

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Philipps-Universität Marburg**

**Geschäftsführender Direktor:**

**Prof. Dr. T. Gudermann**

**Studie über die Genregulation der Expression der  
3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Bakterium  
*Comamonas testosteroni***

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin**

**dem Fachbereich Medizin der**

**Philipps-Universität Marburg**

**vorgelegt**

**von**

**Christina Schüller**

**aus Bad Neuenahr**

**Marburg 2006**

**Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am 26. Januar 2006.  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs**

**Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch**

**Referent: Prof. Dr. E. Maser**

**Korreferent: Prof. Dr. M. Eilers**

## Inhalt

1. Zusammenfassung .....	4
2. Einleitung .....	5
2.1 Struktur der Steroide .....	6
2.2 Natürliches Vorkommen .....	8
2.2.1 Sterole .....	8
2.2.2 Gallensäuren .....	9
2.2.3 Vitamine .....	10
2.2.4 Steroidhormone .....	10
2.2.5 Steroidglykoside und andere natürliche Glykoside .....	11
2.3 Mineralisierung von Steroiden .....	12
2.3.1 Steroidabbau beim Menschen .....	12
2.3.2 Mikrobieller Steroidabbau .....	13
2.4 Transport und Bindung von Steroiden .....	15
2.5 Comamonaden .....	17
2.5.1 <i>Comamonas testosteroni</i> .....	17
2.5.1 Verwertung steroidal Kohlenstoffquellen .....	19
2.5.2 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase .....	19
2.6 Aufgabenstellung .....	21
3. Material und Methoden .....	23
3.1 Abkürzungen .....	23
3.2 Geräte .....	24
3.3 Chemikalien und Materialien .....	24
3.4 Bakterienstämme und Plasmide .....	26
3.4.1 Bakterien .....	26
3.4.2 Plasmide .....	26
3.5 Mikrobiologische Techniken .....	30
3.5.1 Sterilisation .....	30
3.5.2 Wachstumsbedingungen .....	30
3.5.3 Bestimmung der Zelldichte .....	30
3.6 Medien und Antibiotika .....	31
3.6.1 Medien .....	31
3.6.2 Antibiotika .....	31
3.7 Molekularbiologische Methoden .....	31
3.7.1 Präparation von Plasmid-DNA .....	31
3.7.2 Präparation genomischer DNA .....	33
3.7.3 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	34
3.7.4 Restriktion von DNA .....	34
3.7.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	34

3.7.6	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der PCR-Technik .....	35
3.7.7	Dephosphorilierung von DNA .....	36
3.7.8	Ligation von DNA .....	36
3.7.9	Transformation .....	36
3.7.10	Proteinextraktion .....	37
3.7.11	Proteinbestimmung .....	38
3.7.12	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	38
3.7.13	Southern Blot .....	39
3.7.14	DNA-DNA-Hybridisierung .....	40
3.7.15	ELISA von 3 $\alpha$ -HSD .....	42
3.8	Biochemische Methoden .....	43
3.8.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	43
4.	Ergebnisse .....	45
4.1	Konstruktion von Suicide Plasmiden .....	45
4.2	Strategie zu Plasmidherstellung .....	46
4.3	Transformation der Plasmide in <i>E. coli</i> .....	49
4.4	Marker Suicide Integration .....	50
4.4.1	Mating .....	50
4.4.2	Elektroporation .....	51
4.5	Nachweisverfahren zur Überprüfung der Integration .....	52
4.5.1	Kultureller Nachweis .....	52
4.5.2	Nachweis durch Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	54
4.5.3	Nachweis durch Southern Blot .....	57
4.6	HPLC-Analyse .....	59
4.6.1	Allgemeines .....	59
4.6.2	Ergebnisse der HPLC-Messungen dieser Arbeit .....	60
4.7	Untersuchung der Enzymexpression der 3 $\alpha$ -HSD durch ELISA .....	60
4.8	Auswirkung verschiedener Promotoren auf die Genexpression von <i>hsdA</i> .....	64
5.	Diskussion .....	67
5.1	Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit .....	67
5.1.1	Methodik: Suicide Plasmide .....	67
5.1.2	Diskussion zu den Ergebnissen der Integration der Suicide-Plasmide .....	69
5.1.3	Diskussion zur den Ergebnissen der HPLC und ELISA .....	70
5.1.4	Diskussion zu den Promotoren <i>tac</i> und <i>lac</i> .....	72
5.1.5	Diskussion zu den möglichen Repressoren der 3 $\alpha$ -HSD .....	73
5.2	Genregulation in Bakterien .....	74
5.2.1	Repressoren in Bakterien .....	76
5.3	Bedeutung von <i>Comamonas testosteroni</i> in Medizin und Umwelt .....	77
5.3.1	Medizin .....	77
5.3.2	Umwelt .....	79

6.	Anhang .....	81
6.1	Abbildungen.....	81
6.2	Literatur.....	83
6.3	Akademische Lehrer .....	92
6.4	Danksagung.....	93

## 1. Zusammenfassung

Die Fähigkeit vieler Mikroorganismen, Steroide und Steroidanaloga als Kohlenstoffquellen im Boden zu nutzen, ist schon lange bekannt. Die Mikroorganismen bauen zu diesem Zweck das energiereiche steroidale Ringsystem durch eine Vielzahl von Enzymen bis zur Bildung ringfreier Carbonsäuren und CO<sub>2</sub> komplett ab. Der Abbau des Sterangerüsts kann nur durch Enzyme bakterieller und einiger niederer eukaryontischen Organismen bewerkstelligt werden. Zu diesen Organismen gehört das gram-negative Bakterium *Comamonas testosteroni*, das seine steroidabbauenden Enzyme nicht konstitutiv exprimiert, sondern einer Induktion durch die Substrate selbst unterliegt. Neben einer Reihe von steroidabbauenden Enzymen wurde auch das Schlüsselenzym 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase (3 $\alpha$ -HSD/CR) identifiziert, das die Aromatisierung des A-Ringes durch Oxidation einleitet und dadurch den weiteren Steroidabbau ermöglicht.

Als Ausgangssequenz wurde das Plasmid p6, ein in einen „high-copy-number“-Vektor kloniertes DNA-Fragment mit einer Größe von 5.275 kb, verwendet. p6 enthält die Gensequenz für die 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (*hsdA*), die Gensequenz für ein weiteres am Steroidstoffwechsel beteiligtes Enzym (*3-ksi*) und vier offene Leserahmen (orf 1-4), die mögliche Regulationselemente der 3 $\alpha$ -HSD codieren. Im Labor von Prof. Dr. E. Maser wurden mittels Computeranalysen von p6 zwei zu einander pallindromische Sequenzen mit einer Länge von 10 Nukleotiden gefunden, die als mögliche Operatoren fungieren (OP1, OP2). Es konnte mit Hilfe von EMSA eine spezifische Bindung eines von orf4 codierten Proteins (Repressor A) an die Operatoren der 3 $\alpha$ -HSD und eine Blockade der Expression von *hsdA* nachgewiesen werden (Xiong et al, 2003). In Anwesenheit von Testosteron löst sich Repressor A von OP1/OP2 und ermöglicht so die Transkription von *hsdA* (Xiong et al., 2001). In weiterführenden Experimenten wurden die Repressorproteine mit Hilfe von His-tag-Säulen gereinigt und Antikörper präpariert. Als nächster Schritt ist hier der spezifische Bindungsnachweis von Repressor A an OP1 und OP2 mittels „Footprint-Analysen“ geplant.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, einen Beitrag zur Aufklärung der Regulation der 3 $\alpha$ -HSD/CR zu leisten und weitere mögliche Regulationselemente zu identifi-

zieren. Dabei lag der Schwerpunkt in der Herstellung von so genannten Marker Suicide Plasmiden, die durch gezielte Integration in die chromosomale DNA von *Comamonas testosteroni* bestimmte Regulationselemente – insbesondere orf2/Repressor B – in ihrer Funktionsweise stören bzw. zerstören sollten. Durch eine anschließende Messung der Expression von *hsdA* erhoffte man sich, Rückschlüsse auf die Funktionsweise dieser Regulationselemente ziehen zu können. Zur Integration der Marker Suicide Plasmide in chromosomale DNA wurden zwei verschiedenen Methoden verwendet: „Mating“ und Elektroporation: Es konnte gezeigt werden, dass beide Methoden effektiv sind und zu einer stabilen Integration führen. Die erfolgreiche Integration wurde mittels Kultur, PCR und Southern Blot bewiesen. Die Messungen der Expression von *hsdA* mit Hilfe von HPLC und ELISA zeigten keine eindeutigen Ergebnisse, die Rückschlüsse auf die vermutete Repressorfunktion von orf2/Repressor B zuließen. Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser konnten nachweisen, dass orf2 seine repressorische Aktivität auf mRNA-Ebene entfaltet (Xiong et al., 2003).

Die Entschlüsselung des Regulationsmechanismus des Enzyms 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase im steroid-metabolisierenden Bakterium *C. testosteroni* könnte Bedeutung haben für Medizin und Umwelt: Zum einen ist durch Applikation von gentechnisch veränderten steroidabbauenden Mikroorganismen eine neue Möglichkeit der Therapie von Patienten mit koronarer Herzkrankheit aufgrund einer Hypercholesterinämie vorstellbar. Zum anderen ist der Einsatz dieser Bakterien in Gewässern denkbar, die durch eine steroidbedingte Feminisierung gefährdet sind.

## 2. Einleitung

### 2.1 Struktur der Steroide

Steroide sind natürlich vorkommende organische Verbindungen, die biochemisch zu der Gruppe der cyclischen Isoprenoide gehören. Allen Steroiden gemeinsam ist die Grundstruktur, der gesättigte tetracyclische Kohlenwasserstoff Perhydrocyclopentanophenanthren (Gonan) (Abb. 1). Dieses Gonangerüst besteht aus vier miteinander verbundenen Ringen. Die einzelnen Kohlenstoffatome werden international mit Ziffern, die vier Ringe mit den Buchstaben A bis D gekennzeichnet (Abb. 1). In den meisten natürlich vorkommenden Steroiden sind die Ringe B und C sowie C und D *trans*-verknüpft. Die Verbindung zwischen A und B kann *trans*- oder *cis*-verknüpft sein. Biochemisch leiten sich die Steroide vom Cholesterol ab (Abb. 2). Die Zahl der Steroide mit bestimmten Funktionen und Aktivitäten ist groß. Sie unterscheiden sich in Anzahl und Lage von Doppelbindungen, Art, Zahl und Lage funktioneller Gruppen, sowie in der Konfiguration ( $\alpha$  oder  $\beta$ ) der Bindungen zwischen Substituent und Kern, denn das Grundgerüst besitzt sechs Asymmetriezentren.

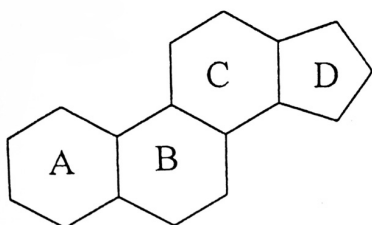


Abb. 1: Gonangerüst

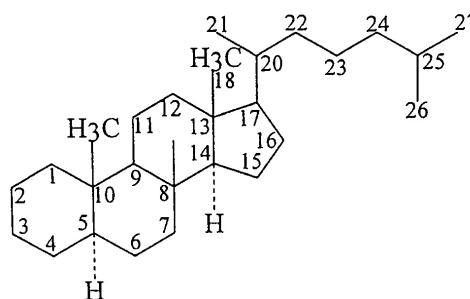


Abb. 2: Cholesterol

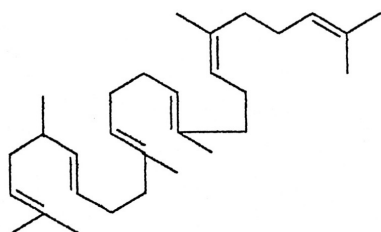
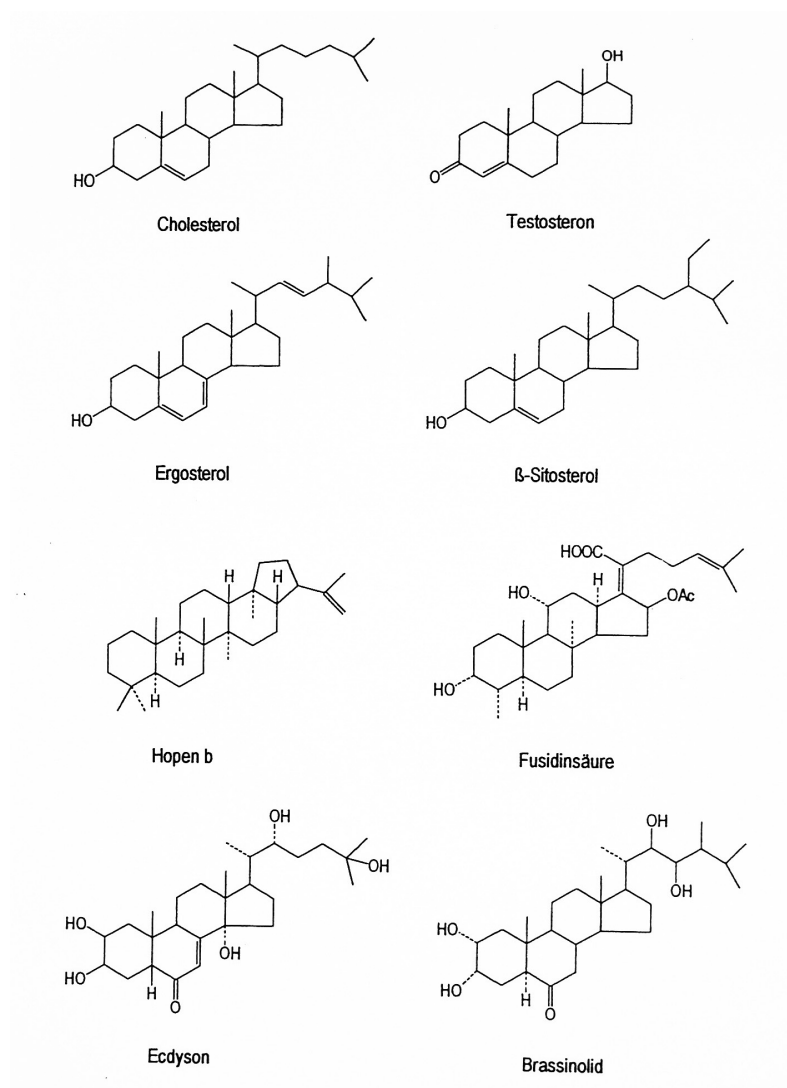


Abb. 3: Squalen



Das Squalen, ein Triterpen (Abb. 3), stellt sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten die Ausgangsverbindung für die Steroidbiosynthese dar. Wenn auch auf unterschiedlichen Wegen, werden hieraus in Vertebraten, Mikroorganismen und Pflanzen alle für die Entwicklung des Organismus erforderlichen Steroide synthetisiert. Lediglich die Insekten sind nicht in der Lage, aktiv das Sterangerüst aufzubauen. Sie sind daher auf pflanzliche Steroide angewiesen, die sie mit der Nahrung aufnehmen und ihren Bedürfnissen entsprechend transformieren (Heftmann, 1975). Nachfolgend sind einige ausgewählte natürliche Steroide und steroidale Verbindungen dargestellt



**Abb. 4: Übersicht einiger natürlicher Steroide und steroidaler Verbindungen**

## 2.2 Natürliches Vorkommen

Steroide und steroid-ähnliche Substanzen kommen überall in der Natur vor und sind in pflanzlichen, mikrobiellen und tierischen Organismen zu finden. Man teilt sie aufgrund ihrer Funktion und ihres Aufbaus in verschiedene Gruppen ein. Zu den wichtigsten Vertretern gehören die Sterole, die Steroidhormone und die Gallensäuren.

### 2.2.1 Sterole

Sterole sind in der Tier- und Pflanzenwelt weit verbreitet. Das wichtigste Sterol tierischer Herkunft ist das Cholesterin. Zusammen mit Phospholipiden nimmt es am Aufbau von Membranen und Myelinscheiden teil. Erst 1932 stand die Strukturformel von Cholesterin fest, die Totalsynthese gelang 1951. Es ist vor allem im Gehirn und Rückenmark konzentriert. Der menschliche Körper enthält ca. 300 g Cholesterin in freier Form oder als Fettsäureester; 1,4-3,3 g werden im menschlichen Blut gefunden. Daneben dient es im tierischen Organismus als Ausgangsmaterial für die Synthese von Steroidhormonen der Keimdrüsen, der Nebennierenrindenhormone, des Vitamin D und der Gallensäuren und nimmt somit eine zentrale Stellung im Steroidstoffwechsel ein. Außerdem ist es ein entscheidender pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der Arteriosklerose und Gallensteinen. Bei den Vertebraten sind neben dem Cholesterin als wichtigsten Vertreter noch weitere so genannte Zoosterole zu finden, wie z.B. das von Darmbakterien gebildete Koprostanol.

Weitere Sterole wurden auch bei Pflanzen und niederen Tieren gefunden, wobei allerdings die eigentlichen Phytosterole Stigmasterol und  $\beta$ -Sitosterol vornehmlich in höheren Pflanzen zu finden sind. Die Sterole aus niederen Pflanzen wie Algen und Pilze werden als Mycoesterole bezeichnet. Sie haben gegenüber den C-27 Zoosterinen eine Ergosteran-Reihe (C-28) oder zwei weitere Methylgruppen (Stigmasteran-Reihe, C-29) in der C-17-Seitenkette und meist noch weitere Doppelbindungen. Ergosterol (5,7,22-Ergostatrien-3 $\beta$ -ol, Provitamin D<sub>2</sub>), das erstmals aus Mutterkorn isoliert wurde (Tanret, 1989), ist als wichtigstes Mycoesterol in vielen Algen, Pilzen, Flechten und fetten Ölen zu finden und ist das Hauptsterin der Hefe, aus der es leicht zu gewinnen ist.

Stigmasterol (5,22-Stigmastadien-3 $\beta$ -ol) wurde ursprünglich aus der Calabar-Bohne isoliert, wird heute aber aus dem unverseiften Teil von Sojaöl gewonnen. Sitosterine

sind in Getreide enthalten,  $\beta$ -Sitosterol (Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol) im Weizenkeimöl. Campesterol (5-Ergoen-3 $\beta$ -ol) kommt zusammen mit Sitosterin und Sigmasterin als eine der Hauptkomponenten in der Sterinfraktion mehrerer Pflanzen- und Saatöle vor und wurde in Mollusken gefunden. In Algen ist neben Ergosterin noch das Fucosterol (5,24(28)-Sigmastadien-3 $\beta$ -ol) enthalten, das eine weitere Methylgruppe in der Seitenkette besitzt. Brassicasterol (5,22-Ergostadien-3-ol) kommt relativ häufig in der Sterinfraktion von Rapssaat- und Senfsaatöl vor. Phytosterine sind zu 0,3 % in Pflanzenölen zu finden und stellen bei einer Weltproduktion von 40 Mio. Tonnen Pflanzenöl (1982) ein Rohstoffpotential von etwa 120.000 Jahrestonnen dar. Natürliche Phytosterine können selbst als Gemische als Rohstoffe für die Herstellung von Steroidpharmaka genutzt werden.

Sterole sind seit langem auch in fast allen Mikroorganismen nachgewiesen (Carr et al., 1970, Schubert et al., 1964). Als Vorgänger der Sterole gelten heute die in Bakterien membranstabilisierend wirkenden Hopanoide (Ourisson et al., 1987; Kannenberg et al., 1996)

### 2.2.2 Gallensäuren

Bei den Gallensäuren handelt es sich um Abbauprodukte der Steroide. Sie besitzen in der C-17-Seitenkette eine Carbonylgruppe, die durch Oxidation in der Leber entsteht. Gallensäuren sind mit ihrem hydrophoben und dem hydrophilen Strukturanteil grenzflächenaktiv und zur Mizellenbildung befähigt. Sie spielen bei der Emulgierung und Verdauung von Fetten eine Rolle und erleichtern die Resorption vieler Arzneimittel. Sie aktivieren Lipasen, die wiederum eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Fetten spielen. Gallensäuren werden mit der Gallenflüssigkeit in den Darm abgegeben, pro Tag werden etwa 4 g Gallensäuren erzeugt. Bei Säugetieren kommen ausschließlich Cholsäurederivate vor. Ihre Synthese ist in der Leber lokalisiert, wobei die wichtigsten Vertreter die Taurin- und Glykolderivate der Cholsäure (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-Säure), die Desoxycholsäure (3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-5- $\beta$ -cholan-24-Säure) und die Cheno-Desoxycholsäure (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-5- $\beta$ -cholan-24-Säure) – ein Isomer der Desoxycholsäure – sind.

