGGAATATGATCAAATCATCAAATCGTGCAGAGGCA      60
ATTGTTTATTTGATCAATTCAGTGGGCGACGCAATCCTGCCACACGCAGCTATAGGGCGAA      120
TCATTTTGGCTCTGTTCCGCGTTTGTTCGTGGGTTACCCACCGCATGCCGAATCCACGCCTC      180
TGGGCAGATGTCTTGTTCGGCACGCACCAGCAATCCGCCCGCAGACATATTCGCACGCA      240
GCAGTTCATCAGCCGGAACCCGAATGACAATTTGATATTAATAAAACCGCTATTCAGCCCG      300
ACAACGGCTGCACCGCCAACCCGGGTAATTTGGCAATATCGGGGTGGCGACACCTGAAGC      360
GGCGCATCCGCTGCTTCAAGGTAAGCGGCTGGGGAAGTCACCTTCCGAACTCCAGCATTA      420
AGGGCGATGGTGTCCGCGTATTTTAAGCGGACGCGATCGCCCTTATCGTAAGGGGGAAAC      480
      rtr →
GGTGTACTGTCGTTTCAATGGGGCTTGTCCATGCACCTTCCGGCACGTCGTGGGACGGCATC      540
      M G L V H A P S G T S W D G I
GATTGGATCGCCGTGCAACGTCGTGTCAAAGGGCTGCAAGCGCGTATTGTGAAGGCTGTA      600
      D W I A V Q R R V K G L Q A R I V K A V
NCAAGACGGCAGGCATACAAGGCGNGAGCCTTGCGATGGCTGCTGNTC                    648
      X R R Q A Y K A X A L R W L L X
```

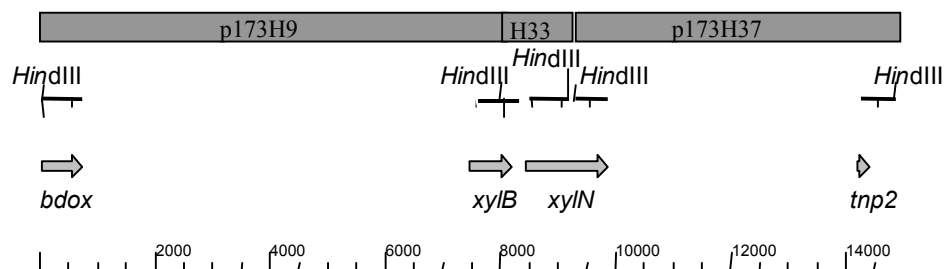
Sequenz p173H4

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.
rtr: Gen für eine hyp. reverse Transkriptase.

uni:

```
      rtr →
AAGCTTTAGCCGTGAAACGTGTGTCTGAAAACAAAGGAAAAAATACTCCCGGTGTGGACA      60
      A L A V K R V S E N K G K N T P G V D
AGGTCACTTGAATACGCCTAGGGCCAAGATCGCTGCGATAGAGTCGTTGAAGCGGCGAG      120
      K V T W N T P R A K I A A I E S L K R R
GCTACTCGCCGCTTCCGCTTCCGGAGAGTACTCATTCCGAAGAAAAACGGTAAGACTAGAC      180
      G Y S P L P L R R V L I P K K N G K T R
CTCTCGGAATTTCCCGCATGAAATGCCGGGCCATGCAGGCGCTTCATTTGCTGGCTCTGG      240
      P L G I P A M K C R A M Q A L H L L A L
AACCGATAGCGGAGACCACCGCCGACCCGAACTCTTATGGATTCAGGCCGGAACGCTCAA      300
      E P I A E T T A D P N S Y G F R P E R S
CTGCGGATGCAGCCGCGCAGTGCTTTGGTGTGCTGTACGAAGAGCAAACGCAGAGTGGG      360
      T A D A A A Q C F G V L S R R A N A E W
TGTTAGAGGGCGACATTCAAGGCTGTTTCGACAATATCAGCCATGACTGGTTGATCGCCA      420
      V L E G D I Q G C F D N I S H D W L I A
ACATCCCCATGGATAAAGCGATTTTGCAGAAATGGCTCCAAGCCGGTTATGTCTACCAAA      480
      N I P M D K A I L Q K W L Q A G Y V Y Q
ATCAGCTTTTCCCCAGCCACGCAGGAACCCCGCAGGGAGGCATCATATCCCCGGTGTGG      540
      N Q L F P S H A G T P Q G G I I S P V L
CCAACATGACGTTGGATGGGTTGGAAGCGATGCTGGCAAAGAGGTTTCCCAACGCAAAGT      600
      A N M T L D G L E A M L A K R F P N A K
GGACAGNCCGAAAAATGCAGATGGTGC GTTATGCAGACGACTTCATCATCACTGGCTGTT      660
      W T X R K M Q M V R Y A D D F I I T G C
CGAAAGAGTGGCTGGAAAATGAAGTCAGGCCCGCCGTGGTTGAATTTCTGGCAGAGCGTG      720
      S K E W L E N E V R P A V V E F L A E R
GAC                                                                           723
G
```

Die Hybridplasmide p173H9, p173H33 und p173H37



Physikalische Karte der Hybridplasmide p173H9, p173H33 und p173H3. Die nicht sequenzierten Bereiche der Inserts sind durch Lücken in der oberen Reihe angedeutet. *bdox* Benzoat-Dioxygenase, *tnp2* Transposase, *xylB* und *xylN* Gene des Xylolkatabolismus.

Sequenz von p173H9

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz dargestellt. *bdox*: Gen für eine Benzoat-Dioxygenase, *xylB*: Gen des Xylolabbaus.

uni:

bdox →

```

ATGGCTACCATGTTCGCCGCCGTTTCATGGGAACCTACGTTCAAACGCTGCAAAAATAGAGCGA      60
  G Y H V A A V H G N Y V Q T L Q N R A
GCTCCAATACTCATGGGCAAAAGACCAAGGCCATGAACGTAGGCGACCTCCCGAATTCCC      120
  S S N T H G Q K T K A M N V G D L P N S
GAGGCGGCTACTACGACTTGGGTAATGGCCACACGATAATCTGGTTCGGACTGGACAAATC      180
  R G G Y Y D L G N G H T I I W S D W T N
CTGAGGACCGACCTCTTTTTTCCCGTAAAAGATGAACTCAAGGAGCGCATCGGTGAGGCCA      240
  P E D R P L F P V K D E L K E R I G E A
AGGCGGAATGGGCTGTAGGTAGAATGAGGAATCTGCTTATTTACCCCAACGTGTTTTTTTA      300
  K A E W A V G R M R N L L I Y P N V F F
TGGATCAAACCAGCAGCCAGATCAGAGTATTCCGACCTGTTCGCGGTGATAAAACAGAGG      360
  M D Q T S S Q I R V F R P V A V D K T E
TAACGATCTATTGCTTTGCGCCTAAAGGGGAAGCGCCTGCGGCTCGGGCGCATCGAATTA      420
  V T I Y C F A P K G E A P A A R A H R I
GACAATATGAAGACTTTTTTAATGCAAGTGAATGGCAACCCCGGATGACCTGACTGAGT      480
  R Q Y E D F F N A S G M A T P D D L T E
TTTCTGAAGTACAGAAAGGATGCCGCGCACATACAATTGCTCACTGGAGCGATATGTCGA      540
  F S E V Q K G C R A H T I A H W S D M S
GGGGTATGACACAAGAAATTAAAGGCCCTGACGATCTCGCAAAGGATTTGAGCATTAGTC      600
  R G M T Q E I K G P D D L A K D L S I S
CAGCAAGCAGCGCGCAAAAGTTGATGATGAAGGCATTTTCTGCGCGCAGCATATCCGCT      660
  P A S S G A K V D D E G I F L A Q H I R
GGCTTAATCTAATGGGGCTTAAAGGAGGAGACTA      694
  W L N L M G L K G G D
    