### 2.2.3 Vitamine

Ein weiterer für den Menschen wichtiger Steroidabkömmling ist das sogenannte Vitamin D, wobei es sich eigentlich um eine Vitamingruppe handelt (z.B. Vitamin D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> usw.). Man unterscheidet Calciferol (Vitamin D<sub>2</sub>), das den aktiven Bestandteil von Vitamin D-Präparaten darstellt und Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>, auch Ergocalciferol), das beim Menschen etwas besser wirkt als D<sub>2</sub>. Durch UV-Licht werden 5,7-Dihydrosterine (z.B. pflanzliches Ergosterin) im Organismus hauptsächlich in Prävitamin umgewandelt, das thermisch durch eine sigmatrope Umlagerung in Vitamin D (Calciferol) überführt wird. Nach 25-Hydroxylierung in der Leber und 1-Hydroxylierung in der Niere entsteht als Vitamin D<sub>3</sub>, die eigentlich aktive Form des Hormons, das sogenannte Vitamin-D-Hormon. Dieses bindet an verschiedene Rezeptoren und reguliert die Transkription zahlreicher Gene. Diese Vitamine sind lebensnotwendig für den Phosphat- und Calciumhaushalt, sowie für den Knochenstoffwechsel. Fischöle und Eigelb sind die besten Quellen für Vitamin D<sub>3</sub>, in geringen Mengen findet es sich in Milch und Butter.

### 2.2.4 Steroidhormone

Zu der Gruppe der Steroidhormone gehören unter anderem die lipophilen Signalstoffe Progesteron, Cortisol, Aldosteron, Testosteron und Estradiol, die in Säugern den Stoffwechsel, das Wachstum und die Reproduktion steuern (Karlson, 1983). Sie werden in verschiedenen Organen aus Cholesterin gebildet, wie z.B. in der Nebennierenrinde, dem Ovar, dem Corpus luteum, der Plazenta und dem Hoden. Progesteron und die Hormone der Nebennierenrinde gehören zu den C<sub>21</sub>-Steroiden. Sie leiten sich chemisch-systematisch vom Pregnan ab, einem Kohlenwasserstoff, der  $\beta$ -ständig eine Seitenkette von zwei C-Atomen trägt. Über weitere Umwandlungen entsteht hieraus das Progesteron, welches selbst den Ausgangsstoff für die überaus wichtigen Corticoide bildet. Durch verschiedene Oxygenasen (17-,21-,11-Oxygenase) erhält das Progesteron weitere Hydroxylgruppen. Über 17-Hydroxyprogesteron entsteht das Cortisol. Es übernimmt im Organismus verschiedene Aufgaben, z.B. im Bereich der Immun- und Entzündungsmodulation und steht mit vielen anderen Stoffwechselkreisen in Verbindung (Knochenstoffwechsel, Zuckerhaushalt, etc.).

Ein weiteres wichtiges Hormon der Nebennierenrinde ist das Aldosteron, das sich durch eine Aldehydfunktion in C<sub>18</sub> auszeichnet. Es reguliert als sogenanntes Mineralocorti-

coid den Wasserhaushalt des Organismus, es fördert die  $K^+$ -Sekretion in der Niere und die  $Na^+$ -Rückresorption. Die Sexualhormone (Androgene, Östrogene, Gestagene) sind verantwortlich für die Ausbildung der Geschlechtsorgane, der sekundären Geschlechtsmerkmale und für die Geschlechtsfunktion des tierischen und menschlichen Organismus. Die Androgene werden gewöhnlich als männliche Geschlechtshormone bezeichnet. Die wichtigsten unter ihnen sind das Testosteron, das Androsteron, das Androstendion und das Dihydrotestosteron. Sie sind unerlässlich bezogen auf ihre geschlechtsspezifische Wirkung wie z.B. Libido, Spermatogenese etc., aber auch bezogen auf ihre anabole Funktion wie z.B. Muskelmassenaufbau, Knochenstärke etc. Im weiblichen Organismus werden täglich ca. 0,3 mg/Tag produziert, hier steuern sie z.B. die weibliche Sekundärbehaarung. Die Östrogene sind wichtige Hormone im weiblichen Organismus. Neben verschiedenen Aufgaben wie der Ausbildung der weiblichen Geschlechtsmerkmale steuern sie die Hälfte des weiblichen Menstruationszyklus. Gestagene sind besonders wichtig zur Ausbildung und Aufrechterhaltung einer möglichen Schwangerschaft, sie regulieren ebenfalls den weiblichen Zyklus.

In Pflanzen findet man eine Reihe von Steroidhormonen, deren Aufgabe die Regulation der Sprossung und Blüte ist, wie z.B. Brassinosteroide und Curcubitacine (Russel, 1996; Jianming et al., 1996). Spinnen und Krebse (Arthropoden) bilden Ecdysteroide, die als eine Frühform der Steroide gelten. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Ecdyson. Es steuert die Entwicklung von Insekten wie z.B. Drosophila, indem es regulierend auf verschiedene Netzwerke einwirkt (Huet et al., 1993)

### **2.2.5 Steroidglykoside und andere natürliche Glykoside**

Die Cardenolide, die in Form herzwirksamer Glykoside starke Wirkung auf den Herzmuskel ausüben, regen in geringer Menge die Herztätigkeit an (positiv inotrop, negativ dromo- und chronotrop), in hoher Dosierung sind sie toxisch. Diese Substanzen kommen als Glykoside z.B. in verschiedenen Fingerhut-Arten (*Digitalis*), in afrikanischen *Strophantus*-Arten (*Apocynaceae*) oder im Orleander (*Nerium oleander*) vor. Bereits im Mittelalter ist die Giftigkeit des roten Fingerhutes, *Digitalis purpurea*, bekannt, seit ca. 20 Jahren wird *Digitalis* zur Herztherapie eingesetzt. Diese Steroide verbessern den Wirkungsgrad der Herzarbeit und werden in Form der Glykoside zur Herzinsuffizienztherapie eingesetzt, obwohl die enge therapeutische Breite problematisch ist.

## 2.3 Mineralisierung von Steroiden

Aufgrund fehlender Enzymsysteme sind Vertebraten nicht in der Lage, komplexe Kohlenstoffringsysteme, wie das Sterangerüst, aufzubrechen und vollständig abzubauen. Erst durch eine Reihe von Transformationsreaktionen und anschließende Bildung von Konjugaten wird die Wasserlöslichkeit der Ringsysteme erhöht. Dadurch wird eine Ausscheidung als Glucuronide und Sulfatester über die Galle oder Nieren ermöglicht. Der Abbau des Kohlenstoffgerüsts kann dagegen nun durch Enzyme bakterieller und einiger niederer eukaryotischer Organismen durchgeführt werden. Eine Vielzahl von Mikroorganismen ist in der Lage, Transformationen am Sterangerüst und dessen Seitenketten vorzunehmen, was für die pharmazeutische Industrie von großem Interesse ist (Vischer und Wettstein, 1958; Bortolini et al., 1997). Die Fähigkeit zum vollständigen Abbau des sehr energiereichen Grundgerüsts von polycyclischen Kohlenwasserstoffen, wie z.B. der Steroide, bleibt jedoch nur wenigen Bakterien vorbehalten (Talalay et al., 1952). Insbesondere Bodenorganismen, wie z.B. Clostridien, Pseudomonaden und als bekanntester Vertreter *Comamonas testosteroni*, sind dazu in der Lage, die komplexen Kohlenwasserstoffverbindungen als Kohlenstoff- und Energiequellen für den eigenen Stoffwechsel zu nutzen (Uwaijima et al., 1987; MacDonald et al., 1979; Marcus et al., 1956). Dabei bauen diese Organismen die energiereichen Ringsysteme durch eine Vielzahl von Enzymen bis zur Bildung ringfreier Carbonsäuren und CO<sub>2</sub> vollständig ab (Schubert, 1967). Eine entscheidende Bedeutung hat die Arbeit von Dioxygenasen, die eine oxidative Spaltung der Kohlenstoffringe bewerkstelligen (Eltis und Bolin, 1996; Harayama und Reki, 1989).

### 2.3.1 Steroidabbau beim Menschen

Aufgrund fehlender Enzyme können steroidale Verbindungen, wie z.B. Steroidhormone nicht vollständig abgebaut werden. Es erfolgt vielmehr eine Umwandlung unter Erhaltung des Ringsystems. Die Inaktivierung der Steroide erfolgt hauptsächlich in der Leber; aber auch in der Niere, Lunge, in den Gonaden und den meisten anderen Geweben sowie im Blut finden viele Umwandlungen und Konjugationen am Steroidgerüst statt.

Es sind folgende Hauptreaktionen bekannt, die für den Abbau steroidaler Verbindungen verantwortlich sind:

- A. Konjugatbildung: Bildung von Estern zwischen Steroiden und Schwefelsäure, Phosphorsäure, Sulfatidsäure, Essigsäure oder anderer Fettsäuren. Bildung von Glykosiden der Steroide mit Glucuronsäure oder Aldosen
- B. Hydrogenisierung im A-Ring
- C. Einführung von Hydroxy-Gruppen
- D. Umwandlung der Keto- und Hydroxyfunktionen durch Reduktion bzw. Oxidation
- E. Abspaltung der C-Atome 20 und 21 im Falle der C<sub>21</sub>-Steroide

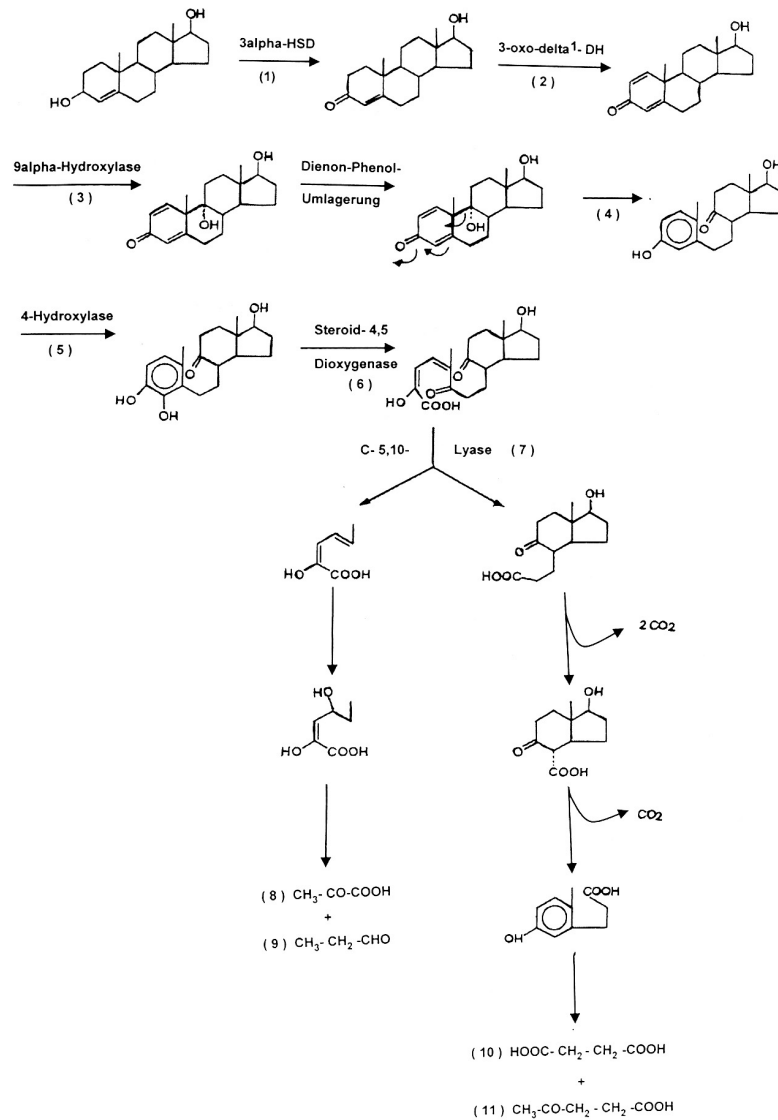
### 2.3.2 Mikrobieller Steroidabbau

Der mikrobielle Abbau von polycyclischen (aromatischen) Kohlenstoffverbindungen ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Für die meisten Verbindungen dieser Art sind die metabolisierenden Enzyme, entstehende Intermediate sowie Regulationsmechanismen bis im Detail bekannt (Lal et al., 1995; Chaudhry, 1994; Van der Meer et al., 1992).

Einige Organismen, insbesondere Pseudomonaden, werden aufgrund ihrer katabolen Eigenschaften bereits gezielt zum Abbau von komplexen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Kläranlagen oder kontaminierten Böden eingesetzt.

Der bakterielle Metabolismus der Steroide allerdings ist bis heute nur in Grundzügen erforscht. Durch Charakterisierung einiger am Abbau des Sterangerüsts beteiligter Enzyme und Nachweise der dabei entstehenden Intermediärprodukte kann ein vereinfachtes Schema der Steroid-Degradation, wie in Abb. 5, gezeigt aufgestellt werden. Von C<sub>27</sub>-, C<sub>21</sub>- oder C<sub>19</sub>-Körpern aus erfolgt der Abbau bis zur Bildung ringfreier Ketosäuren (Schubert et al., 1968). Der erste Schritt des Abbaus erfordert die Aromatisierung des A-Ringes (Levy und Talalay, 1959), um daraufhin die Öffnung des B-Ringes zu ermöglichen. Eine Voraussetzung für diese Ringspaltung ist die Oxidation der 3-Hydroxylgruppe am A-Ring. Diese Oxidation [1] wird durch eine 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\alpha$ -HSD) katalysiert (Shikita und Talalay, 1979; Boyer et al., 1965). Hydroxysteroid-Dehydrogenasen katalysieren nicotinamidnukleotid-abhängig die steroidspezifische Umwandlung von Hydroxyl- und Carbonylfunktionen, die sich an den

jeweiligen Positionen des Steroidgerüsts oder der Seitenkette befinden. Abb. 5 zeigt ein vereinfachtes Schema des bakteriellen Steroidabbaus (Träger, 1977).



**Abb. 5: Vereinfachtes Schema des bakteriellen Steroidabbaus. Verändert nach Träger 1977**

Im Weiteren wird durch eine 3-Oxosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase (Drobnic et al., 1993; Molnár et al., 1995) eine zusätzliche Doppelbindung in Ring A integriert [2]. Eine 9 $\alpha$ -



Hydroxylase fügt danach eine Hydroxylgruppe an Position C9 des Steroidgerüsts ein [3], was nach einer spontanen Dienon-Phenol-Umlagerung zur Öffnung des B-Ringes und der Bildung der sogenannten Secosteroide führt [4] (Leppik und Sinden, 1987; Wang und Sih, 1963). Nach einer weiteren Hydroxylierung am jetzt aromatischen Ring-A durch eine 4-Hydroxylase [5] kann eine Steroid-4,5-Dioxygenase die Spaltung des A-Ringes des Sterans zu einem Diseco-Steroid katalysieren [6] (Leppik, 1989; Gibson et al., 1966). Die Steroid-4,5-Dioxygenase ist eine Extradiol-Dioxygenase, die durch die Öffnung des Rings A in *meta*-Stellung zu den Hydroxylgruppen erreicht wird (vgl. 1.3). Schließlich werden die vom Ring A verbliebenen Reste durch eine C-5,10-Lyase abgetrennt [7] (Coulter und Talalay, 1968).

Ist, wie in Abb. 5 gezeigt, ein C<sub>19</sub>-Steroidkörper das Substrat, wird das entstandene 2-Hydroxy-hexa-2,4-Dienonat von Ring A hydratisiert und in darauf folgenden Reaktionen enzymatisch weiter zu Brenztraubensäure [8] und Propionaldehyd [9] gespalten. Diese Abbauprodukte können ihrerseits als Substrat in den Citratcyclus eingebracht und so für die Energiegewinnung nutzbar gemacht werden. Die Spaltprodukte aus den ehemaligen Ringen B, C und D werden in Folgereaktionen zu Bernsteinsäure [10], Lävulin-säure [11] und CO<sub>2</sub> metabolisiert. Damit sind aus dem C<sub>19</sub>-Steroid vier Moleküle CO<sub>2</sub>, zwei C<sub>3</sub>-Säuren, eine C<sub>4</sub>- und eine C<sub>5</sub>-Säure entstanden.

Die Expression steroidumwandelnder Enzyme steht unter der Kontrolle der zu metabolisierenden Steroide (Wacker et al., 1965). Eine besondere Rolle im Abbau von Steroiden in Mikroorganismen spielen hierbei die Dioxygenasen, die eine oxidative Spaltung der Kohlenstoffringe katalysieren (Eltis et Bolin, 1996; Harayama et Reikik, 1989).

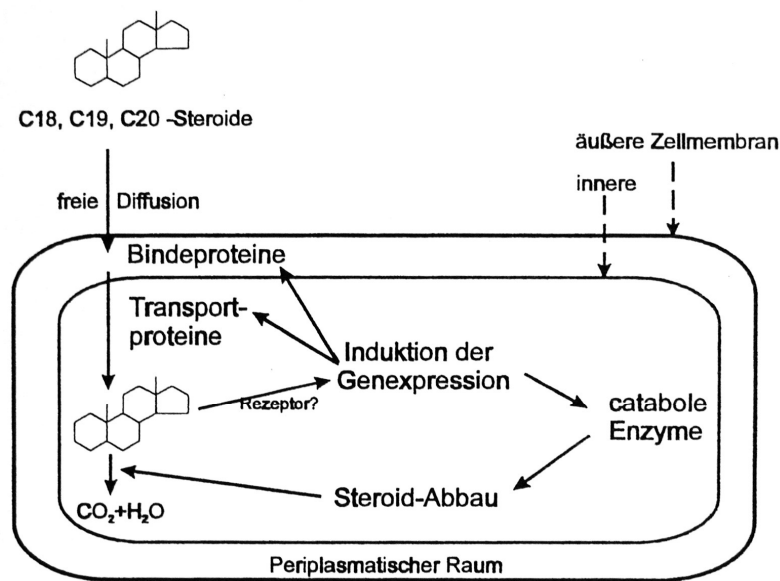
## 2.4 Transport und Bindung von Steroiden

Es konnte nachgewiesen werden, dass die starren und sehr hydrophoben Steroidmoleküle frei durch die äußere Membran von gram-negativen Bakterien diffundieren können. Im Vergleich zu normalen biologischen Membranen geschieht dies jedoch nur etwa halb so schnell. Die äußere Membran des Bakteriums *Comamonas testosteroni* besitzt allerdings eine höhere Permeabilität für Steroide als andere gram-negative Bakterien (Plesiat et Nikaido, 1992). Nach Passage der Zellwand werden Steroide im periplasmatischen Raum durch Proteine mit hoher Affinität gebunden, wobei allerdings nur C<sub>19</sub>-

und C<sub>21</sub>-Steroide weiter transportiert und metabolisiert werden (Watanabe und Watanabe, 1974; Watanabe und Po, 1974; Watanabe et al., 1976). Zwei der periplasmatischen Bindepoteine konnten näher charakterisiert werden (Watanabe et al., 1979). Beide binden verschiedene Androgene mit hoher Affinität, besitzen ähnliche Ladung, aber unterschiedliche Massen (30 bzw. 50 kDa), bzw. sedimentieren unterschiedlich in der Dichtegradientenzentrifugation (Thomas et al., 1989; Watanabe et al., 1979; Pousette und Carlström, 1984). Ein induzierbares Transportsystem in der Membran transloziert dann die Steroide in das Zellinnere (Watanabe et al., 1974).

Daneben gibt es auch mindestens eine membranassoziierte Bindungsaktivität sowie verschiedene nicht näher charakterisierte C<sub>21</sub>-steroidbindende Systeme im periplasmatischen Raum (Francis und Watanabe, 1982; Thomas et al., 1989; Watanabe et al., 1980). Periplasmatisch lokalisierte Enzymaktivitäten, löslich oder membranassoziiert, könnten die Steroide für die Bindung bzw. Transport in das Zellinnere vorbereiten. (Watanabe und Watanabe, 1974).

Für den Transport der derivatisierten Steroide besitzt *Comamonas testosteroni* spezifische Systeme. Eines dieser Systeme konnte identifiziert werden: Es ist spezifisch für 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron und Testosteron und besteht aus mehreren Komponenten. Dieses System transportiert die beiden Substrate aus dem periplasmatischen Raum in das Zellinnere. Bei diesem Vorgang konnten als messbare intrazelluläre Metaboliten Androstendion oder Androstandion nachgewiesen werden (Watanabe und Po, 1974). Dies legt den Schluss nahe, dass die 3 $\beta$ /17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, vorher bereits als membranassoziiert beschrieben, einen wichtigen Bestandteil dieses Transportkomplexes darstellt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung erhärtet, dass der Steroidtransport vollständig durch anti-3 $\beta$ /17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Antikörper hemmbar ist (Lefebvre et al., 1979 a, b).



**Abb. 6: Schema des Transportes der Steroidhormone in die Zelle und ihre Wirkung auf die Genexpression (verändert nach Oppermann, 1995)**

## 2.5 Comamonaden

Dem Genus der Comamonaden gehören vier verschiedene Bakterienstämme an: *Comamonas testosteroni*, *Comamonas acidovorans*, *Comamonas terrigena* und *Comamonas baltica*. In der vorliegenden Arbeit wurde das Bakterium *Comamonas testosteroni* verwendet. Die Bakterienstämme gehören mit anderen Pseudomonaden, methylotrophen Bakterien und Essigsäurebakterien zur beta-Gruppe der Proteobakterien (Stackebrandt et al., 1988), genauer werden sie dem *Acidovorans*-Cluster der rRNA-Superfamilie III zugeordnet (Madigan et al., 1997). Die Gruppe der Comamonaden zeichnet sich durch ein strikt aerobes, nicht-fermentativ und chemoorganotropes Stoffwechselverhalten aus (Willems et al., 1992). Die Morphologie zeigt gram-negative, polar oder bipolar begeißelte, nicht-pigmentierte, leicht gebogene Stäbchen mit einer Größe von 1-4 µm.

### 2.5.1 *Comamonas testosteroni*

*C. testosteroni* ist ubiquitär in der Natur zu finden und wurde erstmalig aus verschmutzten Böden und Seeschlamm isoliert (Marcus et Talalay, 1956). Damals wurde es noch

als *Pseudomonas testosteroni* bezeichnet, erst 1987 erfolgte durch Tamaoka et al. die Einteilung zur Gruppe der Comamonaden.

Das Bakterium *Comamonas testosteroni* stellt einen wichtigen Modellorganismus für die Untersuchung von steroid-metabolisierenden Enzymen dar (Marcus et al., 1956; Levy et al., 1959), da es sich durch die Fähigkeit auszeichnet, auf Nährböden mit den Steroidhormonen Progesteron und Testosteron als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen zu können. Diese Besonderheit unterscheidet ihn von den anderen *Comamonas*-Stämmen und hat ihm auch seinen Namen gegeben. Neben der Möglichkeit, Sterangerüste als Kohlenstoffquelle zu nutzen, kann *Comamonas testosteroni* ebenso einige nicht-steroidale Kohlenwasserstoffverbindungen verstoffwechseln. So wurde gezeigt, dass dieses Bakterium polychlorierte Biphenyle (PCBs) und andere aromatische und alicyclische Kohlenwasserstoffe abbauen und verwerten kann (Bergeron et al., 1994; Locher et al., 1989; Dagley et al., 1968).

Die Tatsache, dass *Comamonas testosteroni* Teil der physiologischen Darmflora (Barbro et al., 1987) und zugleich in der Lage ist, verschiedene xenobiotische sowie endogene steroidale Verbindungen zu verwerten, wirft die Frage nach seiner physiologischen Rolle im intestinalen Stoffwechsel dieser Substanzen auf. Der Beitrag von Darmbakterien wird oft vernachlässigt, wenn die Bioaktivierung oder -degradation von xenobiotischen Verbindungen betrachtet wird, obwohl ihre Rolle für verschiedene Verbindungen bewiesen ist (Kinouchi et al., 1993).

Die Mikroorganismen wurden aber auch aus klinischen Proben isoliert: Blut, Eiter, Urin, Pharynxabstrichen, Augen, Nieren, Sputum, Faeces und perforierten Appendices. (Gilardi, 1971; Ben-Tovim et al., 1974; De Vos et al., 1985; Gilardi, 1985). Die erste Isolierung aus klinischen Proben gelang 1956 (Galarneault et Leifson, 1956). *C. testosteroni* wird als opportunistisch pathogen eingestuft (Gilardi, 1985), so dass er auch als fakultativ humanpathogener Keim agieren kann. Besonders sind immunsupprimierte Patienten betroffen. Es wurden auch Infektionen an Venenverweilkathetern von Patienten festgestellt, die an malignen Tumoren leiden (Le Moal, G., 2001). Auch schwerwiegende Infektionen nach Perforation von Hohlorganen wurden beschrieben (Barbaro et al., 1987). Insgesamt ist die Anzahl der Infektionen durch Comamonaden gering, den-

noch werden wahrscheinlich viele Infektionen verkannt und auf andere gram-negative, aerobe Stäbchen zurückgeführt.

Weiterhin stellt *Comamonas testosteroni* eines der wichtigsten und interessantesten prokaryontischen Modelle für die Untersuchung von Ursprung und Evolution der Steroidhormonwirkung dar, welches durch die bereits erwähnten Komponenten Steroidtransport, -bindung und -induktion starke Ähnlichkeiten mit dem eukaryontischen Steroidhormon-Signalweg aufweist (Poussette et al., 1986).

### 2.5.2 Verwertung steroidal Kohlenstoffquellen

Es konnte gezeigt werden, dass der Stamm der Comamonaden in der Lage ist, auf Aminosäuren, Peptonen und einigen organischen Säuren zu wachsen (Holt et al., 1994), während ein Wachstum auf Glucose oder 2-Ketogluconat nicht möglich ist (Wettermark et al., 1979). Dies ist bedingt durch ein Fehlen der für den Glucosestoffwechsel wichtigen Enzyme, wie der Glucose-Dehydrogenase und der Glukokinase. *C. testosteroni* und *Comamonas terrigena* können im Unterschied zu *Comamonas acidovorans* und *Comamonas baltica* auch nicht auf Mannitol und Fructose wachsen. Das Besondere dieser Bakterienstämme ist ihre Fähigkeit, Sterole und aromatische Kohlenwasserstoffe als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. So wächst *C. testosteroni* auf Testosteron (Talalay et al., 1952), Imidazolpropionat und Imidazolyl-Lactat (Coote et Hassal, 1973), p-Kresol (Dagley et Parel., 1988), Fumarat, Bromosuccinat, Anthranilat und Naphtalen (Garcia-Valdes et al., 1988) als einzigen Wachstumsquellen. Zusätzlich wurden auch Aktivitäten im Bereich des Nicht-Steroid-Stoffwechsels beschrieben, z.B. der Abbau von aromatischen Hydrocarbonsäuren in verschiedenen Stämmen von *Pseudomonas testosteroni* und *Comamonas testosteroni* (Sondossi et al., 1992; Barriault et Sylvestre, 1993; Busse et al., 1992; Braun Howland et al., 1993; Ahmand et al., 1990; Pettigrew et al., 1990; Hollender et al., 1994).

### 2.5.3 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase (3 $\alpha$ -HSD/CR)

*Comamonas testosteroni* ist für die Mineralisierung steroidal Kohlenstoffquellen enzymatisch umfassend ausgestattet. 1979 isolierten Shikita und Talalay eine 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Comamonas testosteroni* mit einer Masse von 25 kDa. In neueren Untersuchungen konnte aus dem *Comamonas testosteroni*-Stamm

ATCC 11996 eine 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\alpha$ -HSD) mit einem Molekulargewicht von 28 kDa isoliert und charakterisiert werden. Lokalisiert ist dieses Protein im Cytoplasma der Bakterienzelle (Oppermann und Maser, 1996). Dabei ist die 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ein zentraler Regulationspunkt für den Steroidmetabolismus in *Comamonas testosteroni*. Sie wurde auch in Eukaryonten (Cheng et al., 1991) und in Prokaryonten wie z.B. *Clostridium perfringens* (MacDonald et al., 1976), *Eubacterium species* (Mallonee et al., 1995; MacDonald et al., 1979) und *Pseudomonas putida* (Uwajima et al., 1978) identifiziert. Die 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase initiiert den kompletten Abbau des Steroidgerüsts, indem sie das Steroidgerüst für die Ringspaltung durch Dioxygenasen vorbereitet. Dabei scheinen die Gene der Enzyme für den Steroidabbau in Clustern vorzuliegen und gemeinsam reguliert zu werden (Molnar et al., 1995). Molekulare Analysen eines entsprechenden Genfragments weisen darauf hin, dass das Gen der 3 $\alpha$ -HSD (*hsdA*) am Anfang eines Steroidabbau-Operons liegt. Die an der Regulation der *hsdA*-Expression beteiligten *cis*- und *trans*-regulatorischen Faktoren wurden bereits identifiziert (Maser et al., 2000).

Alle Faktoren, die für die Verwertung des Steroidgerüsts als Energie- und Kohlenstoffquelle nötig sind, werden in *Comamonas testosteroni* nicht konstitutiv exprimiert, sondern nur nach Induktion durch ihr Substrat, wie z.B. Testosteron und Progesteron (Möbus et al., 1997; Oppermann et Maser 1996; Marcus et Talalay, 1956). Die Induzierbarkeit dieses Stoffwechselweges ermöglicht *Comamonas testosteroni* nicht nur eine schnelle Adaptation an wechselnde Substratangebote seiner Umwelt, sondern verleiht diesem Bakterium auch eine Schutzfunktion gegenüber natürlichen und synthetischen, potentiell toxischen Verbindungen. So wurde gezeigt, dass durch eine Induktion mit dem vertebraten Steroidhormon Testosteron eine 5-fach höhere Resistenz gegen das Steroid-Antibiotikum Fusidinsäure des Pilzes *Fusidium coccineum* erreicht werden konnte (Oppermann et al., 1996). Ebenso wurde die Carbonylreduktion xenobiotischer Verbindungen als Konsequenz der erhöhten Expression der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase induziert. Die 3 $\alpha$ -HSD in *C. testosteroni* wurde in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Testosteroninduktion identifiziert (Möbus et al., 1997). Das codierende Gen der 3 $\alpha$ -HSD (*hsdA*) wurde auf einem 5257 bp *EcoRI*-Fragment auf chromosomaler DNA von *C. testosteroni* lokalisiert (Möbus et al., 1999). Nach Klonie-

nung und Sequenzierung von *hsdA* und Überexpression der 3 $\alpha$ -HSD in *Escherichia coli* (*E. coli*) konnte in nachfolgender enzymatischer und biochemischer Charakterisierung das Genprodukt als 3 $\alpha$ -HSD identifiziert werden (Maser et al., 2000, Möbus et al., 1998). Dabei zeigt die rekombinanten 3 $\alpha$ -HSD die gleichen Reaktionen wie sie für das aus *C. testosteroni* gereinigte Wildtyp-Enzym beschrieben wurde (z.B. die Oxoreduktion am C3-Atom bei verschiedenen steroidalen Verbindungen und die Reaktion nicht-steroidaler Carbonylverbindungen). Aufgrund der variablen Substrate wird dieses Enzym vollständig 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase (3 $\alpha$ -HSD/CR) genannt. Durch seine Beteiligung am Abbau von toxischen Substanzen trägt es auch zum Schutz von *C. testosteroni* bei (Oppermann et al., 1996). Seine Induzierbarkeit erhöht auch seine Resistenz gegenüber toxischen Substanzen wie z.B. dem Insektizid NKI 42255 (Oppermann et al., 1996). *hsdA* ist 774 bp lang, die daraus abzuleitende Sequenz von 258 Aminosäuren entspricht einer Molekularmasse von ca. 26,4 kDa. Vergleichende Analysen mit anderen Enzymen ergaben, dass die 3 $\alpha$ -HSD/CR ein neues Mitglied der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily) ist (Möbus et Maser, 1996). Bisher konnten in der Familie der SDR nur tetramerische Enzyme identifiziert werden. Mit Hilfe chromatographischer Reinigung konnte das Enzym als Dimer mit einem Gewicht von 59,4 kDa eluiert werden (Maser et al., 2000).

## 2.6 Aufgabenstellung

Während der Abbau der Steroide zumindest teilweise aufgeklärt wurde, ist über die genaue intrazelluläre Umsetzung der Steroide zum Signal für die Expression der zugehörigen Gene nur wenig bekannt. Dabei ist es von großem Interesse, ob die Induktion der Steroidantwort in dem Bakterium auf genetischer Ebene nach einem ähnlichen Schema abläuft wie die Antwort in Eukaryonten, wo durch Rezeptor-Proteinbindung des Hormons und folgende Bindung dieses Komplexes an regulatorische DNA-Abschnitte eine spezifische Transkription bestimmter Genabschnitte erreicht wird (Karlsson, 1983; Beato, 1989). Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil des Teilprojektes B8 des Sonderforschungsbereichs 395 der Philipps-Universität Marburg, der sich mit der „Interaktion und katalytischen Fähigkeiten von Bodenorganismen“ befasst. In dem Teilprojekt B8 unter der Leitung von Professor Dr. E. Maser wird die „Molekulare Regulation der

Verwertung von Bodensteroiden als Kohlenstoffquelle durch *Comamonas testosteroni*“ untersucht.

Ziel der geplanten Untersuchung ist daher, einen Beitrag zur Aufklärung der Signaltransduktionskette, die zur Expression steroid-metabolisierender Enzyme führt, zu liefern. In früheren Untersuchungen wurde sowohl das Gen der 3 $\alpha$ -HSD (*hsdA*) als auch wichtige *trans*- und *cis*-regulatorische Elemente der *hsdA*-Expression identifiziert. Da die 3 $\alpha$ -HSD als Initiator des Steroidabbaus gilt, indem sie das Steroidgerüst für die Ringöffnung durch weitere Enzyme vorbereitet, konzentrierten sich zunächst alle Untersuchungen auf die Aufklärung ihres Regulationsmechanismus. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde beim Screening einer *C. testosteroni* Gen-Bank mit einer homologen Oligonukleotidsonde für das 3 $\alpha$ -HSD-Gen im Southern Blot ein hybridisierendes 5275 bp *EcoRI* erkannt, kloniert und sequenziert. Neben der Erstellung der Primärstruktur der 3 $\alpha$ -HSD auf Basis der Basensequenz des 3 $\alpha$ -HSD-Gens wurde das Fragment in den Vektor pUC 18 kloniert und in *E. coli* transformiert. In den transformierten Zellen konnte die Expression der 3 $\alpha$ -HSD in *E. coli* spezifisch nachgewiesen werden. Das klonierte Fragment enthält neben der Gensequenz der 3 $\alpha$ -HSD zwei weitere enzymcodierende Gene und vier offene Leserahmen.

Ziel meiner Arbeit bestand in der Untersuchung der Funktion bestimmter regulatorischer Elemente der 3 $\alpha$ -HSD. Dazu wurden so genannte Suicide Plasmid hergestellt, die schrittweise bestimmte regulatorische Genabschnitte im Bereich der 3 $\alpha$ -HSD zerstören sollten. Hierzu wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, um die Integration dieser Plasmide zu vollziehen. Um die erfolgreiche Integration der Plasmide in die chromosomale DNA von *C. testosteroni* zu beweisen, wurden folgende Methoden verwendet: Die Polymerasekettenreaktion (PCR), der kulturelle Nachweis über Antibiotikaresistenzen und der Southern Blot. Anschließend wurde die Aktivität der 3 $\alpha$ -HSD-Expression mittels eines speziell hierfür entwickelten ELISA ermittelt. Dadurch sollten weitere Erkenntnisse in der Aufklärung des Regulationsmechanismus gewonnen werden.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Abkürzungen

Abb.	=	Abbildung
ATCC	=	American Tissue Culture Collection
bp	=	Basenpaare
<i>C. test.</i>	=	<i>Comamonas testosteroni</i>
DIG	=	Digoxigenin
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleid acid)
dNTP	=	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	=	Doppelstrang-DNA
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EMSA	=	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EtOH	=	Ethanol
HPLC	=	Hochleistungschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
kb	=	Kilobasen
PBS	=	Phosphat, NaCl-Puffer (phosphate buffered saline)
PCR	=	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
rpm	=	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
SAP	=	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	=	Natrium(sodium)dodecylsulfat
SSC	=	Natrium(sodium)chlorid-Natrium(sodium)citrat
Tab.	=	Tabelle
TAE	=	Tris/HCl, Acetat, EDTA-Puffer
TE	=	Tris/HCl, EDTA-Puffer
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	=	Unit(s)
UV	=	Ultraviolett
v/v	=	Volumen pro Volumen
w/v	=	Gewicht pro Volumen

### 3.2 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

- Elektrophorese: – Horizontale Submersapparaturen für die Agarosegelelektrophorese (Institutswerkstatt, Marburg, D)
- Extinktionsmessungen: – Spektralphotometer DU<sup>®</sup>-62 Spectrophotometer (Beckmann, München, D)  
– Uvikon Spectralphotometer 930 (Kontron, Echin)
- Hybridisierung: – Hybridisierungsofen Hybaid Mini Oven (MWG-Biotech, Ebersberg, D)  
– Hybridisierungsröhrchen Hybaid HB-OV-BM (MWG-Biotech, Ebersberg, D)
- PCR: – Thermocycler Hybaid Omn-E (MWG Biotech, Ebersberg, D)
- Photoanlage: – Image Master (Pharmacia Biotech, Freiburg, D)
- Transformation: – *E.coli* Pulser (Bio-Rad, München, D)
- Zentrifugation: – Eppendorf Zentrifuge 3200 (Eppendorf, Hamburg, D)  
– Heraeus Sepatech Biofuge 13 (Heraeus, Ostende, D)
- Zellzüchtung: – Schüttelinkubator Rosi 1000<sup>TM</sup> (Thermolyne, Smithfield, Australia)  
– Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, D)

### 3.3 Chemikalien und Materialien

Die in der Arbeit verwendeten Substanzen und Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

AGS, Heidelberg (Deutschland):

Molekularbiologische Enzyme, Antibiotika Kanamycin und Ampicillin

AMERSHAM LIFE SCIENCE, Ohio, USA:

Agarose

AMERSHAM Pharmacia biotech, Braunschweig (Deutschland):

Hybond N<sup>+</sup>-Nylon Transfer Membran

APPLICHEM, Darmstadt, Deutschland

Agar

BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim (Deutschland):

NBT, X-Phosphat, Blocking Reagenz, Anti-Dioxigenin-Antikörper-AP, ABTS-Substrat

BIOLAB, Beverly Maryland, USA:

Vent-proof-reading Polymerase, *Taq*-Polymerase, 1 kb-Marker, molekularbiologische Enzyme (Restriktionsenzyme, Ligationsenzyme)

BIOMETRA, Göttingen (Deutschland):

Whatmann 3MM Papier, Ethidiumbromid

DAKO, Denmark:

Porc-anti-rabbit- Anitbody, peroxidase conjugated

MBI, Heidelberg, Deutschland:

Molekularbiologische Enzyme (Restriktionsenzyme, Ligationsenzyme)

E. MERCK, Darmstadt (Deutschland):

Standard I Nährbouillon, Agar, Maleinsäure, Calciumchlorid, Serva Elektrophoresis Dialysierschlauch Visking<sup>®</sup> und Servapor<sup>®</sup>

MWG, Ebersberg (Deutschland):

Oligonukleotide

ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim, Deutschland:

NBT, X-Phosphat, Blocking Reagenz, DNA-Längenstandard II DIG, Anti-Digoxigenin-Antikörper-AP (Farb-Fragment), CSPD<sup>®</sup>, Restriktionsenzyme, DNA-5'- Endlabeling Kit

ROTH, Karlsruhe (Deutschland):

Roti-Quant®

QIAGEN, Hilden (Deutschland):

Plasmid Midi Kit

SIGMA, Deisenhofen, Deutschland:

Acrylamid-Lösung, TEMED

### 3.4 Bakterienstämme und Plasmide

#### 3.4.1 Bakterien

*Escherichia coli* diente als Wirtstamm für die rekombinanten Plasmide pK18, pUC18/19 und pBBRIMCS-2.