```

rev:

xylB →

```

GTAGGAGCTAGTTTTTTTCGGTCAGTCTTCCTTTGCTACCTATGCGCTGGCTTATGAACGC      60
  V G A S F F G Q S S F A T Y A L A Y E R
    
```

Anhang VI

AACGCCGTGAAGGTCACAAAGGACGTCCCGCTTGAACCTCCTTGGGCCTCTTGGTTGTGGT 120
N A V K V T K D V P L E L L G P L G C G
ATTCAAACCTGGTGCAGGGTCCGTCCTTAACGCGCTTAACCCTTCGGCAGGTTCCCTCTATC 180
I Q T G A G S V L N A L N P S A G S S I
GCGATCTTTGGTGCCGGGGCCGTAGGCCTTTTCGGCAGTTATGGCTGCCGTTGTGGCGGGG 240
A I F G A G A V G L S A V M A A V V A G
TGTACGAAAATCGTCGTTGTGCGATGTCAAAGAGAATCGCCTTAAATTGGCCGATGAGCTT 300
C T K I V V V D V K E N R L K L A D E L
GGGGCGACGCATGTGATTAATGCAGCAAGTTCTGATCCAGTTGAGAAGATTAAGGAAATT 360
G A T H V I N A A S S D P V E K I K E I
TGTGCTGGCGGCGTTCCGATATGTGCTCGAACTAGCGGTTTGCCTTCGGTTCTTCAGCAG 420
C A G G V P Y V L E T S G L P S V L Q Q
GCGATCCTCAGCTCCGCCATAGGTGGTGAGATAGGTATTGTAGGTGCACCACCGATGGGT 480
A I L S S A I G G E I G I V G A P P M G
GCTACAATCCCCTTGATATTAATTTTTTTACTGTTTAATCGTAAGCTT 528
A T I P V D I N F L L F N R K L

Sequenz p173H33

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.
xyIB, *xyIN*: Gene des Xylolabbaus.

rev:

xyIB →
GCAGCTCGAGTATGTTGnGGGGCATCTATTTCCGATATATTTATTCCAAGATTGGTGGAG 60
A A R V C X G A S I S D I F I P R L V E
CTATATCGTCAAGGGAAGTTTCCATTTGATAAATCGTTAAAGTTCTATTCCTTTGATGAA 120
L Y R Q G K F P F D K S L K F Y S F D E
ATTAATCAGGCAGCGGAGGACTCGGAAAATGGAATAACCCCTTAAGCCAGTGCTTCGAATG 180
I N Q A A E D S E N G I T L K P V L R M
TCCTAAAATTAGTATTATTAATCCTCATTGGCGCGCCGTTCTCATATACGGCGCAGTTA 240
S *
AATTCCAGAGCGATATTTTATCCTCTCCCCCTTCTTTCTAGGGAAGGGCAGTATAATTAT 300
AATAGATGGTGAGTGCTAAGATGATGAG 328

uni:

xyIN →
TCAGATGCTACAAATGAAGTTTTACTAGGTTTTCGACCTTATTACAACAGATATAAGTGCC 60
S D A T N E V L L G F D L I T T D I S A
TCGAATCTTGCTACAGGCGAAACAGTATCATCAAGTACGCACTCTCAGAATAGAGGGCCT 120
S N L A T G E T V S S S T H S Q N R G P
TATGTTGCCCTCAGCTAGCGTTTACCCATAAGATTTCAAACCTGGACCATTGGCGCAGGC 180
Y V A P Q L A F T H K I S N W T I G A G
ATGTTTGCACAAGCCGGCGTAGGTGTTGAATATGGGAAGTCTAGCTTTTTTGTACGCGGT 240
M F A Q A G V G V E Y G K S S F L S R G
GACGTTGGTGGGAATGGTTATGCTACCGGCGCTGACACGGGGCTTGAGAATTCGAGTCGT 300
D V G G N G Y A T G A D T G L E N S S R
TTGTTTATTCTCGACGTGCCTTTTGGCGTAAGTTTTCAAGTTAATGATCGTCTTGCCGTC 360
L F I L D V P F A V S F Q V N D R L A V
GGCGGATCGCTTGATGCAAAGTGGACCGGTTTGAATCTTGATTATTTGCTTGGGATGAAC 420
G G S L D A K W T G L N L D Y L L G M N

Anhang VI

```
CAGTTGGGTAGTCTGGCCGAAAATGGGCGAGCGTCTGGTTCCTTACTGGGATTGATAGGA 480
  Q L G S L A E N G R A S G S L L G L I G
ACTCTGCCTGATCCGCAGGGCGTACATCTAAGCGTTAGCAAAAATAAATCGATTGCGAGT 540
  T L P D P Q G V H L S V S K N K S I A S
GGCGCAGATGGTTGGGGGATCTCAGGTAAGTTAGGTTTGTCTGTACAAGGTA ACTCCCATA 600
  G A D G W G I S G K L G L L Y K V T P I
ACAAATTTTGGTGCTTCCTATATGTTCAAAAAGTCATATGAATGATTTAAAGGGGCGAGGG 660
  T N F G A S Y M F K S H M N D L K G R G
ACTGTTACTGCGGTGGATGGTATCATTGGGAATGTGCCGATCGAAGGGGACGTTAGTTTT 720
  T V T A V D G I I G N V P I E G D V S F
TTAAATTTTAATTCCTGCCAAGCTT 746
  L N F N S L P S
```

Sequenz p173H37

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.
xyIN: Gen des Xylolabbaus, *tmp2*: Transposasegen.

rev:

```
xyIN →
TGTGTCTCGCGTATCTGGAAGGATGCCTTGAAAGATATTAAGGTGGGATTTTCTAGTGAC 60
  C V S R I W K D A L K D I K V G F S S D
GTCGGAGGTGTTGATCTTAAATTACCTCAAAACGCTAAAGATCAAACGATAGTGGCGATC 120
  V G G V D L K L P Q N A K D Q T I V A I
GGAACTTCGTATGCCGCTACCCAGAATTTAACTTTGCGAGCAGGATACCGTCAGGCTACT 180
  G T S Y A A T Q N L T L R A G Y R Q A T
CAGCCATTCAACGACGAGGGATTGCTTGCCCTAATACCAGCAGTTCTACAGAAGCATGCC 240
  Q P F N D E G L L A L I P A V L Q K H A
TCCTTAGGTTTAAAGCTATAATTTCTCTCAATCGAGCAGATTTGATGCTGCATATTCGCAC 300
  S L G L S Y N F S Q S S R F D A A Y S H
GCCTTCGAGAGCAGTATGACCAATAGATCGGCTTACAACACTTCGTCACCTGTTAAGTCG 360
  A F E S S M T N R S A Y N T S S P V K S
TCCATGGCACAAGATAATTTTCGTCATTGGCTATAATTATTTCATTCTGATAGTAGAATTGA 420
  S M A Q D N F V I G Y N Y S F *
AATCGCCCATAGTGAAGA ACTTGACGTGCCGGTTAGGGAAACGCTGATATATTCACATT 480
ATGCTTGGTTCGTCACCGGAAACCGTGGTTTCCAGGCCTGCTGTCCGGCTATAGCATGA 540
ATACTTCAGCGTTTTTCTAGTTATGATGTAATTCGCTATCTTTGTTGGCTTGATCTCCG 600
TTACTAAAAGCGGGTTGGTTGAAGTAGCG 629
```

uni:

```
tmp2 →
CAACCTGGTGACGGCCGCCATCGTGCGGTGGAACACGGTGTACCTGGAGCGCGCCACCCA 60
  N L V T A A I V R W N T V Y L E R A T
GGCGCTGGGCAAAACTGGCAAGCCGGTGGACGGGAACTGCTGCAATACCTGTGCGCGCT 120
  Q A L G K T G K P V D G E L L Q Y L S P
GGGCTGGGAACACATCAACCTGACCGGCGATTACGTCTGGCGGCAGAGTCGCAGGCTGGA 180
  L G W E H I N L T G D Y V W R Q S R R L
GGATGGGAAGTTCAGACCGCTACGGCTGCCCCGAAAATCTTAGCGTACGATTTTTTCCGA 240
  E D G K F R P L R L P G K S *
ATTCTGCGGGCTCCCCTGGTACGGCATAACCCAAGTTAAAGCACGGCACACCGTCGATTG 300
GTTTCATGGTGGACGAAAAGCGCTATCGCCTTGACTCGACCATGGTCGATCCGAGCATAGG 360
TGTAGCGGATAACGCCATTTCGGCTGATCGAGGATTACCTTGAGCCCTGGAGTTAGATCGC 420
```

Anhang VI

```
AGGGATTGGTTGGCATAACCCCGACGCACTTCTCGTTGAAGGCTGATCAGTGCCTCCATTG 480
GTTCCGCAATTCGCATGTGATTTTTCCCCTGCCTCAGTACCTGGTGGTCAGATGCAGCCG 540
CGTCTATCGCGCCACTGCGTTCAATTCCAAGCGGGCAAGCCATTTTTTGGCGACTTCACA 600
AAGCTCGGCATGGGTTCATGTGAATTTCCATTCAAAGCTCACGTTACGACGCCGCGTAGC 660
ACATCAAGCTT 671
```

Der sequenzierte Bereich des Hybridplasmides p173H7

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.
korA: Gen für einen mögl. Transkriptionsrepressor.

```
korA →
CGTGGTAGTCCAGAAAGCGCTGCAAATCGTGCAGCAACGCGTGTCTCGTAGACGGTATA 60
  R G S P E S A A N R A A T R V L V D G I
TCCCAAGCCGATGCAGTACGGGAGACAGGTGCAACACGTTTCGACAGTGAAGTATGCGGTA 120
  S Q A D A V R E T G A T R S T V S D A V
AGCCGGTACGGCGACGCGTACCAAGAAGTTTGCGCAGTTTTTATAGGCGAAAACAAATAA 180
  S R Y G D A Y Q E V C A V F I G E N K *
TGATGCTTGAGTGTACGCCTCTAGAGGCGTACTATTATCTCATTGAAACGAACCAATGAG 240
GGCATCAAATGCAGTGTACCAAGTCTCAATCAATCTGAATGAAGGCGGTACCAAGCCAG 300
TGGTTTTTGTGGCTGATAACGCAGAGCACGCCAAGATCCGCGCTTTGTTTGTGTACTTCG 360
AAGAAGGGGAGATTGGGGATGCTGAGCTGATGGATGAGGATAAGTGGATCAGTTTCAAGA 420
ACTCAAATCACAACGATCATTATTGACGCCGCCCGGTTCCGCCGCTGCTTCACCAGC 480
TCAAGGACACGGCCATGATTCTCAAGAACGATCGCAACACAGATGCAGAGGATG 534
```

Der sequenzierte Bereich des Hybridplasmides p173H13

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.
atp: Gen für ein put. ATP-Bindeprotein.