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
<i>Comamonas testosteroni</i>	Wildtyp ATCC 11996	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
<i>Escherichia coli</i>	HB101	Promega

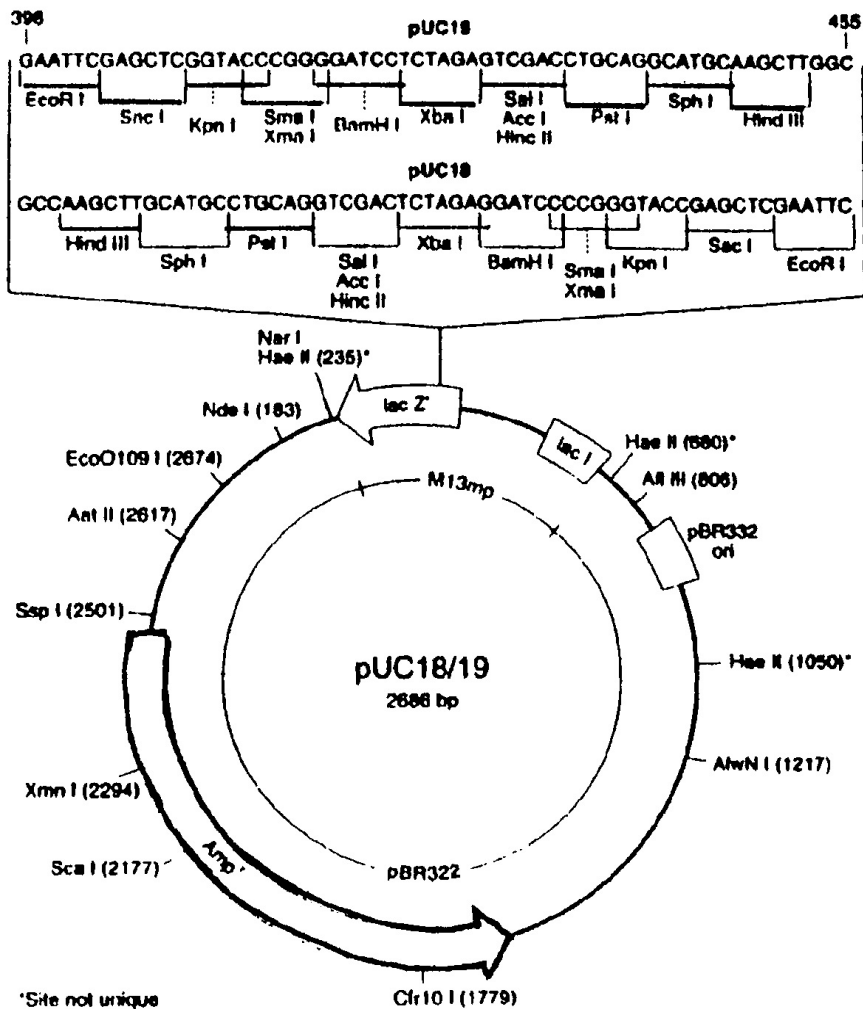
#### 3.4.2 Plasmide

Zentraler Bestandteil jedes Klonierungsexperiments ist der Klonierungsvektor, der das Gen in die Wirtszelle transportiert und dort für seine Vermehrung sorgt. Ein DNA-Molekül, das als Klonierungsvektor dienen soll, muss mehrere Eigenschaften besitzen. Es muss in der Lage sein, sich in der Wirtszelle zu vermehren (zu replizieren), so dass viele Kopien des rekombinanten DNA-Moleküls gebildet und an die Tochterzelle weitergegeben werden. Außerdem muss ein Klonierungsvektor relativ klein sein; im Idealfall liegt seine Größe unter zehn Kilobasen (kb), denn größere Moleküle brechen beim Reinigen leicht auseinander und sind auch sonst schwieriger zu handhaben. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich so genannte Plasmide verwendet. Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle, die in der Bakterienzelle ein eigenständiges Dasein führen. Fast immer enthalten sie ein oder zwei Gene, die häufig für eine nützliche Eigenschaft der betreffenden Bakterienzelle verantwortlich sind. So geht beispielsweise die Fähigkeit von Bakterien, in normalerweise tödlichen Konzentrationen von Antibiotika wie Chloramphenicol oder Ampicillin zu überleben, häufig auf ein Plasmid zurück, das Gene für die Antibiotikaresistenz trägt. Solche Antibiotikaresisten-

zen dienen im Labor häufig als selektive Marker: Sie sorgen dafür, dass alle Bakterien in einer antibiotikahaltigen Kultur ein bestimmtes Plasmid enthalten. Jedes Plasmid besitzt mindestens eine DNA-Sequenz, die als Replikationsstartpunkt (origin of replication) wirken kann. Deshalb kann es sich in der Zelle unabhängig vom Bakterienchromosom vermehren. Kleinere Plasmide bedienen sich der zelleigenen DNA-Replikationsenzyme, um Kopien von sich selbst herzustellen. Größere Typen enthalten dagegen in einigen Fällen Gene für besondere Enzyme, die spezifisch für die Replikation des Plasmids sorgen. Plasmide mancher Typen könne auch replizieren, indem sie sich in das Bakterienchromosom integrieren. Solche integrierbaren, als Episomen bezeichneten Plasmide können in dieser Form stabil über viele Zellteilungen hinweg erhalten bleiben, aber irgendwann liegen sie als unabhängige Elemente vor. Die Tatsache, dass Plasmide sich in die chromosomale DNA einer Bakterienzelle integrieren können, liegt den Experimenten dieser Arbeit zugrunde.

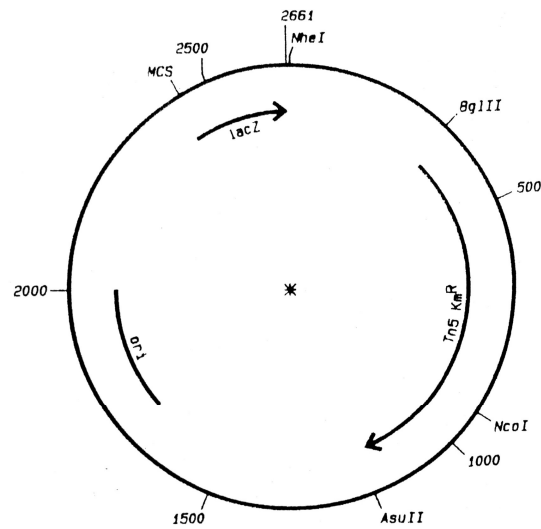
Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
pUC18	2.686 bp Klonierungsvektor, Ap <sup>R</sup>	Amersham Pharmacia Biotech
p6	pUC18 mit 5.257 kb <i>EcoRI</i> Fragment	von <i>C. testosteroni</i>
pK18	2.661 bp Klonierungsvektor, Km <sup>R</sup>	Ciba Geigy AG, Department of Biotechnology, Basel
pBBR1MCS-2	5.144 bp Klonierungsvektor, Km <sup>R</sup>	Kovach et al., 1995
pK1a	pK18-Derivate mit PCR-Insert (104 bp)	Diese Arbeit
pK1b	pK18-Derivate mit PCR-Insert (104 bp)	Diese Arbeit
pK2	pK18-Derivate mit PCR-Insert (110 bp)	Diese Arbeit
pK3	pK18-Derivate mit PCR-Insert (109 bp)	Diese Arbeit
pK5	pK18-Derivate mit PCR-Insert (110 bp)	Diese Arbeit
pK6	pK18-Derivate mit PCR-Insert (100 bp)	Diese Arbeit
pBBAX7	pBB21B verdaut mit <i>XbaI</i> und <i>AvrII</i>	Xiong
pKAN12	pK18-Derivat mit dem <i>lacZ</i> -Promotor stromabwärts von <i>orf2</i>	Xiong

pKAN10	pK18-Derivat mit dem <i>lacZ</i> -Promotor stromabwärts von <i>orf2</i>	Xiong
pK5n	pK18-Derivat mit 5nt-Deletion von <i>p6</i>	Xiong



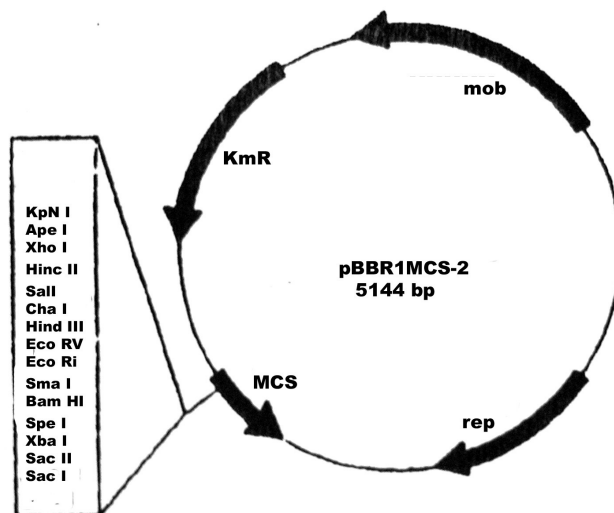
**Abb. 9: Restriktionskarte von pUC18/19 (Ampicillinresistenz, *lacZ*-Promotor, *ori*)**

Der pUC18/19-Vektor ist ein „high copy number“-Vektor für *E. coli*. Er ist 2686 bp groß und besitzt eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin. Die Anzahl der kopierten Plasmide beläuft sich bei diesem Vektor auf ca. 80-120 pro Zelle. Außerdem enthält er den *lacZ*-Promotor. Eine Restriktionskarte des Vektors zeigt Abb. 9.



**Abb. 10: Restriktionskarte von pK18 (Kanamycinresistenz, lacZ-Promotor, ori)**

Der pK18-Vektor ist ein „high copy number“-Vektor mit einem Kanamycinresistenzgen. Die Anzahl der kopierten Plasmide beträgt 80-120 pro Zelle. Er besteht aus Teilen des pUC18/19-Vektors (238-1565 bp; Yanisch-Perron et al., 1985) und des BRNeo-Vektors (1330 bp; Southern et Berg, 1982).



**Abb. 11: Restriktionskarte des Vektors pBBR1MCS-2**

Der Vektor pBBR1MCS-2 von Kovach (Abb. 11) wurde hergestellt aus dem Plasmid pBBR1MCS, hat eine Größe von 5144 bp und weist das Resistenzgen für Kanamycin auf. Er enthält 15 einzelne Klonierungstellen innerhalb des *lacZ*-Gens (Kovach et al., 1994), ist relativ stabil (in vitro länger als 10 Tage, in vivo länger als vier Wochen ohne antibiotische Selektion (Elzer et al., 1995)). Da der ursprüngliche Vektor nur eine Chloramphenicolresistenz aufweist und die meisten gram-negativen Bakterien chloramphenicolresistent sind, wurden vier neue Vektoren mit unterschiedlichen Antibiotikaresistenzgenen generiert: Kanamycinresistenz (Km<sup>®</sup>), Ampicillinresistenz (Ap<sup>®</sup>), Tetracyclinresistenz (Tc<sup>®</sup>) und Gentamicinresistenz (Gm<sup>®</sup>). In dieser Arbeit wurde nur der Vektor pBBR1MCS-2 mit einer Kanamycinresistenz verwendet. Dieser Vektor ist im Gegensatz zu pK18 in der Lage, sich sowohl in *C. testosteroni* als auch in *E. coli* zu replizieren (1-5 Plasmide pro Zelle).

### 3.5 Mikrobiologische Techniken

#### 3.5.1 Sterilisation

Bei allen mikrobiologischen Arbeiten wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien für 20 min bei 121°C und 1 kg/cm<sup>2</sup> Überdruck dampfsterilisiert. Thermolabile Substanzen wurden sterifiltriert, Glaswaren wurden mindestens 3 Stunden bei 140°C hitzesterilisiert.

#### 3.5.2 Wachstumsbedingungen

*C. testosteroni* wurde bei seiner optimalen Wachstumstemperatur von 30°C gut durchlüftet kultiviert, *E. coli* unter Standardbedingungen bei 37°C. Die Inkubationszeiten wurden entsprechend den Experimenten variiert und sind jeweils angegeben. Für Flüssigkulturen wurden Erlenmeyerkolben verwendet, die in einem Schüttelinkubator bei 180 rpm inkubiert wurden.

#### 3.5.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 595 nm bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass einer OD<sub>595</sub> von eins eine Zellzahl von ungefähr  $1 \times 10^9$  Zellen entspricht.



### 3.6 Medien und Antibiotika

#### 3.6.1 Medien

Standard-I-Nährbouillon (SIN-Medium): 2,5 % (w/v) in H<sub>2</sub>O

Das SIN-Medium wurde als Vollmedium verwendet, wobei jeweils 25 g pro Liter Wasser eingewogen wurden. Die aeroben Bakterienkulturen von *Comamonas testosteroni* Amp<sup>R</sup> ATCC 11996 und *Escherichia coli*-Derivaten wurden gut durchlüftet bei 30°C (*C. testosteroni*) bzw. 37°C (*E. coli*) in einem Schüttelinkubator bebrütet. Die Bakterien wurden in SIN-Medium ohne bzw. je nach Versuch zusätzlich mit Antibiotika kultiviert. Für feste Medien wurden vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro Liter Medium plus die jeweils erforderlichen Antibiotika zugefügt. Größere Kulturen wurden aus 3 ml Vorkulturen angeimpft. Für die Langzeit-Kryokonservierung wurden die Bakterien als Glycerol-Stocks bei -80°C eingefroren. Hierzu wurden 1 ml Bakteriensuspensionen nach Zentrifugation für 30 sec bei 13000 rpm 3x mit 0,5 ml 0,1M CaCl<sub>2</sub> gewaschen und mit 0,85 ml CaCl<sub>2</sub> und 0,15 ml sterilem Glycerol 87 % versetzt. Die Suspension wurde langsam von 4°C bis -80°C heruntergekühlt.

#### 3.6.2 Antibiotika

Die folgenden Substanzen wurden als konzentrierte Stammlösung angesetzt und sterilfiltriert. Sie wurden bei Bedarf den autoklavierten und auf ca. 50°C abgekühlten Medien zugesetzt.

Substanz	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml	30-60 µg/ml
Kanamycin	H <sub>2</sub> O	200 mg/ml	30 µg/ml

### 3.7 Molekularbiologische Methoden

#### 3.7.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit dem Detergenz SDS nach Birnboim und Doyl (1979). Dieses stark anionische Detergenz öffnet bei hohem pH die bakterielle Zellwand und denaturiert chromosomale DNA und Proteine; Plasmid-DNA hingegen verbleibt im Überstand. Diese alkalische Lösung zerstört vollständig die Basenpaarungen, die geschlossenen zirkulären Stränge

der Plasmid-DNA dagegen bleiben verschont, da sie ineinander stark verschlungen sind. Die Intensität und die Dauer, mit der die DNA den OH<sup>-</sup> Ionen ausgesetzt ist, sollten so groß sein, dass Einzelstränge der Plasmid-DNA wieder zusammenfinden, wenn der pH-Wert wieder im Neutralen liegt.

Die bakteriellen Proteine, die aufgebrochenen Zellwände und denaturierte DNA werden in großen Komplexen mit Dodecylsulfat ummantelten Komplexen aufgefangen. Diese Komplexe können dann präzipitiert werden, wenn Natriumionen durch Kaliumionen ausgetauscht werden (Horowicz and Burk 1981). Das denaturierte Material wird durch Zentrifugation entfernt und die Plasmid-DNA aus dem Überstand gewonnen.

### 3.7.1.1 Mini-Präparation

Für die Präparation von Plasmid- DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präparation) wurden die entsprechenden Plasmide in 1,5 ml SIN-Medium mit Antibiotikazusatz (Kanamycin 30µg/ml) bei 37°C amplifiziert. Nach dem Abzentrifugieren der Kulturen (1 min bei 13000 rpm) wurden die Pellets in 100 µl Puffer 1 (1) vollständig resuspendiert. Durch die Zugabe von 100 µl Puffer 2 (2) wurden die Zellen lysiert und die Proteine denaturiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 100µl Puffer 3 (3) hinzugefügt und damit die Proteine gefällt. Nach 1 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der klare Überstand abgenommen und mit Phenol und Chloroform zur Plasmid-DNA-Fällung versetzt. Nach der Zugabe von 1/20 Vol. 5 M NaCl und 2 Vol. 100 % Ethanol wurde für 10 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend konnte die Plasmid-DNA in 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und nach dem Trocknen in 50 µl TE-Puffer aufgenommen werden.

Lösungen:

- (1) Puffer 1 50 mM Tris/HCl, pH 8.0  
10 ml EDTA  
100 µg/ml RibonukleaseA
- (2) Puffer 2: 200 mM NaOH,  
2 % SDS
- (3) Puffer 3: 3 M Kaliumacetat, pH auf 5,5 mit Eisessig einstellen
- (4) TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

### 3.7.1.2 Midi-Präparationen

Midi-Präparationen aus 50 ml Ansätzen wurden nach dem Protokoll des Midi-Kits mit Tip-100-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) angefertigt: Nach Abzentrifugation der Kultur (10 min bei 3500 rpm) wurden alle Schritte wie in der Mini-Präparation mit 4 ml des jeweiligen Puffers wiederholt. Die Tip-100-Säulen wurden mit 3 ml Buffer QBT vorbereitet und der Ansatz über einen Papierfilter auf die Säulen gegeben. Anschließend wurden die Säulen mit 2 x 10 ml QC-Lösung gewaschen. Mittels des QF-Puffers (5 ml) wurde die DNA aus der Säule eluiert und in 4 ml Isopropanol aufgenommen. Nach Abzentrifugation (10 min bei 3500 rpm) und Waschen des Pellet mit 3 ml Ethanol 70 % wurde erneut abzentrifugiert für 5 min bei 3500 rpm. Das Pellet konnte schließlich in 400 µl TE- Puffer aufgenommen werden. Zur Überprüfung der Plasmide wurde nach dem Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen eine Gelelektrophorese mit 0.7 oder 1.5 %-iger Agarose (UBS) durchgeführt. Zum Größenvergleich der Fragmente wurde ein 1kb-Marker mitgeführt, der eine Aufteilung in folgende Fragmente erkennen ließ: 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3,5 kb, 3 kb, 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1,0 kb, 0,75 kb, 0,5 kb, 0,25 kb.

### 3.7.2 Präparation genomischer DNA

Genomische *Comamonas testosteroni*-DNA wurde mit 1 ml SIN-Medium bei 30°C im Schüttelinkubator bei 180 rpm über Nacht inkubiert. Zunächst wurde die Bakterienkultur in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen für 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert und in 400 µl TE-Puffer + 1 % SDS resuspendiert und 10 min bei 37°C inkubiert. Zur Deproteinierung wurden dann 150 µl Phenol zugegeben und gut gemischt und nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur für 2-3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und 2 x mit 150 µl Chloroform gewaschen. Die präzipitierte DNA wurde mit 2x Vol. 100 % EtOH und 1/20 Vol. 5 M NaCl gefällt und nach 10 min Zentrifugieren mit 70 %-igem EtOH gewaschen, bei Raumtemperatur für 5 min. getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (4) aufgenommen. Die chromosomale DNA wurde bei 4°C gelagert.

Lösung:

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM -EDTA (pH 8.0)

1 % SDS

Phenol

Chloroform

### **3.7.3 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch nach der Methode von Chargaff (1995) ermittelt. Hierfür wurden die optischen Dichten (OD) bei 260 nm und zur Kontrolle auf Proteinverunreinigung bei 280 nm in einem Beckmann DU-62 Spektrophotometer bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass einer  $OD_{260}$  von eins näherungsweise einer dsDNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  bzw. ssDNA-Konzentration von 33  $\mu\text{g/ml}$  entspricht. Die Reinheit der DNA ergab sich aus dem Quotienten aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$ .

### **3.7.4 Restriktion von DNA**

Das Schneiden von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen in den entsprechenden Restriktionspuffern nach Angaben der Vertreiberfirmen (10-facher Restriktionspuffer zusammen mit 1-10 U [ $\mu\text{mol/min}$ ] des Restriktionsenzymes). Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und spalten können. Die Inkubationstemperatur richtete sich dabei nach dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms (meistens bei 37°C). Die Inkubationsdauer lag bei 1 h für geringe Mengen DNA. Je nach weiterer Verwendung wurden die Ansätze entweder mit Probenpuffer versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, oder das Enzym wurde hitzeinaktiviert und die DNA ausgefällt.

### **3.7.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Diese Technik (McDonell et al., 1977) ermöglicht es, doppelsträngige DNA in hohem Maße aus Agarosegelstücken zurück zu gewinnen.

Nachdem das Gel photographiert worden war, wurden für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und in Dialyseschläuchen vollständig mit 600  $\mu\text{l}$  TAE-Puffer überschichtet. Die Dia-

lyseschläuche wurden vorher durch dreimaliges Kochen in Wasser von ihrem starken Glyceringehalt befreit. Anschließend wurde eine Elektrophorese bei 80 mA für 10 min durchgeführt. Anschließend wurde jeweils nach 1 min, 30 sec, 10 sec und 5 sec die Stromrichtung gewechselt. Hierbei löste sich die DNA aus dem Gelblock und konnte mit dem TAE-Puffer aufgenommen werden. Der gewonnene Überstand wurde mit Phenol und Chloroform gereinigt und nach Zugabe von 1/20 x Vol 5 M NaCl und 2 x Vol. 100 % Ethanol für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Waschen mit 70 % Ethanol und Zentrifugation für 5 min wurde die DNA in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **3.7.6 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der PCR-Technik**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Technik, um gezielt beliebige DNA-Abschnitte zu amplifizieren, vorausgesetzt die Sequenzen an den Enden des DNA-Bereichs sind bekannt. Das ist notwendig, weil zu Beginn zwei kurze Oligonukleotide als Primer für die DNA-Synthesereaktion mit dem DNA-Molekül hybridisieren müssen. Bei der PCR erhitzt man einen DNA-Doppelstrang, damit sich beide Stränge voneinander trennen. Die entstehenden Einzelstränge können dann mit Hilfe einer DNA-Polymerase verdoppelt werden. Hierzu benutzt man hitzestabile *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus* und die „vent-proof-reading“-Polymerase). Wiederholt man diesen Prozess mehrfach, steigt die Anzahl der Kopien der ursprünglichen Sequenz exponentiell an. Die PCR wurde in einem PCR Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Pro 50 µl Reaktionsansatz wurden etwa 1 µl (200 ng) Template-DNA, 5 µl 10 x PCR-Puffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 2,5 µl (100 pmol/µl) Primer, je 1 µl dNTP's (10 nmol) eingesetzt. Die vier Basen Thymin, Adenin, Cytosin und Guanin in Form von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten wurden als Bausteine des neuen DNA-Stranges zugesetzt. MgCl<sub>2</sub> diente als aktivierende Substanz der *Taq*-Polymerase und „vent-proof-reading“-Polymerase. Um Verdampfung zu vermeiden, wurde der PCR-Ansatz mit 1-2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Das gesuchte PCR-Produkt entstand bei folgenden Zyklen: 1. Denaturierung bei 95°C für 120 sec. Dabei entstehen durch Lösen der Basenpaarungen Einzelstränge; 2. Hybridisierung bei 55°C für 30 sec. Die Primer heften sich dabei an die Matrize; 3. Polymerisation bei 72°C für 30 sec, dabei findet die DNA-Synthese statt. Dann folgen 25 Zyklen mit der Temperaturabfolge 95°C, 55°C und 72°C für jeweils 30 sec. Der letzte Zyklus endet mit 72°C für 5 min, danach wird der Ansatz

auf 4°C heruntergekühlt. Zuvor wurden unterschiedliche Temperatur- und Zeitprofile ausgetestet, um das Ergebnis mit den Primerkombinationen zu optimieren.