```
atp →
AAGCTTCTCTCTCGGGCATAACGTTACGCCACGATGCACACGGAGTCGGTAGCAGAAAC 60
  S F S L G H T C Y A T M H T E S V A E
CATCAACCGGGCCATTCAAACCTTATCCACCCGAACAACAGTCCGGGATTGCTTCGCGGCT 120
  T I N R A I Q T Y P P E Q Q S G I A S R
CGCCGGTGCCTTGCAGGTTATCATTGTGCAAAGGCTCCTTAAAACGACCGATGGCAAGCG 180
  L A G A L R V I I V Q R L L K T T D G K
CACGGCGATTTCGTGAGTACCTGGTCTTTGATCGCGAGTTCAGGTCGGAACGCAAAGTCT 240
  R T A I R E Y L V F D R E F R S E L Q S
TCCGTATAACGAATGGGCAATGTTGATTTCGTACCAAGCTTTCTCCGTGACCTACAACCG 300
  L P Y N E W A M L I R T K L S P *
TATGTAGGTTTCGACCCGGTGGCAAAGAAGGCCTTGTACTTCGATATCACCACCGGTGGG 360
GTGATGGTGGATTTTCGACCAGATCGATAGCTGGGAGCTTAGCCCCGACAAAAGCCCTCAT 420
CCGCTGCTCAGACTTGTACCCGCCTTCCAGATCTGAGGGAGATTGGTGTGAGAATCAAT 480
CGTCCAGGGGCTTGGAAGTCCGATATGCAAACATTGTTCCGGTAAACCGTACGACCGATC 540
TACTCAAAGGAATGGAGCTTTCCATGAAGTTTAAACTGACTGCGCTGTCTCTCGCAGCTT 600
GCTGTCTCATGGTCCGATGCGACAAACCAACACCGACACGACGCGCCTGCTGATTCTCT 660
CGGGGCCATCTTCATTGCTCAACAGCCCTAAAGTCAGCAGTACGCCGCGAGTCTAA 715
```

Der sequenzierte Bereich des Hybridplasmides p173H16

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz, die des Gegenstranges über der DNA-Sequenz dargestellt. *lak*: Gen für eine put. Laktat-Dehydrogenase, *orf3*: Gen für einen hyp. Transkriptionsregulator.

uni:

```

AAGCTTGTAGGCACAGCTTTTTCGCTGGTGTTCGGAACCCGACAGCGCCGAGCTGCTGCCGT      60
ATGTGAGCGAGTCGAAGTTAATCTCCGACGGCGACATGGCGAAAATCGCGCAGATGATCG      120
AGGTCAGGAACGTCATCCACTTGGAGAAGTACATCTCATTGTATTTCGACAACGAAGCGCT      180
CGAAGGAGGCCATTGAGTCCTCATTCTTCGACAACAAGACCGGCAACGACCAAGCGGTGT      240
TCACGCCCTTTACGGCGTTGTCTCACTAGCGCTTGAAAAGCGTAGATGTCTTGGGCGGTGT      300
AGTTATCGGACATGTGAAGCATCCCCTTCGGGATAGCGTTAGAAAAGCCTCCAGCACGAC      360
                                     * V E P L V K G
ATGTCTGTGTTGAAGACGTGGATTTACCTTGGGCATCAAACCTTCGGGAAGGACTTTTCC      420
P N M L G L P D L A Q K I L R M V G V A
GGGGTTCATCAGTCCTAAGGGATCCAGCGCTTGCTTGATCAAACGCATTACTCCAACGGC      480
A G H E L A M Y K I K G L G I G H E G T
TGCACCATGTTCCAGCGCCATGTACTTTATTTTCCCAAACCAATTCCATGCTCACCAGT      540
A L N E R V V E R A L A L D G T C E A E
GCATGTGCCGTCCAGCGCAAGAGCGCGCTCGACCACACGCTCATTGAGTGCCTCGGCCCTC      600
A M E A E N D P D V V L G L H F ← lak
AGCCATTTCTGCTTCGTTATCCGGATCGACCACCAGTCCCAAGTGAAA                      649
    
```

rev:

```

orf3 →
AAGCTTACAGTGGGTCGATTCGCCAGCGACTGGGATTCAACGCCAGTTACTGGAGCGTGA      60
  S L Q W V D S P A T G I Q R Q L L E R
TGGCGACGAAGTGGCGCGGGCCACCTCGTTTCGTGCGATATGCGTCAGGATCGAGGTTTCGA      120
D G D E V A R A T S F V R Y A S G S R F
GCGCCATGTTTCATCACCTCGGCGAAGAAATCCTCGTTCTTGATGGTATGTTACCGATAA      180
E R H V H H L G E E I L V L D G M F T D
GTCAGGGACCTTCGGGCCTGGGACTTACATCAAGAACCCACCAGTTCTTCGCATGCACC      240
K S G T F G P G T Y I K N P P G S S H A
AAGCTCCGCGACGGGTTGCACGTTGTTTCGTCAAGCTGCGGCATCTTGATCTAGCCGACAG      300
P S S A T G C T L F V K L R H L D L A D
CCAACGCACGGTGGTCGACACCCGTAACGGACCCTGGTTTCCAGGCCTCGTGCCGGGTCT      360
S Q R T V V D T R N G P W F P G L V P G
GTCGGTGATGCCACTTTCTGAGTTCGACACCCAACATACGGCTTTGGTGCGCTGGGCTCC      420
L S V M P L S E F D T Q H T A L V R W A
GGGGACACGATTCAATTCGCATCGTCACTACGGCGGTGAAGAAATCTATGTGTTGGAAG      480
P G T R F N S H R H Y G G E E I Y V L E
CGTCTTTGAGGATGAGTTCGGAAGCTACCCTGCCGGCACATGGATGCGCAGTCCGCATTT      540
G V F E D E F G S Y P A G T W M R S P H
GAGTGCTCACCGCCCCTTCAGCAATGAAGGCTGTACCATCCTGGTCAAGACAGGCCATCT      600
L S A H R P F S N E G C T I L V K T G H
GCCAGTCGCCGAATCAAATGAGGCACTTGCATGAAGCATTCTCCGAAATCTCGCCGACC      660
L P V A E S N E A L A *
GCCGAGCGCG                                                                670
    
```

Der sequenzierte Bereich des Hybridplasmides p173H19

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.
mpl: Gen für eine put. Transposase.

mpl →

ATGCTCGGCTGGTTTTACGCTCAAGCTATGGCCAATAGCCTCAATGTGCGCAAAGCCGCTC	60
A R L V Y A Q A M A N S L N V R K A A	
AGGAGGCCGTCGTGCATCGCACCACCCCCTCCAGCGAAAAACGACACCGAGCTGTCGAAT	120
Q E A V V H R T T P S S E K R H R A V E	
ATGGTCTGAAGTAGACGAGACCTACTTCCTAGAGTCATTCAAGGGCAAGCGCGAGCTTCCA	180
Y G R S R R D L L P R V I Q G Q A R A S	
CGCCCAGCCCCGACATCGTGGCAGAAAAGCCAGAAGCGTGGTCTGTCAGCCAAGCAAATAC	240
T P S P T S W Q K S Q K R G L S A K Q I	
CGGTATTCCTCGCCCAGGATCGGCAAGGCAAGCATTACGATGCTGTCCTGCCCAAGATGG	300
P V F L A Q D R Q G K H Y D A V L P K M	
ATAAACAGACGCTCGAGAGCCTGTTCTCGCAGCTGTGGCCCCCTAGTCGGTGTTATACAC	360
D K Q T L E S L F S Q L W P P S R C Y T	
CGATGGTGCAGGCGTCTATCGCGTCGTCGCCAAGGGCGAAGCCATCGCAAGAATCGCTGA	420
P M V Q A S I A S S P R A K P S Q E S L	
CTTTGGCGTCGGGCACGATGGCCAAACATTGCGTCTTTTCATATCAAGCATGTGAATACCT	480
T L A S G T M A K H C V F H I K H V N T	
ACGACTCGCGCTTGAAGCGTAAGCGTATAGCCAACACACGTTACATGACTGACGGTGTG	540
Y D S R L K R K R I A N T R S H D *	
TGGTTCAGTCCGTCGACTGCATCCAGTATTTGCCGTACCCGATCTGTAACGATACGTTCC	660
C	601

Sequenzanalyse der Plasmide pBI113, pKI239 und pKI202

Sequenz (bp)	Protein	AS des Genprodukts	Übereinstimmungen (Identität/Ähnlichkeit in %) (Acc.-Nummer)
pBI113			
E14.3 uni (505)	ORF1	167	hyp. Protein <i>Xylella fastidiosa</i> (31/52) (A82800)0
E14.3 rev (459)	ORF2	86	hyp Protein <i>Caulobacter</i> sp. (32/36) (AE005943)
E14.5 uni (509)			nicht signifikant
E14.5 rev (458)			nicht signifikant
E27 uni (534)			nicht signifikant
E27 rev (518)			nicht signifikant
E2 uni (503)	ORF7	158	60 kda Protein Bakteriophage MB78 (24/38) (BMB19202)
E30 uni (512)			nicht signifikant
E30 rev (458)	ORF52 ORF53	60 89	Orf52 Phage D3 (69/84) (AF16521452) Orf53 Phage D3 (38/56) (AF16521453)
E1 uni (541)	ORF8	180	ChrA <i>Bacillus</i> sp. (24/43) (F83721)
E1 rev (504)			nicht signifikant
E17g (560)			nicht signifikant
E3 uni (533)			nicht signifikant
E3 rev (506)	ORF4	132	hyp. Phagen assoziiertes Protein <i>Streptococcus</i> sp. (33/57) (AE00652013)
pKI239			
E21.10 uni (510)			nicht signifikant
E21.10 rev (459)			nicht signifikant
E21.8 uni (510)	ORF1	56	hyp. Protein <i>Xylella fastidiosa</i> (39/56) (B82661)
E21.8 rev (459)	ORF2	134	hyp. Protein <i>Xylella fastidiosa</i> (32/44) (E82661)
E25.1 uni (507)	ORF11	116	hyp. Protein <i>Xylella fastidiosa</i> (33/48) (A82665)
E25.1 rev (459)	ORF4	153	kons. hyp. Protein <i>Xylella fastidiosa</i> (34/52) (A82664)
E4 uni (503)	Pha	115	PHA Depolymerase <i>Pseudomonas resinovorans</i> (68/76) (AF1293963)
E4 rev (498)	Res	153	Resolvase pM3 (65/80) (AF0789244)
E17 uni (504)	ORF5	38	hyp. Protein <i>Xylella fastidiosa</i> (44/64) (F82651)
E17 rev (461)	ORF6	151	hyp. Protein <i>Xylella fastidiosa</i> (31/48) (C82651)
E34 rev (470)			nicht signifikant
E18 rev (509)	ORF8	169	Acyl-CoA-Dehydrogenase <i>Streptomyces coelicolor</i> (32/48) (SCBAC1A630)
E24 uni (501)	ORF9	167	Phagen verwandtes Protein <i>Xylella fastidiosa</i> (39/56) (A82650)
E24 rev (491)			nicht signifikant

Sequenz (bp)	Protein	AS des Genproduktes	Übereinstimmungen (Identität/Ähnlichkeit in %) (Acc.-Nummer)
pKI202			
H5 uni (515)	ORF1	145	hyp. Protein R391 (36/54) (AAK07488)
H5 rev (538)			nicht signifikant
H3 uni (512)			nicht signifikant
H3 rev (551)			nicht signifikant
H15 uni (546)			nicht signifikant
H15 rev (548)	ORF4		DNA-Helikase <i>Salmonella enterica</i> (38/58) (NP_458743)
H8 uni (288)			nicht signifikant
H8 rev (280)			nicht signifikant
H10 uni (512)	ORF2	112	put. Regulatorprotein <i>Salmonella enterica</i> (35/49) (AF261825)
H10 rev (551)			nicht signifikant
E10 uni (712)	ORF3	120	hyp. Protein <i>Rickettsia prowazekii</i> (34/51) (F71645)
E10 rev (493)			nicht signifikant
E13 uni (759)			nicht signifikant
E13 rev (634)	TraF	218	Pilusassembly Protein <i>Vibrio cholerae</i> (44/63) (AAL59678)
E7 uni (724)			nicht signifikant
E7 rev (458)			nicht signifikant
E16 rev (491)			nicht signifikant

Im Folgenden sind nur die Sequenzen von pBI113, pKI239 und pKI202 angegeben, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Übereinstimmungen zu Proteinen bekannter Funktion zeigen.

Sequenzen von pBI113

Sequenz des Hybridplasmides p113E1

Die Aminosäuresequenz des hyp. Chromatransporters ChrA ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.

uni:

chrA →