Zur Überprüfung des Ergebnisses erfolgte jeweils mit einem Teil des PCR-Produktes eine Gelelektrophorese. Es wurden jeweils sowohl eine Negativkontrolle, und zum Vergleich die chromosomale DNA von *Comamonas testosteroni* ohne Insert, als auch pUC 18 verdaut mit *Hinfl*, mitgeführt.

### **3.7.7 Dephosphorylierung von DNA**

Die Behandlung von DNA-Molekülen mit alkalischer Phosphatase führt zur Abspaltung der terminalen 5'-Phosphatgruppen. Als Folge können durch Restriktionsspaltung erhaltene DNA-Fragmente nicht mehr mit sich selbst ligieren. Um ein DNA-Fragment (Insert) in einen passend aufgeschnittenen Vektor zu ligieren, wurde dieser vorher mit SAP dephosphoryliert. Dazu wurde zum linearisierten Vektor 1 Unit SAP und 4 µl Puffer zugesetzt, Gesamtvolumen 60 µl). Nach 15 min Inkubationsdauer bei 37°C konnte die SAP durch 5 min Erhitzen auf 65°C vollständig inaktiviert werden.

### **3.7.8 Ligation von DNA**

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit homologen Restriktionsenden erfolgte mit T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym katalysiert in Anwesenheit von ATP und Mg<sup>2+</sup>-Ionen die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxygruppe und dem 5'-Phosphaten doppelsträngiger DNA-Moleküle. Die Ligation erfolgte dann in entsprechendem Reaktionspuffer mit einem Vektor-DNA: Insert-DNA-Verhältnis von 1:1 oder 1:2. Dazu wurden folgende Ansätze für die Ligation in den Vektor pK18 vorbereitet: 2 µl frisches PCR-Produkt, 1 µl pK18 Vektor verdaut mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*, 1 µl Ligase-Puffer (10 x), 1 µl T4 DNA-Ligase (1 U) in einem Endvolumen von 10 µl. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert.

### **3.7.9 Transformation**

#### **3.7.9.1 Herstellung von kompetenten Zellen**

Bei der Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen wurden die Bakterien in 30 ml SIN-Medium bei 37°C und 180 rpm ca. 4 h kultiviert (OD<sub>595</sub> 0,4-0,6). Nach dem Abzentrifugieren des Pellets (10 min bei 3500 rpm und 4°C) wurde das Pellet in 20 ml 0,1 M

Calciumchlorid (2) resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und für 5 min abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden dann in 5 ml Calciumchlorid-Lösung (2) aufgenommen und auf Eis gelagert.

Lösungen:

(1) SIN-Medium

(2) 0,1 M Calciumchlorid in H<sub>2</sub>O

### **3.7.9.2 Hitzeschock-Methoden**

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen mit 10 µl Ligationsansatz vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für exakt 90 sec bei 42°C schockerhitzt und danach 5 min auf Eis abgekühlt. DNA lagert sich während der Kältebehandlung an die Zellmembran an und wird in der Wärme von den Zellen aufgenommen. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 400 µl SIN-Medium für 1 h bei 37°C und 105 rpm im Schüttelinkubator inkubiert und auf Agarplatten, die 30 µg/ml Kanamycin enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am folgenden Morgen wurden 10-20 einzelne Kolonien gepickt und in 1 ml SIN-Medium, das ebenfalls 30 µg/ml Kanamycin enthielt, aufgenommen und über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Von diesen Flüssigkulturen wurden dann Minipräparationen angefertigt.

### **3.7.10 Proteinextraktion**

Die Proben für die Detektion der 3α-HSD/CR durch ELISA wurden mittels Kältelysis hergestellt; eine 3 ml-Kultur wurde für 10 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach 3 x Waschen mit 1 ml PBS in 200 µl PBS resuspendiert. Um eine Lyse der Zellen zu erreichen, wurde die Suspension 3 x im Wechsel für je 30 min. bei -20°C eingefroren bzw. bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert bei 13000 rpm für 20 min. Der Überstand konnte dann zur Proteinbestimmung und für ELISA-Studien genutzt werden.

Lösungen:

PBS-Puffer 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2

0,9 % (w/v) Natriumchlorid

### 3.7.11 Proteinbestimmung

Die colorimetrische Methode von Gesamtproteinkonzentrationen wurde nach der Methode nach Bradford (1976) durchgeführt. Hierbei kann Protein in den Konzentrationen zwischen 25 und 1400 µg nachgewiesen werden, indem nach Zugabe des Farbstoffes Coomassie-Brilliant Blau G-250 die jeweilige Farbänderung gemessen wird. Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches besteht eine lineare Beziehung zwischen der Extinktion 595 nm und der Proteinkonzentrationen. Die Extinktion wird bei 595 nm gemessen, da das Absorptionsmaximum des in saurer Lösung vorliegenden Farbstoffes durch die Interaktion mit basischen und aromatischen Aminosäureresten von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Mit Hilfe einer Protein- Stammlösung (BSA 10mg/ml) und mehreren Verdünnungen in A. bidest (Verdünnungsfaktor 10 bis 980) konnte – nach Messung der Extinktion bei 595 nm – eine Eichgerade mit Standardwerten erstellt werden. Dazu wurde zunächst 1 VT der konzentrierten Farbstofflösung mit 4 VT A. bidest. verdünnt. 5 ml dieser Farbstoffverdünnung wurden dann zu je 100 µl der Proteinstandards bzw. der proteinhaltigen Proben gegeben. Die Ansätze wurden mehrmals invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor jeweils 1 ml in Plastik-Küvetten (d=1 cm) überführt und die Extinktion gemessen werden konnte. Als Blindwert diente dabei die verdünnte Farbstofflösung. Durch Auftragen der gemessenen Extinktionswerte gegen die Konzentration der Proteinstandards konnte nun die Eichgerade erstellt werden, aus der die unbekannt Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt wurden.

### 3.7.12 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Aufgrund der negativen Ladungen der Nukleinsäuren lassen sich diese in einem elektrischen Feld in einer Gelmatrix trennen und identifizieren. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA im Agarosegel ist abhängig von dem Molekulargewicht und der Konformation der DNA und von der elektrischen Feldstärke im Gel. Innerhalb eines gewissen Bereichs ist die Wanderungsgeschwindigkeit linear doppelsträngiger DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Das Molekulargewicht eines DNA-Fragments unbekannter Größe kann daher aus seiner Wanderungstrecke bestimmt werden, indem neben der unbekannt DNA-Probe ein Längenstandard elektrophoretisch aufgetrennt wird. Als Längenstandard diente pUC18 verdaut mit *Hinfl*. Dabei ergaben sich 6 Fragmente (1,419 kb, 517 bp, 396 bp, 214 bp, 75 bp, 65 bp).



Für die Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurden, abhängig von der Fragmentgröße, unterschiedliche Agarosen verwendet. Kleine DNA-Fragmente (<100 bp) wurden in 1,5 % (w/v) „low-melting“ Agarose aufgetrennt. Höhermolekulare Nukleinsäuren wurden in 0,7 % (w/v) Agarose getrennt.

Zum Gießen der Gele musste die Agarose in TAE-Puffer (1) aufgeköcht werden, bis die Agaroselösung schlierenfrei war. Nach dem Erstarren des Gels in einer horizontalen Laufkammer wurde es mit dem Laufpuffer TAE (1) überschichtet. Die Proben wurden mit dem Probenpuffer (3) versetzt, zusammen mit dem Längenstandard auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese mit 5 V/cm Abstand der Elektroden zueinander bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel für 5 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (2), der in doppelsträngige DNA interkaliert, zugegeben und anschließend für 5-10 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Unter UV-Beleuchtung bei 254 nm konnten die getrennten Nukleinsäuren sichtbar gemacht, mit einem vorgesetzten Rotfilter photographiert und ausgewertet werden. Banden von besonderem Interesse wurden nach der Elektrophorese unter UV-Licht ausgeschnitten und einer Elution unterzogen, um anschließend eine Re-PCR durchzuführen:

Lösungen:

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| (1) 1 x TAE-Puffer:             | 40 mM Tris/Acetat, pH 8,0<br>1 mM EDTA              |
| (2) Ethidiumbromid-Stammlösung: | 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O                        |
| (3) Probenpuffer:               | 0,5 % (w/v) Bromphenol-Blau,<br>30 % (v/v) Glycerol |

### 3.7.13 Southern Blot

Der Transfer von Nukleinsäuren auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond-N<sup>+</sup>) erfolgte nach der von Southern (1975) beschriebenen Kapillartransfer-Methode. Diese Methode beruht auf Kapillarkräften, die einen Flüssigkeitsstrom aus einem Pufferreservoir durch das Gel bewirken und dadurch die Nukleinsäuren auf die Membran transferieren. Dort werden sie durch die positive Ladung der Membran verbunden.

Zuerst wurden nach dem Verdau von genomischer *C. testosteroni* DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* die Ansätze auf einem 0,7 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Nach

der Elektrophorese wurde das Gel 30 min in Denaturierungslösung (1) geschwenkt und dann für 30 min unter Zugabe von Neutralisierungslösung (2) renaturiert.

Der Blotaufbau bestand aus einem mit 20 x SSC (3) gefüllten Pufferreservoir, auf dessen Rändern eine Glasplatte lag. Zwei Lagen Whatman 3 MM Papier wurden in 20 x SSC getränkt und so auf die Glasplatte gelegt, dass beide Enden in den Transferpuffer tauchten. Auf das Whatmann Papier wurde das Gel und darauf luftblasenfrei auf die für 5 min in H<sub>2</sub>O benetzte Nylonmembran gelegt. Darauf folgten einige Lagen Filterpapier sowie ein Stapel Zellstoff, der mit ca. einem Kilogramm beschwert wurde. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt; danach wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen und die DNA durch 2-stündliches Lagern bei 80°C im Trockenschrank auf der Membran irreversibel fixiert.

Lösungen:

(1) Denaturierungslösung: 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl

(2) Neutralisationslösung: 0,5 N HCl, 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl

### **3.7.14 DNA-DNA-Hybridisierung**

#### a) Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde die Membran mit dem Standardhybridisier-Puffer in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 1 h bei 68°C im Trockenschrank inkubiert. Die gelabelte DNA wurde vor Gebrauch 10 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis gelagert. Die Membran wurde zusammen mit der markierten DNA eingeschweißt und über Nacht bei 65°C im Trockenschrank gelagert.

Um die unspezifisch gebundene DNA abzuwaschen, wurden die Membranen je 2 x 5 min in 2 x Waschlösung (3) bei Raumtemperatur, sowie 2 x 15 min in 1 x Waschlösung (4) bei 68°C gewaschen. Die Detektion erfolgte mit alkalischer Phosphatase markierten Anti-Digoxigenin Antikörper, wobei die Visualisierung über eine Farbreaktion durchgeführt wurde.

Lösungen:

- (1) Prähybridisierungslösung: 5 x SSC  
 0,1 % (v/v) N-Laurylsarcosin  
 0,02 (w/v) SDS  
 1 % (v/v) Blocking Reagenz
- (2) Hybridisierungslösung pK18 als DNA-Sonde mit *EcoRI* verdaut und mit H<sub>2</sub>O verdünnt  
 dNTP Hexanucleotidemixture  
 EDTA, 4 M LiCl, pH 8  
 Klenowenzym
- (3) 2 x Waschlösung: 2 x SSC  
 0,1 % (w/v) SDS
- (4) 1 x Waschlösung: 0,1 x SSC  
 0,1 % (w/v) SDS

b) Visualisierung mittels alkalischer Phosphatase

Für die Detektion der hybridisierten Sonden wurde der Blot für 5 min in Wasch-Puffer (1) gewaschen und für 1 h in Blocking-Puffer (3) inkubiert. Anschließend wurden die mit 150 mU/ml alkalischer Phosphatase markierten Anti-Digoxigenin Antikörper mit dem Blocking-Puffer 1:10000 verdünnt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden im Anschluss durch 2 x 15 min Waschen in Wasch-Puffer (1) entfernt. Danach wurde der Blot für 3 min in Detektions-Puffer äquilibriert, bevor die Visualisierungsmethode durchgeführt wurde.

Lösungen:

- (1) Waschpuffer: Maleinsäure-Puffer (2)  
 0,3 % (v/v) Tween 20
- (2) Maleinsäure-Puffer: 100 mM Maleinsäure  
 150 mM NaCl mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
- (3) Blocking-Puffer: Maleinsäure-Puffer (2)  
 1 % Blocking Reagenz
- (4) Detektion-Puffer

### c) Visualisierung mittels Farbreaktion

X-Phosphat dient als Substrat der alkalischen Phosphatase. In Kombination mit NBT als Elektronenakzeptor ist das Produkt der enzymatischen Reaktion ein unlöslicher violetter Indigofarbstoff. Die Membranen wurden dazu in der Färbelösung, bestehend aus 200  $\mu$ l NBT/BCIP-Lösung (5) und 10 ml Detektion-Puffer (4), so lange inkubiert, bis die gewünschte Färbintensität erreicht war.

Lösungen:

(5) NBT-Lösung: 100 mg/ml in 70 % (v/v) DMF

(6) X-Phosphat-Lösung: 50 mg/ml X-Phosphat in 100 % (v/v) DMF

### 3.7.15 ELISA von 3 $\alpha$ -HSD

Zur Quantifizierung der 3 $\alpha$ -HSD Proteinexpression wurde ein ELISA eingeführt (Xiong et Maser, 2001; Xiong et al., 2001) und nach Standardmethoden Antikörper (Kaninchen-Antikörper) gegen 3 $\alpha$ -HSD/Carbonylreduktase von *Comamonas testosteroni* hergestellt. Die das Protein der 3 $\alpha$ -HSD enthaltenden Proben und ein 3 $\alpha$ -HSD-Standard wurden 1:2 mit Coating-Puffer verdünnt und auf die ELISA Platten aufgetragen („Coating“). Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden die nicht gebundenen Proteine mit dem Waschpuffer durch 3 x Waschen entfernt. Nach der Zugabe des verdünnten Antikörpers gegen die 3 $\alpha$ -HSD und einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C folgte wiederum 3 x Waschen mit Waschpuffer. Um die gebundenen Antikörper detektieren zu können, wurden die mit Peroxidase gekoppelten Schweine-Antikörper hinzugegeben und nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch sechsmaliges Waschen mit Waschpuffer mit ABTS Substrat für 30 min bis max. 1 h bei 37°C inkubiert.

Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 nm (Referenzwellenlänge 490 nm) mit dem Microplate Reader, Model 450 von BIO-RAD.

Über die jeweils mitgeführten 3 $\alpha$ -HSD Standardkonzentrationen konnte die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden.

Lösungen:

Coating buffer:	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
	NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
	NaN <sub>3</sub>	0,29 g
	in 1 l A. bidest lösen, pH 9,6	

Waschpuffer:	NaCl	8 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (12 H <sub>2</sub> O)	2,9 g
	KCl	0,2 g

TWEEN 20                    0,5 ml in 1 l A. bidest lösen, pH 7,4

Kaninchen-Antikörper gegen 3 $\alpha$ -HSD verdünnt im Verhältnis 1:1000 mit Waschlösung

Schweine-Antikörper gegen Kaninchen-Antikörper konjugiert mit Peroxidase, verdünnt 1: 1000 mit Waschpuffer (DAKO)

ABTS-Substrat [Boehringer]

### 3.8 Biochemische Methoden

#### 3.8.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für einige Substrate konnte die Bestimmung der kinetischen Parameter durch direkte Messung der entstandenen Produkte über die „High Pressure (Performance) Liquid Chromatography“ (HPLC) erfolgen. Dafür wurde die HPLC-Anlage der Firma Merck verwendet (Merck-Hitachi L-66220). Eine Quantifizierung erfolgte durch Eichkurven der gebildeten Produkte. Der Umsatz von Metyrapon, *p*-Nitrobenzaldehyd und NKI-42255 wurde nach dem Prinzip der „reversed phase“ bestimmt. Hierbei werden hydrophobe Substanzen besser auf dem Säulenmaterial gebunden als hydrophile und eluieren dementsprechend später bei Gebrauch eines polaren Eluenten (Laufmittel). Als mobile Phase wurde ein Eluent aus 30 % Acetonitril (v/v) und 0,1 % Ammoniumacetat, pH 7.2 verwendet. Die stationäre Phase bestand aus einer C-18-Säule (LiChrospher 100 RP-18;

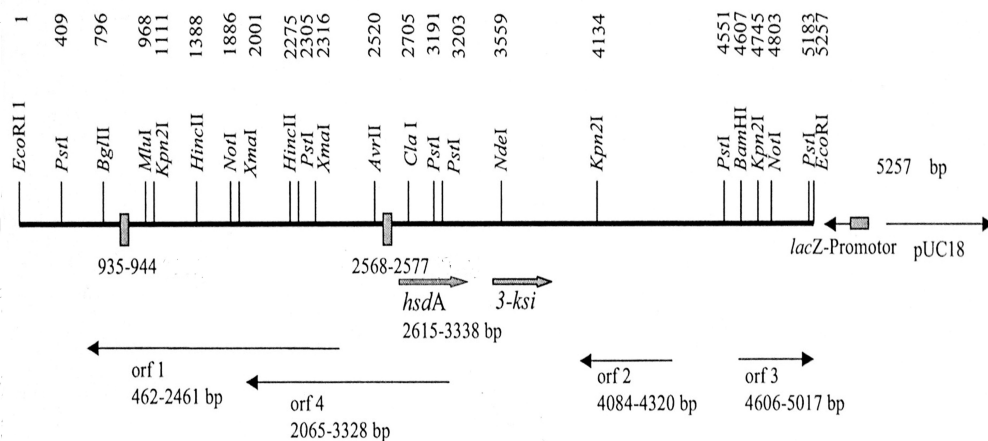
Porengröße. 5  $\mu\text{m}$ , Säulenmaße: 250 x 4 mm der Firma Merck). Die Detektion erfolgte bei 254 nm (Metyrapon, p-Nitrobenzaldehyd) und 274 nm (NKI-Substanzen) und die Integration und Berechnung der Peakflächen wurde durch eine SHIMADZU-Integrator (C-R6A Chromatopac) erhalten.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Konstruktion von Suicide Plasmiden

Als Ausgangspunkt wurde ein in pUC18 kloniertes DNA-Fragment verwendet, das Plasmid p6 mit einer Länge von 5257 bp (Abb. 12), (Xiong et Maser, 2001). Das Insert von p6, das in dieser Arbeitsgruppe beim Screenen einer *C. testosteroni*-Genbank mit einer homologen Oligonukleotidsonde für das 3 $\alpha$ -HSD-Gen (*hsdA*) im Southern-Blot erkannt, kloniert und sequenziert wurde (Möbius et al., 1998), enthält die Gensequenz für die 3 $\alpha$ -HSD, die Gensequenz für ein weiteres am Steroidstoffwechsel beteiligtes Enzym, der 3-Ketosteroid-Isomerase (*3-ksi*) und verschiedene offene Leserahmen. Der orf 1 erstreckt sich von 462-2461 bp, der orf 2 von 4084-4320 bp, der orf 3 von 4606-5017 bp und der orf 4 von 2065-3328 bp.

orf 1, orf 2 und orf 4 liegen entgegen der Richtung von *hsdA*, orf 3 in Richtung von *hsdA*. p6 wurde als Ausgangsmaterial für die Suche nach Operator und Repressorsequenzen verwendet, da es aufgrund seines Umfangs wahrscheinlich diese Sequenzen enthält.



**Abb. 12: Restriktionskarte des 5.257 kb-EcoRI-Fragmentes von *C. testosteroni*.**

Als Pfeile dargestellt sind zusätzlich die open reading frames. Die Position der zwei pallindromischen 10nt Sequenzen sind als senkrechtstehende Rechtecke dargestellt, die die Funktion eines Operators haben (Xiong et al., 2001).

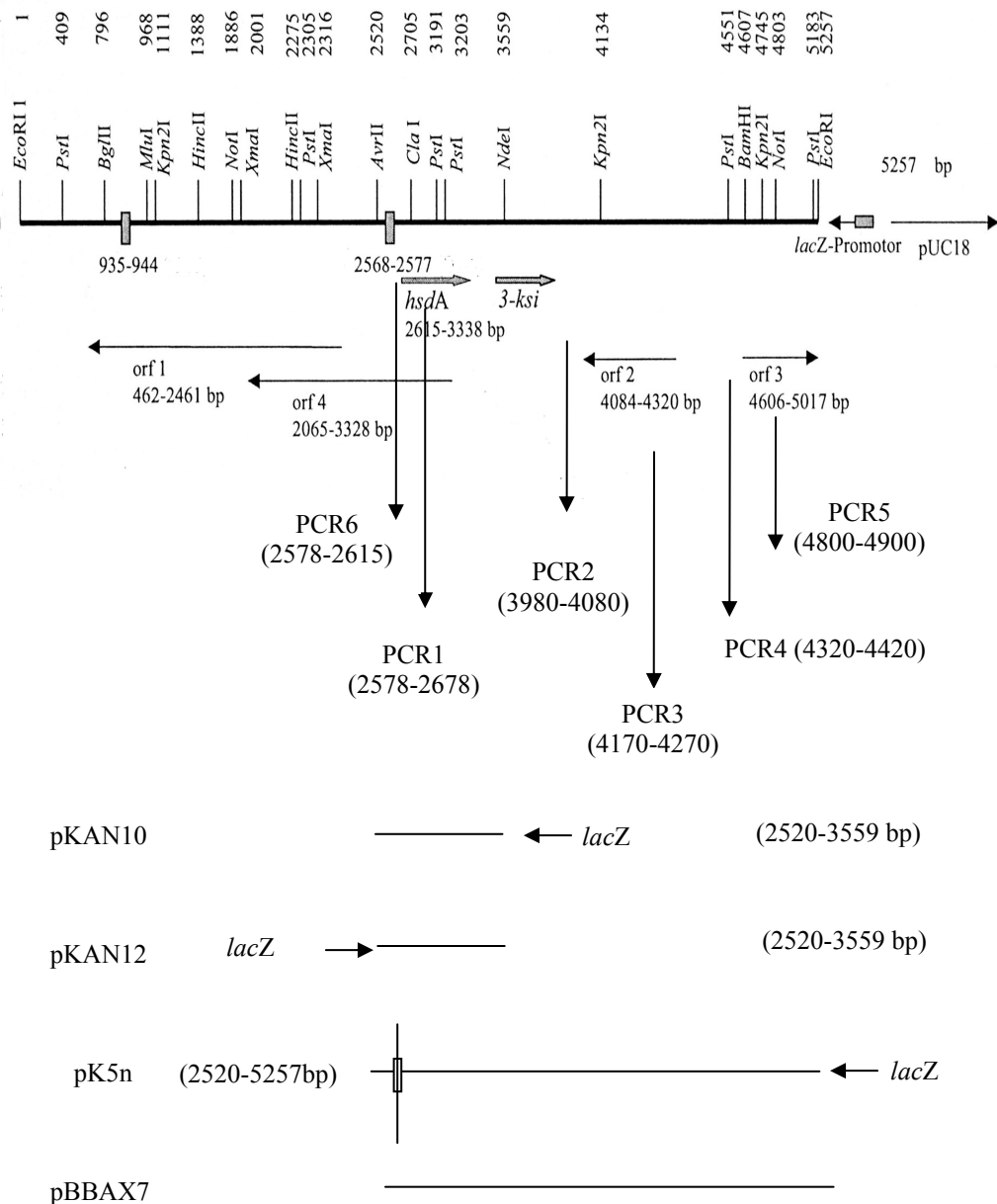
In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser wurden zur Eingrenzung einer möglichen Operatorregion durch Computeranalysen zwei je 10 Nukleotide umfassende, pallindromische Sequenzen gefunden. Sie liegen im Abstand von 1,633 kb zueinander (OP1: 0,935 kb-0,944 kb, OP2: 2,568-2,577 kb, s. Abb. 12). OP2 findet sich 9 bp stromaufwärts des Promotors von *hsdA*. Der Transkriptionsstart von *hsdA* konnte 28 bp stromaufwärts vom Translationsstart identifiziert werden (Xiong et al., 2001). Die Promotorregion befindet sich innerhalb der 93 bp-Region stromaufwärts von *hsdA* (Xiong et al., 2001).

Um Aufschluss über die Funktion bestimmter regulatorischer Elemente zu erhalten, wurden in dieser Arbeit so genannte Suicide Plasmide hergestellt. Dazu wurden ca. 100 bp große Fragmente aus verschiedenen Regulationsbereichen des die 3 $\alpha$ -HSD enthaltenden *EcoRI* Fragmentes mittels PCR gewonnen und in pK18 kloniert. Insbesondere wurde der Bereich des orf 2 in Hinblick auf eine mögliche Repressorfunktion untersucht. orf 2 wird im weiteren Verlauf als Repressor B definiert. Um Inserts zur Herstellung der Plasmide pK1a bis pK6 zu erhalten, wurden zunächst definierte ca. 100 bp große Primer (siehe Abb. 13) aus dem genannten 5.257 kb Fragment, bestellt, die von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert wurden. Die PCR-Produkte wurden dann zur Klonierung in den Vektor pK18 verwendet.

## 4.2 Strategie zu Plasmidherstellung

Der Genabschnitt von PCR1 wurde gewählt, um den Bereich vor dem Gen der 3 $\alpha$ -HSD zu untersuchen. Das Plasmid, das den Genabschnitt von PCR2 enthält, „zerstört“ durch seine Integration den Bereich vor dem orf2, einem vermutlichen Repressorgen. pK3, das den Genabschnitt PCR3 enthält, wurde innerhalb von orf2 integriert. Damit sollte dieser Genabschnitt vollständig zerstört werden. Diese Tatsache gab den Plasmiden den Namen „Suicide-Plasmide“. pK4 mit dem PCR-Produkt 4 wurde stromabwärts von orf2/Repressor B in die chromosomale DNA von *C. testosteroni* integriert. pK5 mit dem PCR-Produkt 5 zerstörte den Genabschnitt von orf3. pK6 mit dem PCR-Produkt 6 wurde direkt hinter den Operatorbereich und vor *hsdA* positioniert (s. Abb. 13).





**Abb. 13: PCR-Strategie zur Herstellung von Suicide Plasmiden**

Die 100 bp großen PCR-Produkte 1-6 wurden in den Vektor pK18 kloniert. Die Plasmide wurden anschließend als pK1-pK6 bezeichnet. Zur Herstellung von pKAN10, pKAN12, pK5n und pBBAX7 siehe Text.

Außer den Plasmiden pK1-pK6 wurden, ausgehend von p6, die Deletionsmutanten pKAN10 und pKAN12 verwendet (s. Abb. 13). Dazu wurde zunächst pK15 hergestellt, indem das 5.257 kb *EcoRI*-Fragment von *Comamonas testosteroni* in pK18 (siehe

Abb. 10) kloniert wurde. Aus dem Verdau von pK15 wurde schließlich pKAN10 (s. Abb. 13) hergestellt, das ein relativ kleines Insert (2520-3559 bp) enthält. Es umfasst den größten Teil der Gensequenz der *orf4* (*orf4*: 2065-3328 bp, pKAN10: 2520-3328bp), der mit der *hsdA* überlappt. Das gleiche Fragment, kloniert in pK18, wurde zur Herstellung von pKAN12 benutzt, dessen *lacZ*-Promotor stromabwärts von *hsdA* liegt.

Zur Herstellung des Plasmids pK5n wurde zunächst das Plasmid pKAX1 hergestellt, in dem aus pK15 (s. oben) eine Deletionsmutante mit dem Insert 2520-5257 bp kloniert wurde. Zur Herstellung von pK5n wurde pKAX1 mit *AvrII* und *ClaI* verdaut. Durch eine 2-Schritt-Polymerasekettenreaktion-Mutation wurde die Deletion von 5 Nucleotiden im Bereich von 2568 bp des 10 Nucleotid großen Operatorbereich der  $3\alpha$ -HSD erreicht. Da in diesem Sequenzbereich gleichzeitig die Promotorregion der  $3\alpha$ -HSD lokalisiert ist, konnten nur 5 Nucleotide aus dem Operatorbereich entfernt werden.

Zur Herstellung des Plasmids pBBAX7 wurde das bereits beschriebene 5.275 kb *EcoRI*-Fragment in den Vector pBBR1MCS-2 (s. Abb. 11) kloniert, um pBB21B zu erhalten. Das Plasmid pBBAX7, in dem ein großer Anteil stromaufwärts der  $3\alpha$ -HSD fehlt, wurde durch Verdau von pBB21B mit *XmaI* und *AvrII* hergestellt

In Abb. 14 sind die Sequenzen der in pK18 klonierten ca. 100 bp großen DNA-Fragmente dargestellt, die anschließend als Plasmide pK1-pK6 bezeichnet wurden. Das PCR1-Produkt wurde in zwei verschiedene Richtungen in pK18 kloniert, so dass man pK1a und pK1b unterscheiden muss.

#### pK1a

1	ACGGCCAGTG	CCAAGCTTGC	ATGCCTGCAG	GTCGACTCTA	GAGGTCCCC
51	GGGTACCGAG	CTC <b>GAAITCC</b>	TAGGGGAATT	ACATCGTCCG	TTGCATGTA
101	<u>GCCTGGTTGT</u>	<u>TCATGATGGG</u>	<u>CTTTGATGTG</u>	<u>CGCCATCACC</u>	<u>ACCCAGACAA</u>
151	<u>AAGGAGACAA</u>	<u>GACGAATTCG</u>	TAATCATGTC	ATAGCCCTGT	TTC

#### pK1b

1	AAGCTTGCAT	GCCTGCAGGT	CGACTCTAGA	GGATCCCCGG	GTACCGAGCT
51	<u>CGAATTCGTC</u>	<u>TTGTCTCCTT</u>	<u>TTGTCTGGGT</u>	<u>GGTGATGGCG</u>	<u>CACATCAAAG</u>
101	<u>CCCATCATGA</u>	<u>ACAACCAGGC</u>	<u>TACATGCAAA</u>	<u>CGGACGATGT</u>	<u>AATTCCTTA</u>
151	<u>GGAATTCGTA</u>	ATCATGTCAT	AG		

pK2					
1	AGCTTGCAT	GCCTGCAGGT	CGACTCTAGA	GGATCCCCGG	GTACCGAGCT
51	<u>CGAATTCGGC</u>	<u>TCAGGCCGGG</u>	<u>AGTGCTCATT</u>	<u>GCACTCCTT</u>	<u>GAACAACAAG</u>
101	<u>ATCAATAGCA</u>	<u>TTCAACGCAT</u>	<u>GATTTCAATG</u>	<u>TATTCAGAT</u>	<u>CAAAATGTAT</u>
151	<u>TGAAACGAA</u>	<u>TTCGTAATCA</u>	TGTCATAGCT		
pK3					
1	CCCCGGGTAC	CGAGCTC <u>GAA</u>	<u>TTCCTGGTCT</u>	<u>ACCCCGAAGA</u>	<u>TGCCGATGAC</u>
51	<u>AGTGCAGGAA</u>	<u>GGTTCTCGGT</u>	<u>CTTCTCGGGC</u>	<u>GTGGGCACGG</u>	<u>CCATTCTGGG</u>
101	<u>CTGTCGGGAA</u>	<u>GGAGACCGCA</u>	<u>TCGAATTCGT</u>	AATCATGT	
pK4					
1	CCCCGGGTAC	CGAGCTCGAA	TTCGCTCGCG	CAATGTGGTC	ACC <u>GAATTCG</u>
51	<u>GTGACCACAT</u>	<u>TGSSCTAGAC</u>	<u>ACCTGCCGCG</u>	<u>CATCGACGAC</u>	<u>GGTGGCGCGC</u>
101	<u>TCGATTTTAT</u>	<u>GCTCCAGATC</u>	<u>GGCCGCTTGC</u>	<u>GACTCCCATT</u>	<u>CCAGACGAG</u>
151	<u>cGAATTCGT</u>				
pK5					
1	GCTGCCTGCA	GTCGACTCTA	GAGGATCCCC	GGGTACCGAG	CTC <u>GAATTC</u>
51	<u>AGCGGCCGC</u>	<u>CCTGATTGAA</u>	<u>GAGGTGGGTG</u>	<u>AGTACAGGCA</u>	<u>GCTGAACCCG</u>
101	<u>GAATTCATGT</u>	CATAGCTGTT	TCCTGTGTGA	ATTGTTATC	CGCTCAATTC
151	CACACAACAT	ACGA			
pK6					
1	TGCATGCCTG	CAGGTCGACT	<u>CTAGACCAGG</u>	<u>ACCTTGCGCG</u>	<u>TAGGCACCAA</u>
51	<u>TGCCGGTGGC</u>	<u>GCASGCTTAT</u>	<u>CACGATGATG</u>	<u>GACATGTCTT</u>	<u>GTCTCCTTTT</u>
101	<u>GTCTGGGTGG</u>	<u>TGATGGCGCA</u>	<u>CAGAATTCGT</u>	AATCATGTCA	TAGCTGTTTC

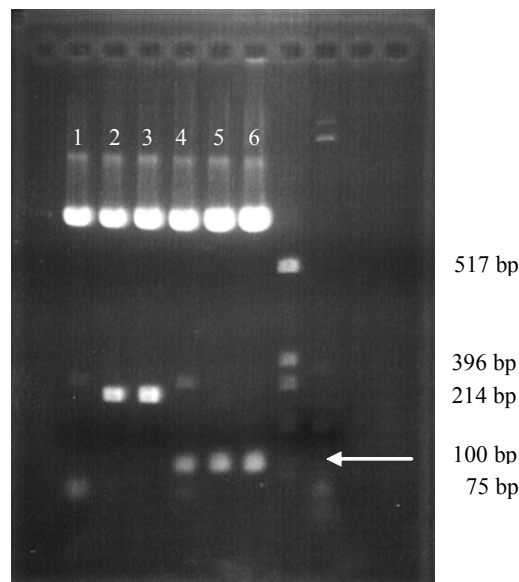
**Abb. 14 Darstellung der Sequenz der in pK18 integrierten Primer PCR1-PCR6.**

GAATTC entspricht *EcoRI*, TCTAGA entspricht *XbaI*. Unterstrichen sind jeweils die in pK18 integrierten PCR-Inserts, die restliche Sequenz stammt von pK18.

### 4.3 Transformation der Plasmide in *E. coli*

Die Plasmide wurden, wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben, in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und in SIN-Medium amplifiziert. Zur Selektion der plasmidhaltigen Bakterien wurde die Kultur auf kanamyzinhaltige Agarplatten ausplattiert, da durch das Kanamyzinresistenzgen von pK18 nur die plasmidhaltigen Bakterien wachsen können. Zur Überprüfung des vorhandenen Inserts wurden mehrere Kolonien in kanamyzinhaltiges SIN-Medium aufgenommen. Die Integration der DNA-Fragmente in den Vektor erfolgte vor der *EcoRI*-Schnittstelle in pK18 (2661 bp). Die Plasmide mit vor-

handenem Insert wurden dann mittels des Tip-100 Kits (Qiagen) gereinigt und erneut unter Verdau mit *EcoRI* überprüft, so dass sich das 100 bp große Insert in der Gelelektrophorese darstellen ließ. Abb. 15 zeigt, dass die Integration nicht immer erfolgreich war: Die Spuren 1-3 von pK4 waren ohne Insert. Spur 4 von pK4 hingegen zeigt ein 100 bp großes Insert auf, das den Inserts von pK2 und pK3 (Spuren 5 und 6) entspricht.



**Abb. 15: Restriktionsverdau der Suicide Plasmide (hier als Beispiel pK4) mit *EcoRI***

Spuren 1-4: Proben von PCR4 in pK18, Spur 5 und 6: PCR2 und PCR3, Spur 7: Verdau von pUC18 mit *HinfI* als Marker

#### 4.4 Marker Suicide Integration

Durch die Integration von Plasmid-DNA an spezifischen Stellen der chromosomalen DNA von *C. testosteroni* sollte versucht werden, bestimmte genregulatorisch von Bedeutung erscheinende Bereiche durch so genannte Suicide-Integration zu identifizieren.

Um eine Integration in die chromosomale DNA von *C. testosteroni* zu erreichen, wurden in dieser Arbeit zwei Methoden untersucht: Mating und Elektroporation.

##### 4.4.1 Mating

Zunächst wurden die Plasmide pK1a bis pK6 in *E. coli* transformiert (s. Transformation). Außerdem wurden 10  $\mu$ l *C. testosteroni* in 1 ml SIN-Medium kultiviert und über Nacht bei 30°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 500 µl der *C. testosteroni*-Kultur für 10 s bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 µl SIN-Medium resuspendiert. Jeweils 20 µl der transformierten *E. coli*-Zellen wurden mit 20 µl *C. testosteroni*-Kultur gemischt und auf Agarplatten ohne Antibiotikazusatz gegeben. Als Negativkontrollen wurden jeweils reine Kulturen von *E. coli* ohne Plasmid und *C. testosteroni* mitgeführt. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C wurden die Kolonien in 100 µl SIN-Medium gelöst und jeweils 10 µl auf Agarplatten mit je 30 µg/ml Ampicillin und Kanamycin ausplattiert. Durch die Antibiotikaselektion war ein Wachstum nur für die Plasmide möglich, die durch Integration in die chromosomale DNA beide Resistenzeigenschaften erworben haben (Abb. 16).

#### 4.4.2 Elektroporation

Das Applizieren von kurzen Hochspannungspulsationen führt zu Bildung von nanometergroßen Poren in der Plasmamembran (Neumann et al. 1982; Zimmermann 1982). Die DNA wird direkt in das Cytoplasma gebracht, entweder durch diese Poren oder als Konsequenz der Umverteilung von Membranbestandteilen, die das Schließen der Poren begleitet. Die Elektroporation kann sehr effizient sein und zur vorübergehenden Expression von klonierten Genen und zur Herstellung von Zelllinien, die integrierte Kopien von bestimmten Genen enthalten, benutzt werden. Elektroporation verursacht häufig Zelllinien, die eine oder meistens mehrere integrierte Kopien von fremder DNA enthalten, im Gegensatz zu calciumphosphat-vermittelten Transfektion und Protoplastfusion (Boggs et al. 1986).

Erstmalig wurde die Elektroporation mittels gepulster elektrischer Felder für die DNA-Transfektion genutzt (Neumann et al. 1982). Damit konnte DNA in unterschiedliche Säugetierzellen (Neumann et al. 1982; Wong and Neumann 1982; Potter et al. 1984; Sugden et al. 1985; Toneguzzo et al. 1986; Tur-Kaspa et al. 1986) integriert werden.

Die Effizienz der Elektroporation wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst:

Die Stärke des applizierten elektrischen Feldes, die Dauer des elektrischen Impulses, die Temperatur, die Konformation und Konzentration der DNA und die ionische Zusammensetzung des Mediums. Bei zu niedriger Spannung kann die Plasmamembran nicht ausreichend verändert werden, so dass DNA-Moleküle eindringen können. Bei zu hoher

Spannung werden dagegen die Zellen irreversibel geschädigt. Für Bakterien wird üblicherweise eine Spannung zwischen 1,5-1,8 kV/cm für 4-5 ms appliziert.

Zunächst wurde mit 50 ml SIN-Medium eine Kultur von *C. testosteroni* hergestellt (OD 0,4-0,8) und für 30 min auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension für 10 min bei 3500 rpm und 4°C wurde das Pellet in 5 ml Glycerol 10 % resuspendiert und für 5 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension in 1,5 ml Glycerol 10 % und Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm wurde das Pellet in 400 µl Glycerol 10 % aufgenommen und auf Eis gelagert.

Zu den in 1 µl a. bidest gelösten Plasmiden wurden nun 100 µl der kompetenten Zellen von *C. testosteroni* gegeben. Für die anschließende Transformation wurde die Elektroporation mit 1.8 kV in 1 cm Küvette durchgeführt und die transformierten Zellen in 400 µl SIN-Medium, ohne Antibiotika über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden 100 µl dieser Kultur mit 1 ml SIN-Medium, versetzt mit jeweils [30µg/ml] Ampicillin und Kanamycin inkubiert bzw. Agarplatten ausplattiert, die ebenso diese Antibiotika enthalten (s. Abb. 17).

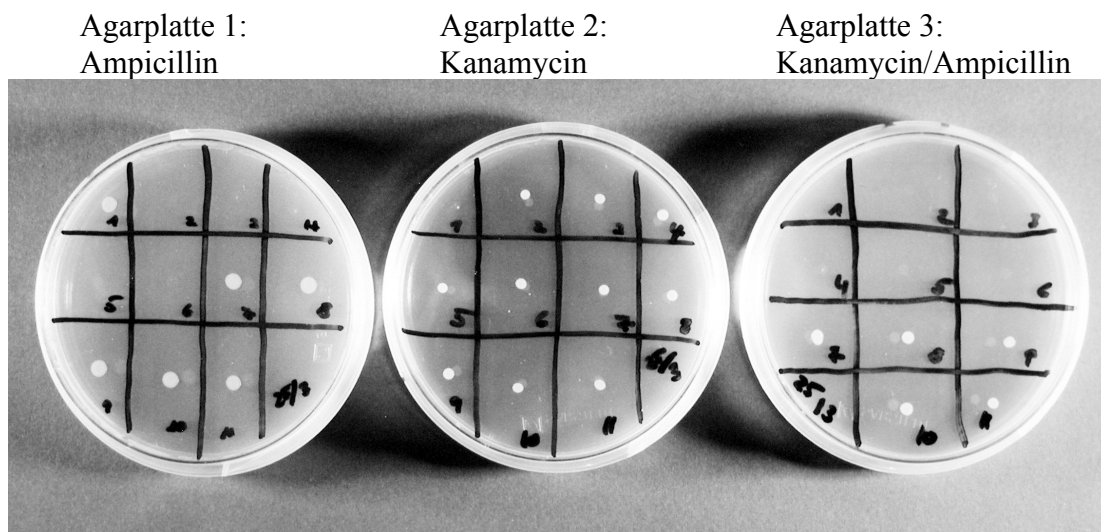
## 4.5 Nachweisverfahren zur Überprüfung der Integration

### 4.5.1 Kultureller Nachweis

Wie bereits oben beschrieben, konnte anhand der Agarplatten, die mit beiden Antibiotika versehen waren, auf die erfolgreiche Übernahme beider Resistenzeigenschaften geschlossen werden (Abb. 16). Im Feld 1 jeder Agarplatte befindet sich eine reine *C. testosteroni*-Kultur, in den Feldern 2-6 befinden sich jeweils eine Kultur von pK1a-pK4, transformiert in *E. coli* und in den Feldern 7-10 die in *C. testosteroni* integrierten Plasmide pK1-pK4.