```

CTATGGATGCCATTATCGGTCGGTGTAATGTTCTGGGGCAACAGGACTTGGGCGGTGTT      60
  L W M P L S V G V M F W G Q Q D L G G V
CAATTGCATCACATTGCCGTA CTTCTTGT TTTATTTATTCGCCCGCTTCTGTCTATCGCT    120
  Q L H H I A V L L V Y L F A A V L S I A
CAAAAAACACTGACAACCTTTAACTACAAGCTTCTTATTCTTCTGATATACGTTGTCATC    180
  Q K T L T T F N Y K L L I L L I Y V V I
ACGGGAATGCTACAGAATTATCAACACCTGAACCTTCTGGCTAAAGGCGTTTTTCATTTTGC    240
  T G M L Q N Y Q H L N F W L K A F S F C
GGCGTAGTCATTGTGGCGAATCACATCAGCAAACTATGACCTTTGATCAGTTCGCTCGT      300
  G V V I V A N H I S K T M T F D Q F A R
CATAGCTTCGCTGCGATCAAGTACACTTTTTTCGCTCCCTTATCTTCGCAATAGTTTTT      360
  H S F A A I K Y T F F A S L I F A I V F
ATGGGCACCTCTTTTAATGAGGTGGACGGAAAGAACTCTCTGAACTCGTTCTACTACTCAA    420
  M G T S F N E V D G K N S L N S F Y T Q
AAGAACACCTATGGAAGAGTCTGTACTTCTTTATCTTTTTTCTGTATCTACACAAAAAAG    480
  K N T Y G R V L Y F F I F F C I Y T K K

```

Anhang VII

ATCGGTGGACGCAAGCTCAGCACGCTGGATATGTTTTATATCGGGCTGGCTTTTTTTTGCC 540
 I G G R K L S T L D M F Y I G L A F F A
 T 541

Sequenzen von pKI239

Sequenzen des Hybridplasmides p239E4

Die Aminosäuresequenz der hyp. PHA-Depolymerase ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.

uni:

CCAGCGAGCCGCGCCCGTCAATGCCGCGCCTTGCCATCAGCAACACCTGCAGCATCTGCG 60
 GCCGCGTTTCGTGCGTCCGGCAACCACCAAGCCTGCTCGAAACGTCGACAGGCCCTGTTCA 120
 GTCAGCAGTCCCCAGCCAGGGATCGGAGAGATACCAAATGAATGCTTTTGTATTCCGCAT 180
pha →
M N A F V F R
 GGTTACGTCAATGGATTGTCGATTTCGGACTGCGGTTTCGCCAGGCAACCACACAAAAC 240
 M V H V N G L S I R T A V R P G N P H K
 CCCGCTGATCGTGTTCACGGTATCGGCGCCTCCCTGGATCTGGTTATCCCCCTTCGTGCA 300
 T P L I V F N G I G A S L D L V I P F V
 GGAGCTGGACGACGACCAGGAGGTGATTGCGTTCGACGTGCCGGGCGTAGGTGGCTCGCC 360
 Q E L D D D Q E V I A F D V P G V G G S
 GGCTCCACTCTTCCCCTACACGTTTCGGCAAGCTGGCCAGTACGGTCGCGCAGATGCTGGA 420
 P A P L F P Y T F G K L A S T V A Q M L
 TGTGCTCGGCTACGACCAGGTCAGCGTGATCGGCATCAGCTGGGGCGGATTCCCTCGCTCA 480
 D V L G Y D Q V S V I G I S W G G F L A
 GCAGTTCGCAAAGGATTACCCGA 503
 Q Q F A K D Y P

Die Aminosäuresequenz der möglichen Resolvase ist über der DNA-Sequenz dargestellt.

rev:

I R M V T T T S C E A I K A S G R I G H 60
 GAATTCGCATCACAGTCGTGGTCGAGCACTCGGCAATCTTTGCTGATCCCCGATGCCGT
 G H A L L D L V K L R L R E D P K R G K 120
 GCCCGTGTGCCAGCAGGTCGAGCACCTTAAGCCGCAACCTCTCGTCCGGTTTCCTTCCTT
 Y A G A A K A K E I G Q A Q R V R R Q E 180
 TATATGCCCCCGCCGCTTTTCGCCTTCTCTATCCCCCTGCGCCTGTCGCACCCCTCCGCTGTT
 Y D K R A I A A M M E V L M G S I A D L 240
 CGTAATCCTTCCTCGCAATAGCCGCCATCATTTCAACCAGCATTCCGCTGATCGCATCCA
 M R G T F E D G S R E R M A Q H T T P L 300
 GCATGCGCCCCGTGAACTCGTCGCCCCGACCTCTCCCGCATTGCCTGATGTGTCGTCGGCA
 D L A V I R L G K S D I L A K L T Q W D 360
 GATCCAGCGCGACGATGCGCAGCCCCTTGGAGTCGATCAGCGCCTTGAGTGTCTGCCAGT
 D P L L R S L R D I S E L L L I D G K K 420
 CATCAGGCAGCAGGCGTGAAAGCCGGTCGATACTCTCCAGCAGCAGAATATCCCCCTTCT
← *res*
 R D A I L R M L E P R D A 460
 TTGCATCCCTGATCAGCCGCATCAATTCCGGTCGATCAGC

Sequenzen des Hybridplasmides p239E18

Die Aminosäuresequenz der put. Dehydrogenase ist über der DNA-Sequenz dargestellt.

uni:

```

CGAAAATCAAATACGCCTCGCACTCGCGGGGCTTTTTATTGCCTGTCTGTTCGGATGAGC      60
GGGGCGCACTGGGCCGGATGGCCTGCTAGGAGAAACAATGAAGCTCAAGATCGTTGAAGT      120
CGATGGCAAGCAATACGCGGAAGTCCTGGATGGGAAGCCCGTATTCACTGGTGACGACGG      180

                                     * G A S R Q P
CAAAGACATTGCGTTTCGATGCTGTAGGCACCCGCGACACCATCACCCGGCTGAACGCTGA      240
  W T A G C E R R L R L T P L K R M Q L C
GGCCAAGTCGCACCGCACTCGCGCCGAAGCCGAGAGTCGGCAGTTTCCGCATTTGAAGG      300

  R R D L R L G C L V P F W R W D R G F V
CATCGGCGATCCAGCCGACGCCCCGAAAGCAACTGGAAACCATCGCCAATCTCGACCAAAA      360

  G P P H R D P R A L S R Q A R C P M A L
ACGCCTGGTGGATGCCGGTCAGGTCGAGCAAGCGAACGCTGAGCGCGACAAGGCATGGCA      420

  V G P R L I P C P A S R R A A A T H R S
AGCACGCCTGGACGAAGTATCGGGCAAGGCGCAGACCTACGAGCAGCAGCTGTATGCCGA      480
                                     ← orf7
  S R R C N R G S S T C R R C A P Q A P
GAAGATCGGCGGCAGTTTCGCCCCGCTCGAAGTACATCGCCGACAAGCTGGCTGTGCCGGT      540
    
```

Die Aminosäuresequenz einer mögl. Acyl-CoA-Dehydrogenase ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.

rev:

```

orf8 →
GAATTCGATGTTGGCATCGAGCATCTGCTCGGCAGCTACGGCGCTGTACGCCAGCGGGTT      60
  E F D V G I E H L L G S Y G A V R Q R V
ACCGTCCGCATCCAGCACGCCGGCCAGTCCTTGACGATGAACTGGCTCAACAGCCTGCA      120
  T V R I Q H A G P V L D D E L A Q Q P A
CTGGGTCTGATGCTCGGTCGTCTCGCCGTCGATCACACCCACGACGCCGACACCGAACTG      180
  L G L M L G R L A V D H T H D A D T E L
GGCGTCAGCATTGCGCAGCTTGC GGCGTTTCGCGCTCAAGGGCGACCGCGTATTCCGGGGTT      240
  G V S I A Q L A A F A L K G D R V F R V
ATCAATTCGTGCCAGCAACACTTTGGTGTGCGCGTCATAGGGCAGCCACTTGGTTTCCGA      300
  I N S C Q Q H F G V G V I G D P L G F R
GGTGTCTGTTCTTTCTTGGTTCAGTCGCAAAGCCATGGTTATTTCCTCACGCCACGCCGAA      360
  G V L V F L G Q S Q S H G Y S S R H A E
AAAAGACCGCCCCGGCTGGCGTTGGTGCCGGGGCAGTCAAGGGGTGAATCGGTGTTACGA      420
  K R P P R L A L V P G Q S R G E S V L R
AACGGTGATGGTCGACGTGCTGAGCTTCGTGCCGTCGTA T T G C T C G T C G C G G T G A T G G T      480
  N G D G R R A E L R A V V L A R R G D G
CGCCGAGCCGGATGCCACGCCAGTGACCA      509
  R R A G C H A S D
    
```


Sequenzen von pKI202

Sequenz des Hybridplasmides p202E13

Die Aminosäuresequenz des hyp. TraF ist über der DNA-Sequenz dargestellt.

rev:

```

I R N F L V D L T I A G Y G V I S T G Q      60
GAATTCGATTGAACAGCACGTCGAGCGTAATAGCGCCGATCCCACGATTGATGTGCCTT

P P M A L A L A P T Q F I E L K K A Q G      120
GAGGGGGCATGGCCAAAGCGAGGGCAGGGGTCTGAAAGATCTCAAGTTTCTTGCCTGGC

N D V R Y E P F A N N D L P G G D L S V      180
CATTGTCCACTCGATATTCCGGAAATGCGTTGTTATCCAGCGGTCCGCCATCAAGCGAAA

P I I N I G T S T T L S Q L V N A Q E A      240
CTGGAATGATGTTTATGCCAGTGGACGTTGTGAGCGACTGCAGGACATTGGCCTGCTCGG

C L M C N S K F F F F V G V R G A L S R      300
CACACAACATGCAGTTTGAAGAAAAAGAAAACCCCAACGCGCCAGCCAAGCTGC

L V K D K N A T V E R N M A N A A Y T A      360
GCAGCACCTTGTCTTTGTTGGCCGTCACTTCGCGATTTCATTGCATTTGCAGCATATGTCG

V P R R S D E D L F P D K M I A R S S A      420
CGACTGGTCGCCGGCTATCTTCGTCAAGGAATGGATCCTTCATGATCGCGCGGAAGAGG

E S F R S A K D M M V R Q L Y Y Y A Q V      480
CCTCGGAAAACCGCGACGCTTTGTCCATCATCACGCGTTGAAGGTAGTAGTAGGCCTGTA

N A D T P N D I A R D R Y K P L N K K I      540
CGTTTGCATCCGTCGGGTTGTGCATGGCTCGGTGCGGTACTIONTGGGCAGATTCTTCTTGA

W A V S F V E P G K P A P P E V K E E P      600
TCCAGGCGACACTGAACACCTCAGGACCTTTCGGGGCCGGAGGCTCGACTTTTTCTCCG
      ← traF
P A P P P P P P P P P P
GAGGCGCCGGCGGAGGAGGAGGGGGTGGTGGCGG      634
    
```

Sequenz des Hybridplasmides p202H15

Die Aminosäuresequenz einer mögl. Helikase ist über der DNA-Sequenz dargestellt.

rev:

```

Q H C K R A R C G K S R P L H S E H F T      60
TTGGTGGCATTGCGAGCCCGGCATCCTTTTGACCTGGGAGATGGCTTTCATGAAAGGT

E L P S C L F N N L T D V V A R V V T W      120
CTCGAGGGGGCTGCATAAAAAGTTATTCAAGGTGTCGACCACTGCCCTTACCACGGTCCA

D N T N L V K A M D G L R L N G E L K H      180
ATCATTTCGTATTCAGCACCTTGGCCATATCCCCAAGTCGCAAATTGCCCTCAAGTTTATG

E F K A R Y G K Y A L E H T T A C V V N      240
CTCGAATTTTGGCCGATAGCCTTTGTAGGCCAACTCGTGTGTGGTTCGCGCAGACGACGTT

K P F R K K A E D R I A K N Y A L Y L Y      300
TTTCGGAAAGCGCTTTTTTGGCCTCATCCCTAATTGCTTTGTTGTAGGCCAGGTACAGGTA

R L R N H K R S Y G E L S T T K S A G A
    
```

Anhang VII

W N I D V ← *orf4*
CCAGTTAATGTCCACGGCCGTTCCCCTAGATTCAATCAGGCCAATCTAGCAAGGGGAGAG 480
GAGTGCAGGTGACGAGACTGAGCCTGTAGGCGGGTTCGATCTATGACGGATATTGGTGCC 540
CCATGCCG 548

Sequenz des Hybridplasmides p202H10

Die Aminosäuresequenz eines hyp. Regulatorproteins ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.

uni:

AAGCTTGTTGCCGCGTATGAGGACTACCTCCGCGAATACCGGCTTGTTCAACGGACTGGA 60
CTCCCCTCCCCTCTTTCACTGGATGAGGCCTGGGTTCTCGCAAGAGAACTTCGCAGCTCA 120
GACCAGATAACACTCCTAAACAAAATAATATCTAGCGTCGTAAAGGGGCATTGAAATGGA 180
M
CGAATCACTTGCCAGTGTCTTGGTTAAAGCGGGTTTCCGATCGGCGATCATCCGGCTGCA 240
D E S L A S V L V K A G F R S A I I R L
TACCGGCCTGACCCGAAACAAGTGACCAGCCTGCGGAAAAAATTGGGGTCTGTGGCCC 300
H T G L T R K Q V T S L R K K L G V C G
CTCCGAATCCGGCCCCCTGCCCAACGCAGAAAGCCTTCTCGTCAAACGTGCGGTTTCTCT 360
P S E S G P L P N A E S L L V K R A V S
GGAAGCTAGCCTATTCATGCTGGCGTATTTAATTACTGCCGAAAAACCACGTGAAGCGGT 420
L E A S L F M L A Y L I T A E K P R E A
TGATATCTATGCGGTAATGGCTGCCCACACTCAGTATCTTGATAGCCACTCAGCGTTGCG 480
V D I Y A V M A A H T Q Y L D S H S A L
CGGTGGAATCTGGACCTTGAGAACATCCTGG 512
R G G N L D L E N I L

Sequenzen von pOL1820

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hinstranges ist unter der DNA-Sequenz, die des Gegenstranges über der DNA-Sequenz dargestellt. Die DNA-Bereiche der rRNA-Gene sind unterstrichen.

Kontig-Sequenz I:

repA: Replikationsgen

<i>repA</i> →	TCCAGAAGCGTGGTAATTTGCGCTGGAAGGCCTCCGAGACCCCTGACCCCTTGCCGCGTTTC	60
	Q K R G N L R W K A S E T L T L A A F	
	GCGGGATCATGGGGGTGCCCAAGGGCAAGCTCTCGTCTGGTTCGAACCTCAAGCTGCGCG	120
	R G I M G V P K G K L S S W S N L K L R	
	CGATCGACCCGGCGGTCTCCGAGGTCAATGCGCTGTCCGATTTTCATGGTTCGAGATCCTGC	180
	A I D P A V S E V N A L S D F M V E I L	
	CGGTCAAGACGGGTGCGGCGGTGACCCATGTGCGAACTGCGCTGGTGGCGCAAGGACGGCG	240
	P V K T G R A V T H V E L R W W R K D G	
	ATGCCAGCGGCGCCGCCGACCGGGCGCTGCAATTCTCGAAGGTTGGGCGCAAGGTCAAGG	300
	D A S G A A D R A L Q F S K V G R K V K	
	CCGAGGGCCGCGCCGAACAGATCCCCAACGAGCCCGAGCCGCGCCCCCGTCCGGCCTGGT	360
	A E G R A E Q I P N E P E P R P R P A W	
	TGGAACCCCATGGCGCCGCTTGCACACCGCCACCTATGAGACGGCCCGGCTGGGCCATC	420
	L E P H G A A L H T A T Y E T A R L G H	
	CTGGATACGACATCTATTTTCGTGGAAGGGGAATGGCGCTCCTGGCAGGCTGATAAAGACG	480
	P G Y D I Y F V E G E W R S W Q A D K D	
	AGCCCAAGGACCCCGACCGGGCCTATCTGGCCTTCTTTTCGAGTTATGTCGAGAAGAATT	540
	E P K D P D R A Y L A F F R S Y V E K N	
	AG	542
	*	

Kontig-Sequenz II:

parA: Partitioning-Gen

	TTGNTCGCCTGCTTTAGCATCCCGAAAAGTAAGTTTTAGCATCCCGAAAAGTAAGTTTTG	60
	CAATCCCAAAAAGTAAGAGTCAGAGCATATTACACTTTTAAAAACAACAACCTGGCTTCT	120
	ATGAACTTAGAATCTAAGAACTAAGAACATAAGGGCTGAAACTTATCCACAGAATTTCCA	180
	GGCTCTCAGAGATGAACTCTTACAGATTGGGGCAGGCCGGATTCCAATGAAACGGACCCT	240
	CTGCCACGGTCTGCATTTCTGATAAGCCCATGGCTTTTGAAGCAGTTTCGCTTTTCATCCG	300
	<u>M A F E A V S L S S</u>	
	GAATCGCGCCAGACAATCCGAACCTTACGCATAGGCTCCTGACCGACATAATCCGGCCCA	360
	G I A P D N P N F T H R L L T D I I R P	
	GCGAGCAGAAAGACAGGCTGATGAACCTGCCCTTATTCGCCGTCACCCTGGATGAGCTGA	420
	S E Q K D R L M N P A L I P V T L D E L	
	CGGTGCTCAGCCAACGTGCCTCGACAGTCATCGAAAGACTGCGCGAGCGCGTTTTTCGCC	480
	T V L S Q R A S T V I E R L R E R V F A	
	CCGGCACGCAGAAGCAGCTGGAACCTGGTCTTCAATGTTTCGCACCGCCGCCGAAATGGTTG	540
	P G T Q K Q L E L V F N V R T A A E M V	

Anhang VIII

GGCGCTCGGAAAAGGCCATCCGCGATTACGAGGCCGATGGCCGCCTGCCGGCCCCCAAGA 600
G R S E K A I R D Y E A D G R L P A P K
AGGACGAGGTACCCGGACGCCGGAACGGCTATTTCGCTGGCCGATGTGAACCGCATGCGCA 660
K D E V T G R R N G Y S L A D V N R M R
AGCTGTTCCGGGACCATGCCACATCGTGCGCCCGAARACCCSCCGYTGGTCCTGGCGGTGC 720
K L F G T M P H R A P E X X P X V L A V
AGAACTTCAAGGGCGGGGTAGGGAAGTCGACCATGGTCGTCCATCTGGCGCAGTATTTTCG 780
Q N F K G G V G K S T M V V H L A Q Y F
CGGTGAAGGGCTATCGGGTATGCGTGATCGAATGCGATTACACAGGCTTCCTCGACTGCGG 840
A V K G Y R V C V I E C D S Q A S S T A
TATTCGGCCTCAATCCCGATGTCGATGTCCATGAAGATGAGGACACGCTTTACCCCTTCC 900
V F G L N P D V D V H E D E D T L Y P F
TGCAGCATGGCGGGCCGAAGACCCTGCATTACGCGCTGCGGGCGACCTATTGGCCCCGCA 960
L Q H G G P K T L H Y A L R A T Y W P G
TCGCCATCATCCCGCCAATCTGGGGCTTTACGATGCCGAATATGAATTC 1010
I A I I P A N L G L Y D A E Y E F

Kontig-Sequenz III:

parA, *parB*: Partitioning-Gene

parA →
CGAGTTGACCGGCGCCGCCACCCGGACCGAGACCCACAAGCGCTGCCGCGCTATCTGGA 60
E L T G A A T R T E T H K R C R A Y L
CGCTGTCCGGCCGAGGTGCAATTGCTGGCCCCGAAGACCTGGCCCAGCCATCACCCCAA 120
D A V G R E V E L L A R K T W P S H H P
parB →
CCTGCGCAAGGAAGGCCTGCTATGAGCAAGCGCCATGACGCGATCTTTTCAGGACGTGCTG 180
N L R K E G L L *
M S K R H D A I F Q D V L
AAGGGGCTGGCGGAGCCGACAGCCCCGGACCGGGGCGCAGCGCGCTTCCTCAAGCGGCAG 240
K G L A E P T A P D R G A A R F L K R Q
AACGCCCTCTCCGAGAGCGTCCAGCGCGAAGAGAAGGTCTGCGCTGGGTTCGATCCGGCC 300
N A L S E S V Q R E E K V L R W V D P A
AGCTGCGCGATGTGGGAGCGTCACAACCGCGCCTATGACCTGCTGACCGAGAATAATTGC 360
S C A M W E R H N R A Y D L L T E N N C
GGCGACCTGATCGACAGTCTCAAGGCTCAGGGCCGGCAGGAATTCCCTGCCATCGTCCGC 420
G D L I D S L K A Q G R Q E F P A I V R
AGGCTGCCGCCGGGGCGCGGGGCGAGAATACGAGGTCATCTGCGGGGCGCGCCGTCATTT 480
R L P P G R G A E Y E V I C G A R R H F
GCCGTCTCATGGCTGCGGGCCAACAACCTATCCGCAATTCTTCTACCTCATCGAGATCCGC 540
A V S W L R A N N Y P Q F F Y L I E I R
GACCTGACCGATGAGGAGGCTTTCCGGCTTGCCGATATCGAGAACCGTGACCCNGCCGAT 600
D L T D E E A F R L A D I E N R D X A D
CTGAGCGATTACGAGCGCGCCTGCGATTACCTGCAGGCGCTCGAATTCTATTACGGCGGC 660
L S D Y E R A C D Y L Q A L E F Y Y G G
AAGCAGAAGGCGATGGCGGCCCGGCTGGAGGTCTCGGAGGCTTGCTCTCGCGCTATCTC 720
K Q K A M A A R L E V S E A W L S R Y L
TACCTCGCACGCCTGCCCGAGATGCTGGTTTCAGGCCTGGCCTCAGATCACTGATCTGCGC 780
Y L A R L P E M L V Q A W P Q I T D L R

Anhang VIII

GAACTCCATGCCCGTCGCTTGC	CGCCATGCTGGCCCATGCCGAGGATCAGGTCCTGACC	840
E L H A R R L R A M L A H A E D Q V L T		
GAAGCTGCGGCCATTGCCACCGAACAGGAAGCCGCGCGGAACGGTCGAGGGGCGTTCATC	900	
E A A A I A T E Q E A A R N G R G A F I		
CCCGTGCCGAAGGTGCTGGCCCCGGCTGAAGGCTGCGGCTTTCGGATCGAAGCTGGTTCGAG	960	
P V P K V L A R L K A A A F G S K L V E		
ACCGAGACGGCCGAGCTGGCGATCCGGCGGGCGCGCAACCGGATCCGGTTGGAATTCTCG	1020	
T E T A E L A I R R R G N R I R L E F S		
GATGACCTGCCCCGAGCCCAGATTGCGCGCGGCACTTGAAGCTTTCCTCGCGCAGGAATTT	1080	
D D L P E P R L R A A L E A F L A Q E F		
CCGCGGGACTGAAATTGCCAATTGGCAATTTCCATCACCGCCGCCAAATCCTCAAAAATT	1140	
P R D *		
GCCAATTGGCAATTTCCGTTGCCATTGCGCGATAAGCGAGGACTTATCGCCAGCCATGTC	1200	
CGGGGCGCAGCAGCTTACCGGACATCCGCGAGACAGGCCCTCATGCGGCGCAGGTTGCG	1260	
TATGTAGGTGACCCGTAACGGCTTCCCTGGCTGGAAGCGCTGACCTCTTCCGGTGTTCAC	1320	
AGCAGGCCTGCTCGGAGAGATTGCGACCCGATCCGCCGGGCTTTTGATGATTCATCCAGA	1380	
AAATCCAGTCATCTGCGCAGCGGTAAATTGGCGACACCGAATGAAAATCAATGAAAAAAT	1440	
GTTTTTTTTTCATACACTTGCCAACAATTTTCATAWTTTTGTGGTTTTTTGCTCTTGCGGGTT	1500	
CTGGCGGTGATCCGTAAATACGCCTTACCGAGCCGGCAGGGTGCTGGAGCGGTTCCGAC	1560	
GGATGGCCTTGACGGTTGTTTGTCTGGTAAAATCGGGAAGTTTGATGGCTTGTGCGGCGC	1620	
CTGATGAGAAGATGGCGCGGTTCCGGGTTGTTTTGTTTCTCTGCTTTTTGACATTGCGAG	1680	
ATATCTGAAGAGATATGCGGGCGGTCTGATCGTTTTTCGATCGAGAAGCTTGCATATCGGC	1740	
CTGGTAGGGAACCGATGATCCAGGTGTCAGCTTCACTGTTTGTGCGGCTCACGCAAGTGA	1800	
GGACCGATGAACAGATGATTACTTAACTTCGGTTAAGTGACARATGTGCAAGGTTTCGACG	1860	
<i>16S-rDNA</i> →		
TCAAGGATAGCAACTTCGGTTGCTTTCAACTTGAGAGTTTTGATCCTGGCTCAGAACGAAC	1920	
GCCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATCCTTCGGGATTAGCGGCGGACG	1980	
GGTGAGTAACGCGTGGGAATATGCCCTTCTCTACGGAATAGCCTCGGGAAACTGGGAGTA	2040	
ATACCGTATACGCCCTACGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGGATTAGCCCGCGTTGGATT	2100	
AGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCTACGATCCATAGCTGGTTTGAGAGGATG	2160	
ATCAGCCACACTGGGACTTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA	2220	
TCTTAGACAATGGGGGAAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGCCCTTAGG	2280	
GTTGTAAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAGAAGCCCCGGCTA	2340	
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGC	2400	
GTAAAGCGCACGTAGGCGGACCCGAAAGTTGGAGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGG	2460	
ACTGCCTTCAAACTATCGGTCTGGAGTTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATTCAGGGAAATCCG	2520	
AT	2552	

Kontig-Sequenz IV:

<i>16S-rDNA</i> →	
ANCCAGGAAGGCCAGGAAAACCGNNGGGCAAAGCGGGCCACAGATAAAAACCCNGTAGCC	60
CCCCGTTAACGAGGATGCCATCTCGGTANCATGCTATTTCGGTGACACACCTAACGGATAA	120
GCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	180
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAACCCCTT	240
GACATTACAGGACATCCCCAGAGATGGGGCTTTCACTTCGGTGACCTGTGGACAGGTGCT	300
GCATGGCTGTCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAAC	360
CCACACTTCCAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTGGAAGA ACTGCCGATGATAAGTC	420
GGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGCTACACACGTC	480
CTACAATGGTGGTGACAGTGGGTTAATCCCCAAAAGCCATCTCAGTTTCGGATTGGGGTCT	540
GCAACTCGACCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAACAGCATGCCGCGGTGAA	600
TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGGTCTACCCGACG	660
GCCGTGCGCTAACCCCTTACGGGAGGCAGCGGACCACGGTAGGCTCAGCGACTGGGGTGAA	720
GTCGTAACAAGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTAAGAAGCTT	778

Anhang VIII

Kontig-Sequenz V:

GGCGCCCTTGTGCCCTTGCCCGTCCTATNCGTTGNTGTGATTGCGTCATTACCGACGCTT	60
CCCTGTACNCCAGTTTACCGCTTNCGCTTGTAAAGCGACTTAGCAGAACATCCAGATCAGG	120
ATGTTACATTTGACGCTCGGACCGTCTCATATCTCTTCAGAAAAGTAAGCCAGGCCCG	180
<i>t-RNA-Ile</i> →	
TGACAGGCGTCAGCCCCGTTTGGGTGCCGGTCTGTGAATGGGTTCGGTAGCTCAGGTGGTTA	240
GAGCGCACGCCTGATAAGCGTGAGGTTCGGAGGTTCAAGTCCTCCTCGACCCACCATCACC	300
<i>t-RNA-Ala</i> →	
TGGGAAGACTTCCGGGGCCTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATG	360
TCAACGGTTTCAATCCGTTAGGCTCCACCAAATCCCGACATGATCAGAAAAGAAGTCTGC	420
TTCTTTCTCGTCTGTCGGACGCAAGCGCAGCTAGGCTGCGCATTTTACATCGTTCAGAG	480
AGATAATCGGCGTTATTGGCCGTAACCAAGTGCGGTTGCGGTGCCAGTACGATCCTTCGG	540
GATCGGAAAGCAACAATGACGTTGTCCAAGTCAAGTACACTAACCAAATGTGTAATTCTT	600
<i>23S-rDNA</i> →	
GCATGGGAATTGCACAGAAAAGTCCATTCTTAGGAATGGGCGGAAAACCGTACATGCTTTT	660
GATCGGAAGCGACCCCCGCGCGCAGCAAAAAGGGCGTGGGATCGACAGACCTTAATTGGT	720
CTTTCTTCTTCCGGATCAAATCAAGCGCGATAAGGGCGTTGGTGGATGCCTTGGCAGTAG	780
AGGCGATGAAGGACGTGATACTCTGCGATAAGTCATGGGGAGCTGAGATAAGCTTTGATC	840
CATGAATTTCCGAATGGGGAACCCACCTGAATGTTTGTCTGTTTATCTTCGGATAATC	900
AACAGCTGGCATAACCAGGTATCTTTTACCTGAATACATAGGGTTTAAGAAGCGAACCCG	960
GGGAAGTGAACATCTAAGTACCCGAGGAAAGGAAATCAACAGATACTCCCCTAGTAGT	1020
GGCGAGCGAACGGGGACCAGCCGAGCCGTGAGAATGACCAGAATGTGTTGGAAAAGCACAG	1080
CCATAGTGGGTGACAGCCCCGTATGGGAAGTTTGATCGGACGTATTAAGTAGGGCGGGAC	1140
ACGTGAAATCCTGTCTGAAGATCGGGGGACCACCTCGAAGGCTAAGTACTCCTTACTGA	1200
CCGATAGCGAACCAGTACCCTGAGGGAAAGGTGAAAAGCACCCCGACGAGGGGAGTGAAG	1260
CAGTTTCTGAAACCGGACGCCTACAAGCAGTTCGGAGCCGCCTTGAGCGGTGACGGCGTAC	1320
CTTTTGTATAATGGGTCAACGACTTGGTCTATCTAGCAAGCTT	1363

Kontig-Sequenz VI:

<i>23S-rDNA</i> →	
AAGCTTTGGATGTGCATTTATGCACGTGGTAGCGGAGCGTTCTGTGATATAGAACGCTGC	60
CTCCTTAGTATCCTCGGATACATTGGAGGCAATGTTCTGACTGTGAAGCCGGGCTGTAAG	120
GCATCCGGTGGAGTGATCAGAAGTGAGAATGTTGACATGAGTAGCGACAAAACAGGGTGAG	180
AGACCCTGTGCGCGAAAGTCCAAGGGTTCCTGCTTAAAGCTAATCTGAGCAGGGTAAGCC	240
GGCCCCAAGGCGAGGCCGAAAGGGCGTAGTCGATGGGAACCAGGTTAATATTCCTGGGCC	300
AGGAGATGGTGACGGATCGCAGAGGTAGTTCGGTCTTAACGGATTGATCGGGCTGCTGAG	360
TGGTTTCTGGAAATAGCCCTCCATGAGACCGTACCCTAAACCGACACAGGTGGACTGGTA	420
GAGAATACCAAGGCGCTTGAGAGAACCACATTTAAGGAACTCGGCAAAATACCTCCGTAA	480
GTTTCGCGAGAAGGAGGCCCGTTTGTACGCAAGTATGGGCGGGGGGCACAAACCAGGGGG	540
TGGCGACTGTTTACTAAAAACACAGGGCTCTGCGAAAAGCCGTAAGGCGACGTATAGGGTC	600
TGACGCCTGCCCGGTGCCSGRAAGGTTACAAMGGAGATGTGCAAGCATTGAATTGAAGCC	660
CCGGTAAACGGCGGGCGTAACTATAACGGTCTAAGGTACGAAATTCCTTGTTCGGTAAGTCC	720
GACTGACGATGGGGTACGATTCCCGTGTCTCAATGTGATCACGGAATGATGNTGGAATGC	780
GATTCGGGTAAGGANACCAGCTAT	805

Kontig-Sequenz VII:

kpsE, *kpsT*: Gene des Polysaccharidexports

* P Y A P S V R P W X R R V	
AGCCTTCCCCCNGNCCCCTCACGGATAGGCTGGGGAGACCCGCGGCCACCNACGACGGA	60
A G I E Q A C X V P V E R C I P D F D I	
CCGCGCCGATTTCTGAGCGCACNCAACAGGGACCTCACGACAAATAGGGTTCGAAATCGA	120

Anhang VIII

G L S T G M G P A I E H G L F L D W L A
 TCCCAAGCTGGTTCCCATCCCAGGCGCGATCTCATGCCCGAGGAATAGGTCCCAAAGGG 180

Q P L Q P R D R R L G R C L R V L A D T
 CTTGTGGAAGCTGGGGCCGATCGCGGCGAAGTCTCGACATAATCGAACCAGGGCATCGG 240

D V G Y I R A V F R V N Q A G T L E G H
 TATCGACGCCGTAGATCCGGGCCACGAAGCGGACATTCTGCGCCCCGGTCAGCTCGCCAT 300

F S G A F G V P W S V T G D S L I R G S
 GGAAGCTGCCGGCAAAGCCGACCGGCCAGGAAACCGTCCCCTCGCTGAGGATCCGCCCCG 360

T P L M T G A I M R L L S S K G A G N R
 AGGTCCGCAGCATCGTGCCCGCATCATTCGAAGAAGGCTGGATTTACCCGCACCATTTC 420

G L L A V S Q G T P F V A N V R D A I V
 GTCCCAGCAGGGCCACGGATTGCCCGGTGGGAAAGACCGCGTTGACGCGGTCCGCAATCA 480

T R L G K T H Y I K T L D E L V I M *
 CCGTCCGTAACCCCTTGGTGTGATAGATCTTGGTGAGGTCCTCCAAGACGATCATGATCA 540

R R D R I S Y Y I L L M I S W G L L M V
 GCGCCGATCGCGAATGCTGTAATAGATGAGCAGCATGATCGACCAGCCCAGCAGCATGAC 600

G F V S A L L W A R R P A L S S E A I K
 GCCGAAGACACTGGCCAGCAGCCAGGCGCGGCGCGGTGCCAGAGAGGATTCCGCGATCTT 660

P E I H A A L Y R S Q R M A E A V A T E
 GGGCTCGATATGGGCGGCCAGATAGCGCGACTGCCGCATGGCTTCGGCGACGGCGGTTTC 720

Y G A Q A S R F T V E A F E M D S A L K
 ATAGCCGGCCTGAGCCGAGCGGAAGGTCACTTCGGCGAATTCCATATCCGAGGCGAGCTT 780

E Y E A M L Q A Y S E G A P G E G A A G
 CTCGTATTCCGGCCATCAGCTGGGCATAGCTCTCGCCGGCCGGCCCTCTCCGGCGGCACC 840

L K G R E D V I R A R I A D I X Q K A Q
 AAGCTTGCCACGTTTCGTCTACGATCCGGGCGCGGATGGCGTGCATCNTCTGCTTGGCCTG 900

T V R H D D D R A V N H L T D L T I L A
 GGTGACCCGGTGATCGTCGTCGCGGGCGACATTATGCAATGTGTCGAGTGTGATCAGGGC 960

E A L Q A Q L S N L V G M Q G S L D A K
 TTCAGCCAGCTGCGCTTGAGTGCAGTTTCAGGACCCCCATCTGGCCCCGAGAGATCGGCCTT 1020