Feld 1	Feld 2	Feld 3	Feld 4	Feld 5	Feld 6	Feld 7	Feld 8	Feld 9	Feld 10	Feld 11
<i>C. test.</i>	pK1a	pK1b	pK2	pK3	pK4	pK1a	pK1b	pK2	pK3	pK4
	trans-	trans-	trans-	trans-	trans-	integriert	integriert	integriert	integriert	integriert
	formiert	formiert	formiert	formiert	formiert	in <i>C. test.</i>	in <i>C. test.</i>	in <i>C. test.</i>	in <i>C. test.</i>	in <i>C. test.</i>
	in <i>E. coli</i>	in <i>E. coli</i>	in <i>E. coli</i>	in <i>E. coli</i>	in <i>E. coli</i>					

Die Ergebnisse aus beiden Versuchen zeigten, dass ein Wachstum mit den Antibiotika Ampicillin und Kanamycin nur für diejenigen *C. testosteroni* möglich ist, die die Plasmide mit dem Resistenzgen für Kanamycin in ihre DNA integriert haben. *C. testosteroni* allein besitzt nur das Resistenzgen für Ampicillin. Die Plasmide pK1a bis pK6, transformiert in *E. coli*, besitzen nur das durch pK18 übertragene Resistenzgen für Kanamycin. Diesen Sachverhalt zeigen die folgenden Fotos (Abb. 16):

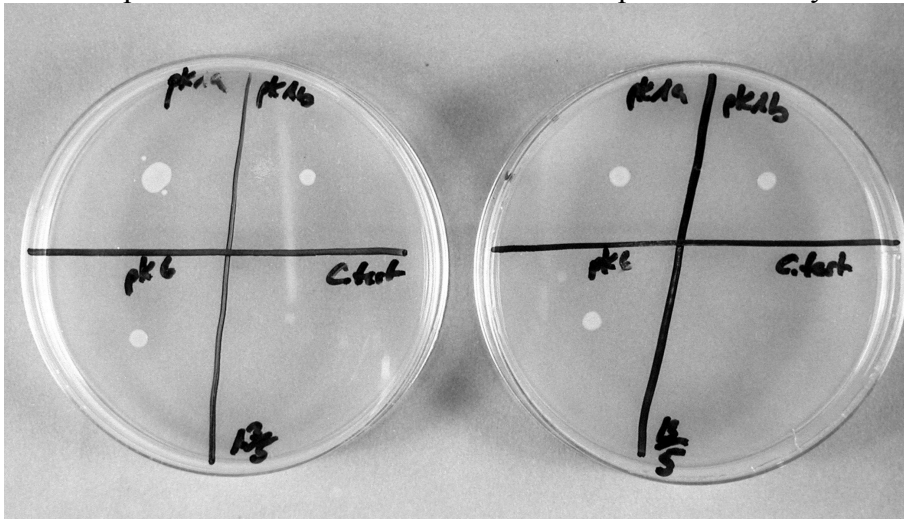


**Abb. 16: Kultureller Nachweis der erfolgreichen Geninsertion (Mating)**

Agarplatte 1 zeigt, dass die in *E. coli* transformierten Plasmide pK1a-pK4 (Felder 2-6) aufgrund ihres fehlenden Resistenzgens für Ampicillin nicht wachsen können. *C. testosteroni* (Feld 1) und die erfolgreich in *C. testosteroni* integrierten Plasmide (Felder 7-11) zeigen aufgrund ihres vorhandenen Ampicillin-Resistenzgens vollständiges Wachstum.

Agarplatte 2 zeigt, dass nur *C. testosteroni* (Feld 1) nicht in der Lage ist, auf kanamycinhaltigen Nährböden zu wachsen. Alle anderen Kulturen besitzen das Kanamycinresistenzgen (Felder 2-11).

Agarplatte 3 zeigt, dass auf Nährböden mit beiden Antibiotika nur die Bakterien wachsen können, die auch beide Resistenzgene enthalten, also nur die in *C. testosteroni* integrierten Plasmide (Felder 7-11).

Agarplatte 4:  
AmpicillinAgarplatte 5:  
Ampicillin/Kanamycin

**Abb. 17: Kultureller Nachweis der erfolgreichen Geninsertion durch Elektroporation**

Agarplatten 4 und 5 (Abb. 17) zeigen den Sachverhalt wie in Abb. 16 beschrieben nach der Elektroporationsmethode. Auch mit dieser Methode lässt sich eine erfolgreiche Geninsertion beweisen: Auf Agarplatte 4 können nur Bakterienkolonien entstehen, wenn sie das Resistenzgen für Ampicillin besitzen. Da die ursprünglichen Plasmide pK1a, pK1b und pK6 dieses Gen eigentlich nicht besitzen, müssen sie es durch die erfolgreiche Geninsertion in *C. testosteroni* erhalten haben. Auf Agarplatte 5 sind nur dort Kolonien erkennbar, wo auch beide Resistenzgene vorhanden sind. In diesem Fall wurde der kulturelle Nachweis nur bei den Plasmiden pK1a, pK1b und pK6 durchgeführt.

#### 4.5.2 Nachweis durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde die PCR benutzt, um die Integration der Plasmide pK1a und pK1b in die chromosomale DNA von *Comamonas testosteroni* zu überprüfen.

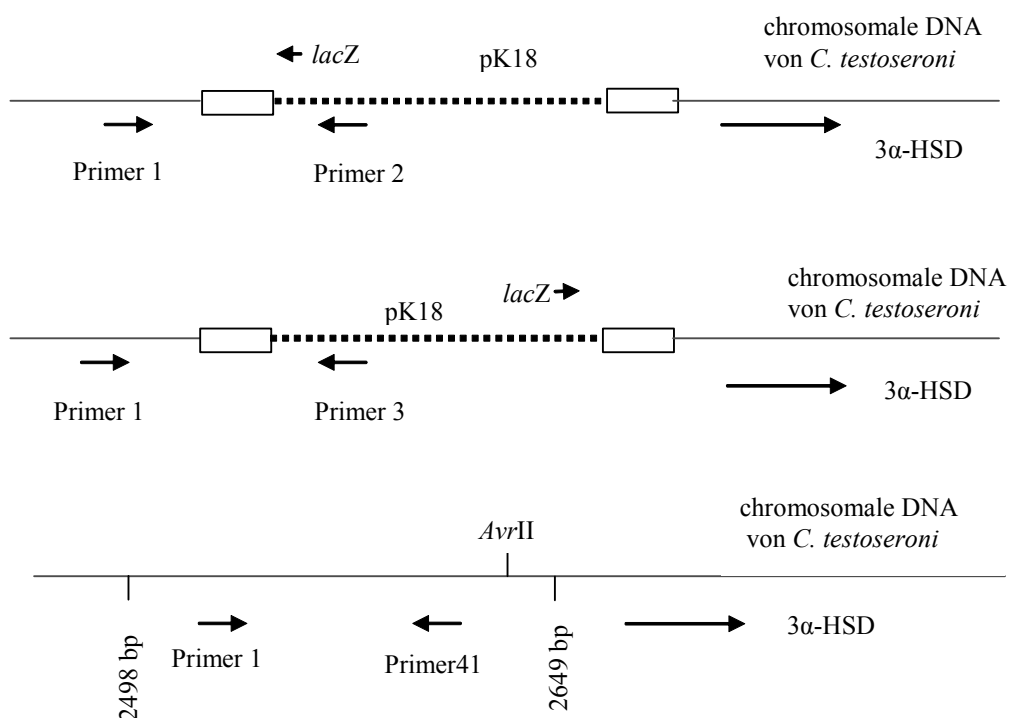
Die Primer für die Durchführung der PCR wurden so gewählt, dass sie sowohl DNA-Abschnitte der chromosomalen DNA von *C. testosteroni* als auch DNA der integrierten DNA beinhalten. Die Basenabschnitte waren für pK1a 179 bp groß und für pK1b 146 bp. Als Kontrolle wurden Primer verwendet, die mit einem 159 bp großen Genabschnitt von *C. testosteroni* hybridisieren (Abb. 18).



Dazu wurden von der Firma MWG folgende Primer synthetisiert:

Oligonukleotide (5'- 3')			
pK1a	P1	GGAAGGGCCACGGTA	179 bp
	P2	GGAATTGTGAGCGGA	
pK1b	P1	GGAAGGGCCACGGTA	146 bp
	P3	CCCCGGGTACCGAGCT	
C. test.	P1	GGAAGGGCCACGGTA	159 bp
	P4	GCCGGTGGCGCAGCC	(2498-2657)

Als Negativ-Kontrolle wurde eine reine *C. testosteroni*-Kultur verwendet. Das Plasmid pUC 18 wurde mit dem Restriktionsenzym *Hinf*I verdaut, so dass die entstandenen Restriktionsschnittstellen als Marker fungieren konnten.



**Abb. 18: PCR-Strategie zum Nachweis der Plasmid-Integration**

Die mittels der PCR-Technik synthetisierten Fragmente wurden anschließend im 1,5 %-Agarosegel anhand eines Markers (pUC18 verdaut mit *Hinf*I) identifiziert (siehe

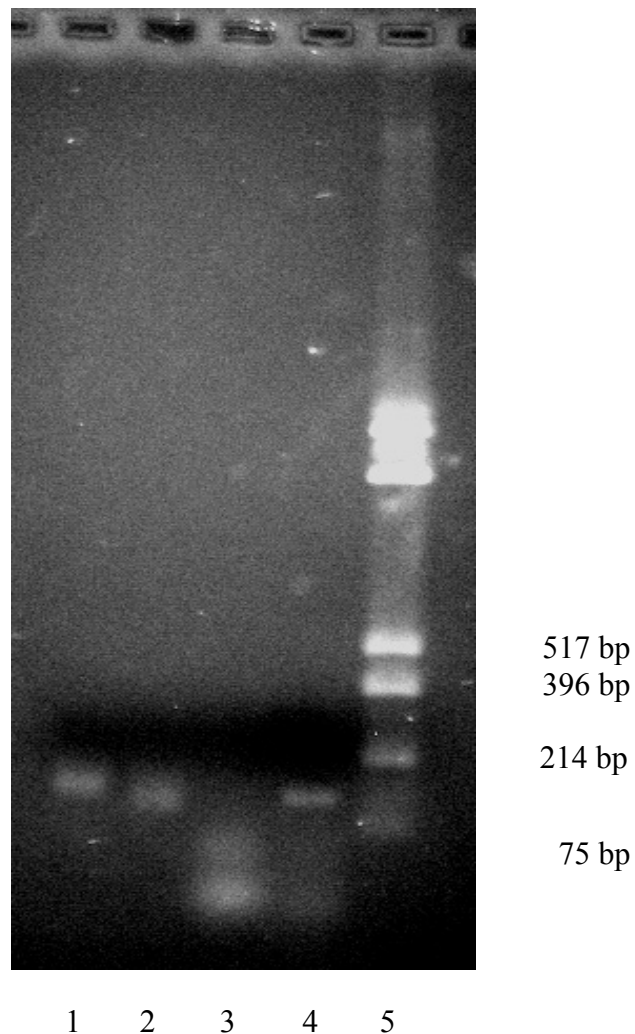


Abb. 19).

#### **Abb. 19: PCR-Kontrolle**

Dargestellt ist das Ergebnis der Gelelektrophorese der oben beschriebenen PCR-Produkte nach Integration in die chromosomale DNA von *C. testosteroni*. Anhand des Markers lässt sich die Größe der PCR-Produkte ablesen.

Spur 1: Insert von pK1a nach Integration in *C. test.*, 176 bp (s. Abb. 18)

Spur 2: Insert pK1b nach Integration in *C. test.*, 146 bp (s. Abb. 18)

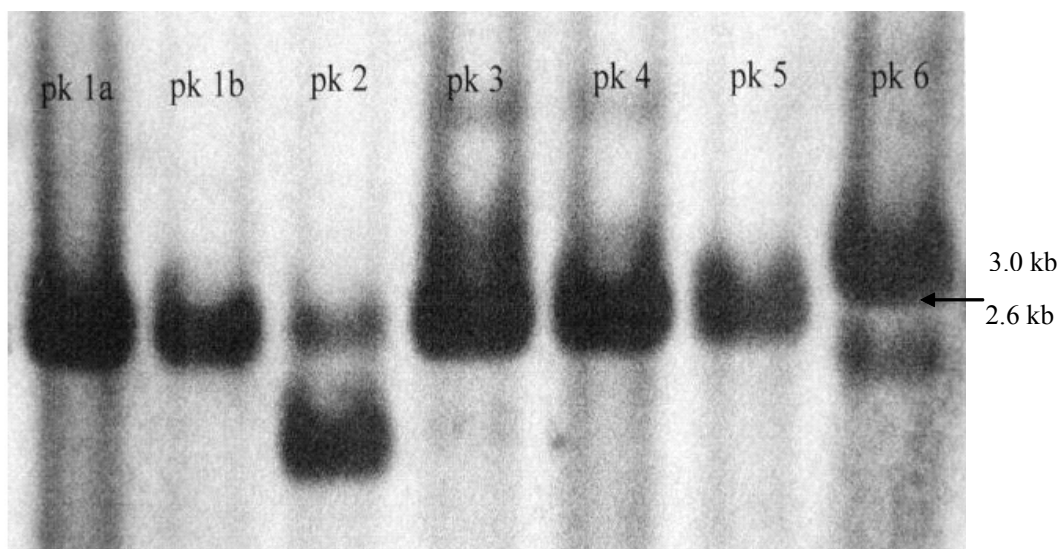
Spur 3: Negativkontrolle (HB101),

Spur 4: *C. testosteroni*, 159 bp (s. Abb. 18)

Spur 5: Marker

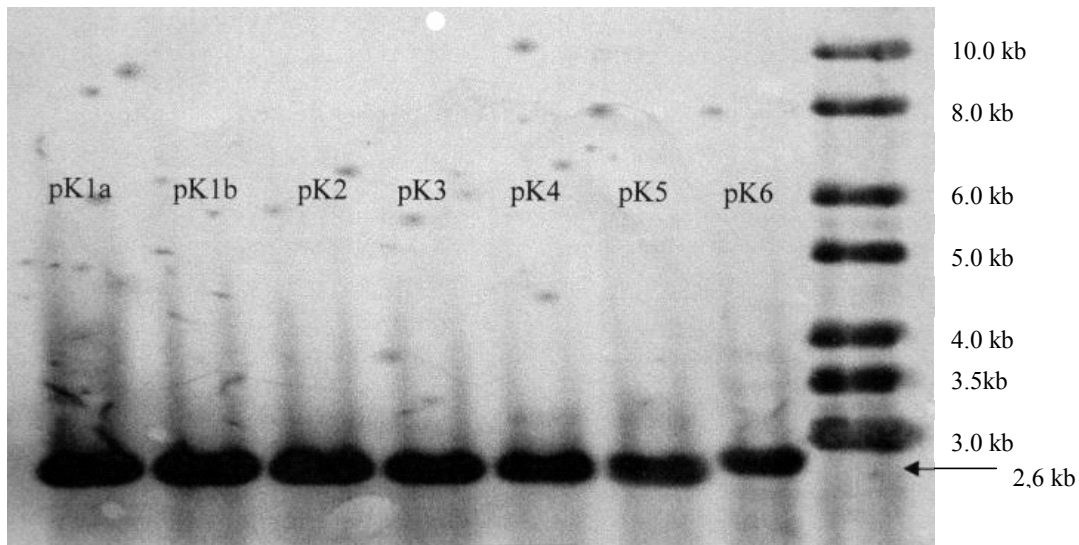
### 4.5.3 Nachweis durch Southern Blot

Mittels Southern Blot wurde die erfolgreiche Integration der Suicide-Plasmide zusätzlich spezifisch verifiziert. Wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben, wurde nach Verdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* die DNA im 0.7 % Agarosegel nach Fragmentgröße aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit dem mit Digoxigenin markierten linearisierten pK18-Vektor, so dass das hybridisierte Fragment mit alkalischer Phosphatase und mit Anti-Digoxigenin markierten Antikörpern mittels Farbreaktion nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis der Integration der Plasmide wurde bei beiden Verfahren, Mating und Elektroporation, durchgeführt. Abb. 20 zeigt das Ergebnis des Southern Blots nach dem Mating-Verfahren:



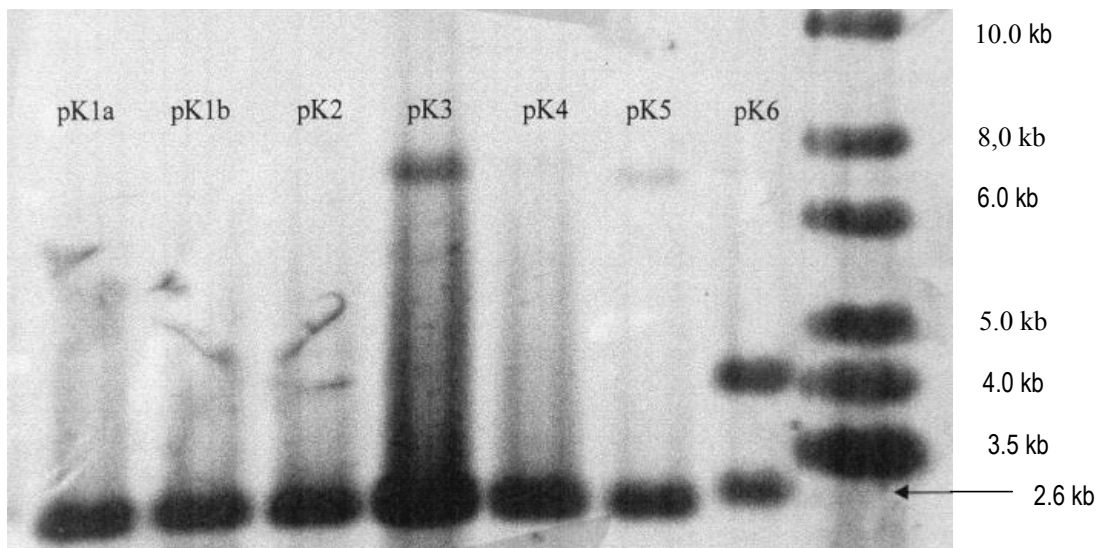
**Abb. 20: Southern Blot nach der Mating-Methode**

Als schwarze Banden dargestellt sind die Plasmide pK1-pK6, die aus dem 2,661 kb großen Plasmid pK18 und einem ca. 100 bp großen Insert hergestellt wurden. Bei pK2 und pK6 stellten sich zusätzlich weniger große Banden dar. Der mitgeführte Marker ist auf dieser Abbildung nicht mehr dargestellt. Diese Abbildung liefert den Beweis, dass mit dem Mating-Verfahren eine erfolgreiche Integration von Plasmid-DNA in chromosomale DNA möglich ist.



**Abb. 21: Blot von Elektroporation**

Abb. 21 liefert den Beweis für die erfolgreiche Integration der Plasmide in die chromosomale DNA von *C. testosteroni* nach der Elektroporationsmethode. Als ca. 2,661 kb große Banden sind auch hier die Plasmide pK1a bis pK6 dargestellt. Bei diesem Suicide-Verfahren kam es nicht zur Darstellung von zusätzlichen Banden.



**Abb. 22: Stabilitätsnachweis**

Abb. 22 zeigt, dass auch nach 20-maliger Überimpfung die Integration der Plasmide stabil bleibt. Bei pK3 und pK6 stellten sich zusätzlich zwei neu aufgetretene Banden dar.