P D V I Q T R M R F T T L A Q R T E T L
 TGGGTGACGATCTGCGTCCGCATCCGGAAGGTGCTCAGGGCCTGACGGGTTTCGGTCAG 1080

R A Q A K E L E T R A F R T T D E R A I
 GCGTGCCTGGGCCTTTTCCAGCTCGGTGCGGGCAAAGCGGGTGGTATCTTCGCGGGCGAT 1140

D S L R N I T R S S E D F A A G R S R M
 GTCGGACAGCCTGTTGATCGTCCGGCTGCTTTTCGTCAAAGCGGCGCCGCGGATCTCAT 1200

L R G E R T F A A V Q L T I L R T S T D
 AAGCCGTCCTTCGCGGGTGAAGGCGGCAACCTGCAGCGTGATCAGCCGGGTTCGAGGTGTC 1260

Y L V R V Q R R W Y K T L D E I P L S P
 GTAGAGGACGCGGACCTGACGACGCCAGTATTTTGTGATCCTCGATGGGCAGGCTGGG 1320

N L A F V P D D P W A K S F R A R L D M
 GTTCAGGGCAAAGACCGGATCATCTGGCCAGGCCTTCGAGAACCAGGGCGCGCAGGTCCAT 1380

T K D I K S V I D E S G L F D Y L I D T
 GGTCTTGTGATCTTGGAGACGATGTCTCGCTGCCAGGAAAGTCGTAAAGGATGTCGGT 1440

D S A T T N S A L Q I T G G L I D I S P
 ATCCGAGGCCGTGATATTGCTGGCCAACTGGGTGATGCCGCCAGAATGTCGATGCTGGG 1500

S A D E K R V S F S V T S I Y Q D E A R
 GCTCGCATCTTCCTTGCGAACCGAGAAAGAGACCGTTCGAGATGTAAGTGGTCCCTCGGCGG 1560

Anhang VIII

T W L Y W A S I L T P L G V V L L F S L
 CGTCCACAGATAACCAGGCGCTGATCAGCGTGGGCAGGCCGACGACCAGCAGGAAGGAAAG 1620
 L I L K H R L E M ← *kpsE*
 CAGGATCAGCTTGTGGCGCAGTTCCATCCGGGCGTTGGGAACCGTCGGGCGCACGACATC 1680
 CGCCTGCTTGGTGATCCGCGAGACCGGGCTGGTCACGGTCCTTGGCGCTGACGGTGTGAG 1740
 GGTGGCTTGGACAACGGGTTTGACCAGTCTCGCAGGGGTGAGCGCACCCCTTATCGGCCTG 1800
 CTCCTTGTCCACGGGTGAGGTCTGTTTCACGTTGTCATGCTTTCCGGTTGTTTCCACCCCT 1860
 GCAGGCANGGTACATGCGCCNTACGACAAGACCAGCGGTCCGAATTC 1908

Kontig-Sequenz VIII:

per: Permeasegen, *gly*: Gen für eine Glykosyltransferase

per →
 TGTCCGCAAGCGTCCGCGTATTCCAGATGGGCCGGACCGTGCTGGCGCTGATGCTGCGCG 60
 S A S V R V F Q M G R T V L A L M L R
 AGATGGCGACGACATATGGCCGTTCCGTGGGCGGGTATCTGTGGGCAATCCTCGATCCTG 120
 E M A T T Y G R S V G G Y L W A I L D P
 TTCTGGGTATCGCGCTTTTGTCCCTGCTGTTCTCACTTGGCGCTGCGCAGGCCGCTGATCG 180
 V L G I A L L S L L F S L A L R R P L I
 GCGAAAACCTTCGCTTGTCTATGCCAGCGGGTATCTGCCCTTTGCCATGTTCAATTTCGT 240
 G E N F A L F Y A S G Y L P F A M F N S
 TATCCCAGAAAATGGCGCGATCAGTGCAATTTTCCAAGCCTTTCATGGCCTATCCCTGCG 300
 L S Q K M A R S V Q F S K P F M A Y P C
 TGACCTTCATGGATACGCTGATCGCGGATTATTGCTGAACGGGCTGACCGATATCATCG 360
 V T F M D T L I A R L L L N G L T D I I
 TCGCCGCAATCGTGGTGACCGGGATCCTCGTGATCTATGGGCTGCCTTTCTGGGTGATC 420
 V A A I V V T G I L V I Y G L P F W V D
 TGGGGCCACTGGCCTCGACCATGGTGCTGGCTATTTTCCCTGGCTGCGGGAATTGGCACGC 480
 L G P L A S T M V L A I F L A A G I G T
 TGAATTGCTTCATCATGACGTCCTTCCC GG CATATGAGCGCATCTGGTCGATCCTGACCC 540
 L N C F I M T S F P A Y E R I W S I L T
 GACCGCTTTTCTGATCTCCGGCATCTTCTTACCTTCGATTCCATCCCGAAGATTGCGC 600
 R P L F L I S G I F F T F D S I P K I A
 AGGATATCCTGTGGTACAATCCGCTGGTCCATCTGATCGGATTGATGCGCAAGGGACTTT 660
 Q D I L W Y N P L V H L I G L M R K G L
 ATCCAACCTATGGCGGCGAATATATCAGCCCCGGCTATGTGCGCCGTCGTCGCTGCTGTCA 720
 Y P T Y G G E Y I S P G Y V A V V A A V
 CGCTGTTTTTTCGGGCTGCTGCTGCTGGTCCGCCATTTCAAACGACTGCTGGAAAACTGAT 780
 T L F F G L L L L V R H F K R L L E N *
 CCGCACGGCTTTGCGGCCATGGGCTGGCCCCGTTTCTCGAACATGAAAGTCGCCGCAATG 840
 M
 ACCGGCTCTTCGTCCTCCAGCAACCGGTTGATCCTGGCTGCCGTCGTCGTCACGCATAAT 900
 T G S S S S S N R L I L A A V V V T H N
 CGCCTGGAGAAGCTTCAGGTGACGGTGAAGCGCCTTCTGGAAGAAGGGGTCGACCACGTC 960
 R L E K L Q V T V K R L L E E G V D H V
 TGTGTCTTCGACAACGCCTCCAGCGACGGAACCGCCGAATGGCTGGCCGAGAACGGCGAT 1020
 C V F D N A S S D G T A E W L A E N G D
 CCGCGCCTGAGCATCTGCCGCGACGCCGATAATCTGGGCGGGGCGGGCGGTTTTGACCAA 1080
 P R L S I C R S A D N L G G A G G F D Q

Anhang VIII

GGCATGCGCGAGGCTGTCCGGCGCTTCGACCCGGATTGGCTGGTGGTCATGGACGATGAC	1140
G M R E A V R R F D P D W L V V M D D D	
GCCGTCCGGCGCCCAAGGCGATTGCCGCCTTCCATGCGATGGACAAGCAGGGCTGGGATG	1200
A V R R P R R L P P S M R W T S R A G M	
CGATCGGGGCTGCGGTCTTCTGGCCGCAGGCGGGATCTGCGAAATGAACCGTCCCTATCG	1260
R S G L R S S G R R R D L R N E P S L S	
CAATCCCTTCTGGCGGGGGCGC	1282
Q S L L A G A	

Mein Dank gilt all denen, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben.

Herrn Prof. Dr. R. Eichenlaub danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. C. Baron danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten, obwohl er durch seinen Arbeitsplatzwechsel und dem damit verbundenen Laborumzug stark eingebunden ist.

Claudia Disque'-Kochem danke ich für die gute Zusammenarbeit an dem BMBF-Projekt und die vielen nützlichen Ratschläge und aufmunternden Worte bei der Arbeit mit den Bodenisolaten. Mein besonderer Dank gilt Brigitte Dreiseikelmann, die immer ein offenes Ohr für fachliche Diskussionen hatte und mit vielen hilfreichen Anregungen zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat. Ulrike Harke bin ich dankbar für die Hilfe bei experimentellen Schwierigkeiten, der Unterstützung bei der Pflege unserer Bodenisolats und die vielen netten Gespräche. Für das sehr gute Arbeitsklima und die Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe.

Karl-Heinz Gartemann danke ich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit und seine fachlichen Diskussionen. Oliver Kirchner danke ich für die prompte und geduldige Hilfe mit unserem Chaos-Laborcomputer. Allen anderen Mitgliedern des Lehrstuhls danke ich für die netten Gespräche und die Aufmunterungen im Laboralltag. Besonders meinen ehemaligen Kollegen Mario Hagemeyer und Holger Jahr gilt mein Dank für die angenehme und humorvolle Zeit im Labor. Meiner langjährigen Studienfreundin Natalija Hohnjec danke ich für konstruktive Kaffeepausen und die netten Abende in Bielefeld. All meinen Begleitern bei der täglichen Bahnfahrt danke ich für die netten Gespräche, ohne die das frühe Aufstehen erheblich schwerer geworden wäre. Marion Heidenreich und Cordula Spillmann danke ich für die Minimierung von Tippfehlern in dieser Arbeit. Jürgen Mroch gilt mein Dank für die Benutzung seines Scanners und seine fachkundige Hilfe bei der Bewältigung von Computerproblemen.

Meiner Familie und all meinen Freunden danke ich für die Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ein letzter Dank gilt Peter Helms, der mir während der letzten 10 Jahre ein sehr guter Freund war und den ich in guter Erinnerung behalten werde.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Helpsen, im Dezember 2002

Lebenslauf

Name, Vorname: Battermann, Anja

Geburtsdatum: 02.09.1970 in Stadthagen

Schulbildung: 1977 – 1981 Grundschule Nienstädt
1981 – 1983 Orientierungsstufe Helpsen
1983 – 1990 Neues Gymnasium Stadthagen

Schulabschluß: 1990 Abitur

Studium: 1990 – 1997 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld

Studienabschluß: Diplom 1997 am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie der Universität Bielefeld

Berufl. Werdegang: 01.04.1997 – 30.09.1998 wissenschaftl. Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie der Universität Bielefeld
01.10.1998 – 31.12.1998 wissenschaftl. Mitarbeiterin im Fachbereich 7 der Universität Oldenburg
01.01.1999 – 31.10.2002 wissenschaftl. Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie der Universität Bielefeld