## 4.6 HPLC-Analyse

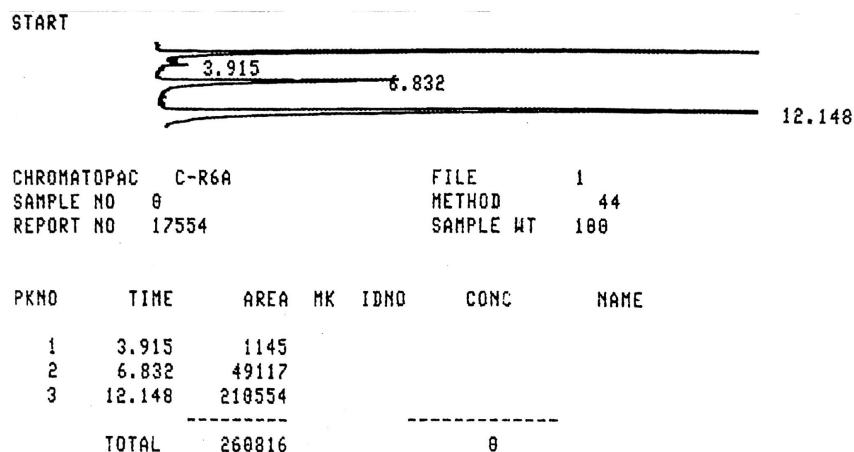
### 4.6.1 Allgemeines

Mit Hilfe der HPLC kann nach einem zeitlich definierten Substratumsatz die Menge an gebildetem Produkt pro Zeiteinheit, bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge, berechnet werden. Die Substratumsätze von Metyrapon wurden aus den Chromatogrammen der jeweiligen HPLC-Messung ermittelt und die spezifische Aktivität wie folgt berechnet werden:

$$\text{Spezif. Akt.} = \frac{\text{Substratumsatz } [\Delta \text{ Area}] \times \text{Messempfindlichkeit} \times 10}{\text{Faktor} \times \text{Inkubationszeit [min]} \times \text{Proteinkonzentration [mg/ml]}}$$

Die spezifische Aktivität enthält damit die Einheit  $\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Der Faktor stellt die Steigung der jeweiligen Eichkurve dar.  $\Delta$  Area ergibt sich aus der Differenz der integrierten Peakflächen von Substrat und Metabolit.

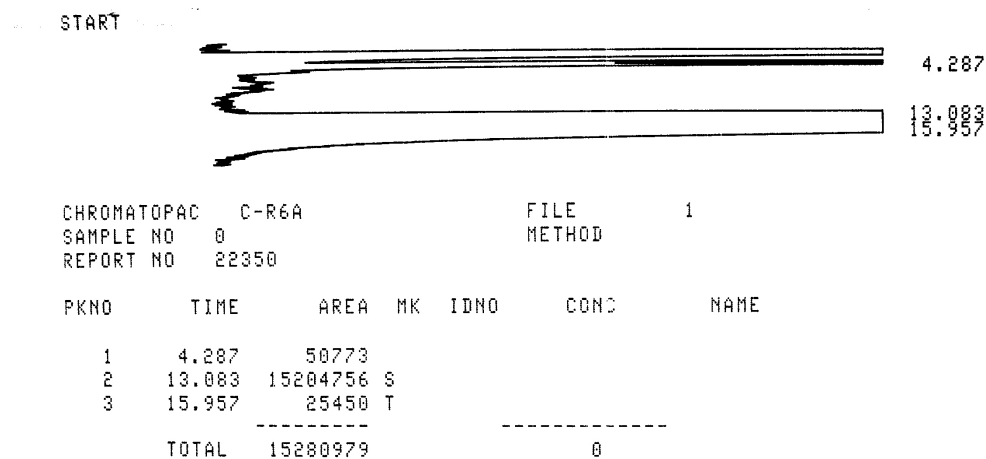
Abb. 23 zeigt das Chromatogramm des Umsatzes von 0,2mM Metyrapon durch die rekombinante 3 $\alpha$ -HSD (1,1 $\mu$ g im Ansatz) nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C. Zu sehen ist der Substratpeak (Retentionszeit: 12,148 min) und der Peak des Metaboliten Metyrapol (Retentionszeit: 6,832 min). Zusätzlich sind die dazugehörigen Area-Werte als integrierte Peakflächen angegeben (Möbus, 1999).



**Abb. 23: Chromatogramm des Umsatzes von 0,2mM Metyrapon durch die rekombinante *hsdA***

#### 4.6.2 Ergebnisse der HPLC-Messungen dieser Arbeit

Abb. 24 zeigt, stellvertretend für alle in dieser Arbeit durchgeführten HPLC-Messungen, dass keine Aktivität der 3 $\alpha$ -HSD ermittelt werden konnte.



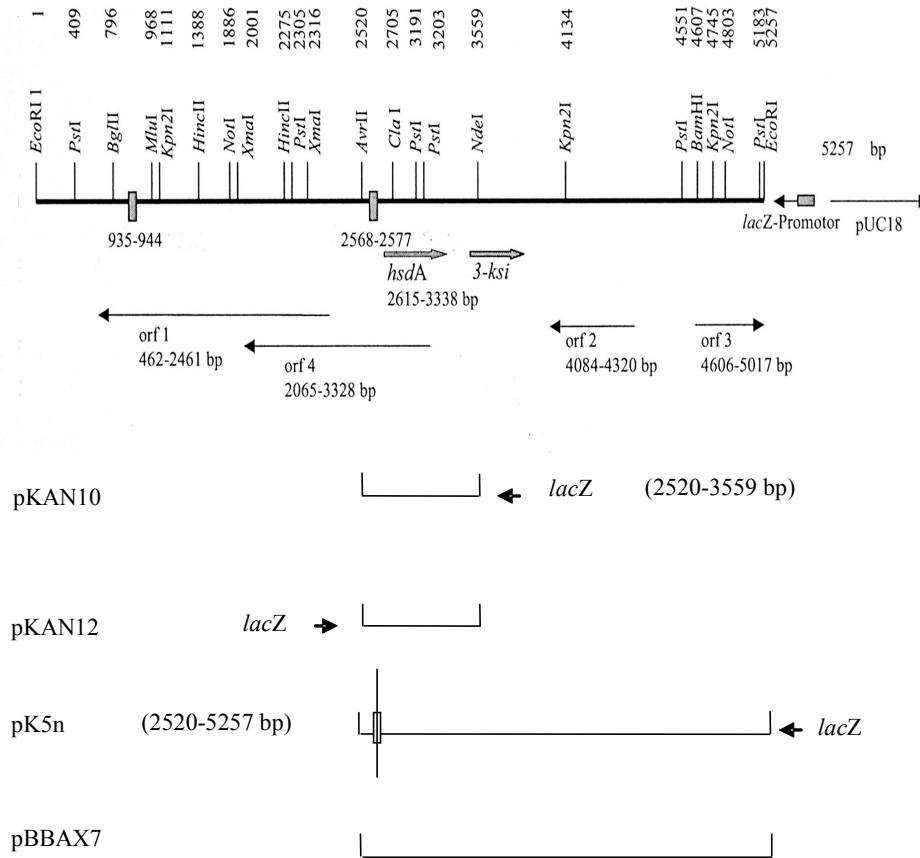
#### Abb. 24: HPLC

Dargestellt ist der Umsatz von 0.2 mM Metyrapon durch das in die chromosomale DNA integrierte Plasmid pK6 nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C. Es ist kein Peak des Metaboliten Metyrapol bei 6 min zu erkennen. Dieses Ergebnis entspricht dem der anderen Analysen.

#### 4.7 Untersuchung der Enzymexpression der 3 $\alpha$ -HSD durch ELISA

Zur Messung der Enzymexpression der 3 $\alpha$ -HSD in *C. testosteroni* wurde von G. Xiong (2000) ein ELISA entwickelt (im Teil „Material und Methoden“ erläutert). Dieses Verfahren wurde in dieser Arbeit angewendet, um über die Auswirkung der Integration der so genannten „Suicide-Plasmide“ auf die Enzymexpression Aufschluss über die Genregulation dieses wichtigen Schlüsselenzyms zu erhalten. Gemessen wurde dafür die Proteinmenge der 3 $\alpha$ -HSD-Expression.

Neben den in die chromosomale DNA von *Comamonas testosteroni* integrierten Plasmiden wurden drei weitere Plasmide mit in die Untersuchung der Enzymexpression mittels ELISA aufgenommen. Sie existieren als freie Plasmide in *E. coli*: pK5n, pKAN10 und pBBAX7 (zur Herstellung dieser Plasmide siehe Kapitel 4.1, Abb. 25). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und 3 dargestellt.



**Abb. 25 Schematische Darstellung der neben pK1-pK6 für den ELISA benutzten Plasmide**

Zum einen wurden Proteinmengen von frei in *E. coli* bzw. in *C. testosteroni* sich replizierender Plasmide gemessen (mit \* versehen); zum anderen lag der Schwerpunkt der Untersuchung auf der Messung der Proteinmengen nach Integration in die chromosomale DNA von *C. testosteroni*.

**Tab. 2: Menge der *hsdA*-Genexpression in *C. testosteroni***

[µg/ml]	pK1a	pK1b	pK2	pK3	pK4	pK5	pK6
Mating I mit AB	2,8 SD +/- 0,58	3,3 SD +/- 0,17	2,76 SD +/- 0,2	2,68 SD +/- 0,21	2,0 SD +/- 0,13	1,46 SD +/- 0,13	3,38 SD +/- 0,17
Elektroporation I mit AB	2,35 SD +/- 0,04	3,15 SD +/- 0,16	2,73 SD +/- 0,26	3,37 SD +/- 0,13	3,28 SD +/- 0,19	3,22 SD +/- 0,16	4,17 SD +/- 0,43
Elektroporation XX mit AB	1,39 SD +/- 0,21	2,15 SD +/- 0,27	2,01 SD +/- 0,19	2,13 SD +/- 0,24	2,69 SD +/- 0,21	2,0 SD +/- 0,14	3,52 SD +/- 0,37
Elektroporation I ohne AB	2,35 SD +/- 0,04	3,15 SD +/- 0,16	2,73 SD +/- 0,26	3,37 SD +/- 0,13	3,28 SD +/- 0,19	3,22 SD +/- 0,16	4,17 SD +/- 0,43
Elektroporation V ohne AB	1,7 SD +/- 0,14	2,72 SD +/- 0,34	2,22 SD +/- 0,16	1,8 SD +/- 0,12	2,5 SD +/- 0,12	2,5 SD +/- 0,22	2,69 SD +/- 0,2
Elektroporation XX ohne AB	1,32 SD +/- 0,19	1,79 SD +/- 0,46	1,56 SD +/- 0,22	0,98 SD +/- 0,09	1,65 SD +/- 0,06	1,0 SD +/- 0,18	1,66 SD +/- 0,18

**Tab. 3: Menge der *hsdA*-Genexpression in *C. testosteroni* und *E. coli***

\* diese Plasmide sind nicht in die chromosomale DNA integriert

[µg/ml]	Elektroporation in Glycerin		8 Wochen Lagerung bei - 80°C	
pKAN12 in <i>C. test.</i>	2,33	SD +/-0,11		
pKAN12* in <i>E. coli</i>	13,9	SD +/-0,99	12,5	SD +/-0,19
pK6 in <i>C. test.</i>	2,85	SD +/-0,2	1,94	SD +/-0,03
pK5n in <i>C. test.</i>	3,18	SD +/-0,21	4,7	SD +/-0,32
pK1a in <i>C. test.</i>	2,35	SD +/-0,04		
pK5n* in <i>E. coli</i>	5,07	SD +/-0,62		
pKAN10* in <i>E. coli</i>	0,53	SD +/-0,04		
pBBAX7* in <i>C. test.</i>	14,57	SD +/-0,05	34,88	SD +/-0,02

SD=Standardabweichung, AB=Antibiotika



Die *hsdA*-Genexpression (Tab. 2) war in pK1b höher als in pK1a, sowohl nach der Mating- als auch nach der Elektroporations-Methode. Die Ursache dafür liegt möglicherweise in der Richtung des *lacZ*-Promotors, der in dem Plasmid pK1a in entgegengesetzter Richtung des 3 $\alpha$ -HSD-Gens liegt, in pK1b jedoch in gleicher Richtung.

Trotz der vollständigen Zerstörung des *orf2* mit möglicher Repressorfunktion durch pK3 konnte keine höhere Genexpression gemessen werden, wodurch die Funktion dieses Genabschnittes als Repressor zumindest auf DNA-Ebene zu diskutieren ist.

Auch die Integration der Plasmide pK2 und pK4 stromauf- und stromabwärts des *orf4*, sowie pK5 innerhalb *orf3* konnten zu keiner eindeutigen Beeinflussung der Genexpression führen.

Die Integration von pK6, dessen *lacZ*-Promotor genau vor dem Beginn der *hsdA* und hinter dem Operator lokalisiert wurde, zeigte die höchste Genexpression, sowohl nach der Mating, als auch nach der Elektroporationsmethode.

Zusätzlich wurde die Stabilität der Suicide-Plasmide nach 20 Generationen sowohl in Kulturen mit Antibiotika als auch ohne überprüft. Wie auch schon im Southern Blot beobachtet, sind integrierten Plasmide stabile und zeigen vergleichbare Mengen an *hsdA*-Genexpression.

Tabelle 3 zeigt die Unterschiede in der Menge der *hsdA*-Genexpression auf, je nach dem, ob das Plasmid frei in *E. coli* existiert oder ob das jeweilige Plasmid in die chromosomale DNA von *C. testosteroni* integriert ist. Das Plasmid pKAN12, dessen *lacZ*-Promotor in Richtung der 3 $\alpha$ -HSD lokalisiert ist (s. Abb. 24) weist in *E. coli* eine sechsfach höhere Menge an Genexpression auf als dasselbe Plasmid nach Integration in die DNA von *C. testosteroni*. Das Plasmid pKAN10, dessen *lacZ*-Promotor in entgegengesetzter Richtung zur 3 $\alpha$ -HSD lokalisiert ist, weist in *E. coli* wie erwartet eine sehr niedrige Genexpression auf. Die Plasmide pK6 und pK1a wiesen eine ähnlich niedrige Genexpression auf. Dies legt den Schluss nahe, dass der *lacZ*-Promotor in *C. testosteroni* nicht gut erkannt wird. Eine Ausnahme bildet das Plasmid pBBAX7, das in der Lage ist, in *C. testosteroni* frei zu replizieren. Durch die Ausschaltung der Operatorregion als Bindungsmöglichkeit für *orf4*/Repressor A (s. Xiong et al., 2001) konnte eine hohe Menge an Genexpression gemessen werden.

In pK5n ist der *lacZ*-Promotor in entgegengesetzter Richtung zur 3 $\alpha$ -HSD lokalisiert und 5 Nukleotide des Operatorbereichs fehlen. Dass Repressor A dadurch nicht mehr vollständig an den defekten Operatorbereich binden kann, zeigt sich in den höheren Mengen an *hsdA*-Expression, sowohl bei den in *E. coli* frei replizierenden Plasmide als auch bei den in *C. testosteroni* integrierten Plasmide (s. Tab.3).

#### **4.8 Auswirkung verschiedener Promotoren auf die Genexpression von *hsdA***

Bei dieser Untersuchung wurden sowohl Plasmide, die einen *lacZ*-Promotor aufweisen (pK1b, pK6, pKKp1), als auch Plasmide mit dem *tac*-Promotor (pKtac16, pKtacA8) in die chromosomale DNA von *C. testosteroni* mittels der schon beschriebenen Elektroporationsmethode integriert (Abb. 26).

Die Konstruktion der Plasmide pK1b und pK6 wurde bereits erläutert. Die Plasmide pKKp1 und pKtac16 enthalten den 3.023 kb großen Genabschnitt zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *KpnI* und das Gen von Repressor A und das Gen *hsdA*. Das Gen des Repressors B fehlte bei beiden Plasmiden. Der *tac*-Promotor des Plasmids pKtacA8 beginnt an der *AvrII*-Schnittstelle direkt vor dem Gen der 3 $\alpha$ -HSD. Der Operatorbereich ist nicht integriert.

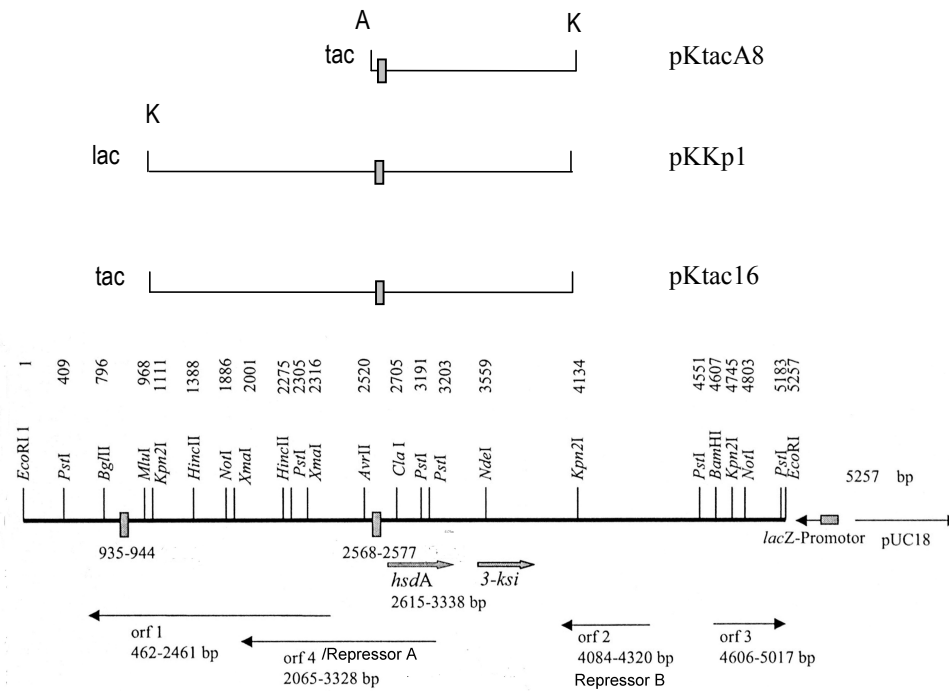
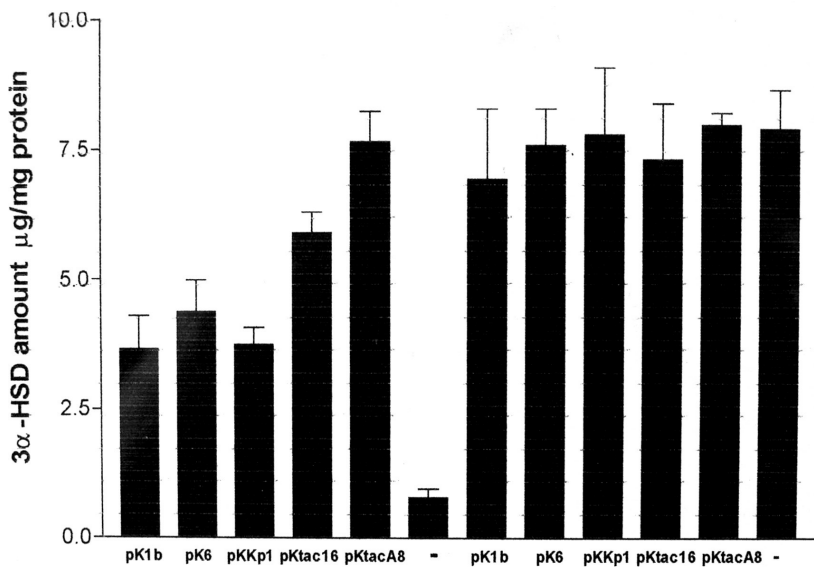


Abb. 26: Konstruktion von pKtacA8, pKKp1 und pKtac16



*C. testosteroni* + Testosteron 270 μg/ml

Abb. 27: Auswirkungen verschiedener Promotoren auf die Genexpression der *hsdA*

Nach Integration wurde mit Hilfe des ELISA die Menge an 3 $\alpha$ -HSD [ $\mu$ g/mg Protein] gemessen. Zusätzlich wurde die Menge der exprimierten *hsdA* unter Testosteronzugabe (270 $\mu$ g/ml) gemessen (s. Abb. 27). Außerdem sind die Auswirkungen der Promotoren *lac* und *tac* auf die Menge der 3 $\alpha$ -HSD zu sehen: Die Plasmide mit dem *tac*-Promotor weisen durchschnittlich eine höhere Proteinmenge auf als die Plasmide mit dem *lacZ*-Promotor. Die höchste Proteinmenge weist das Plasmid pK*tacA8* auf, da der *tac*-Promotor in unmittelbarer Nähe der 3 $\alpha$ -HSD lokalisiert ist und ein Teil des Operatorbereichs für den Repressor A fehlt. Der *lacZ*-Promotor der Plasmide pK1b und pK6 befindet sich ebenso in unmittelbarer Nähe zu dem Gen *hsdA* (s. Abb.13). Daher wäre auch eine hohe Genexpression und damit Proteinmenge zu erwarten. Diese Tatsache, dass nur sehr geringe Mengen zu verzeichnen sind, deutet darauf hin, dass der *lacZ*-Promotor keine besonders starke Wirkung in *C. testosteroni* entfaltet.

Nach Induktion der oben genannten Plasmide mit Testosteron (270 $\mu$ g/ml) steigt die Proteinmenge an 3 $\alpha$ -HSD bei allen Plasmiden etwa gleich an. Dieser Sachverhalt spiegelt die Ergebnisse von Xiong et al. wieder, dass die Expression der 3 $\alpha$ -HSD über eine De-Repression reguliert wird.

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Aufschluss über die Regulationsmechanismen der  $3\alpha$ -HSD aus dem Bakterium *Comamonas testosteroni* ATCC 11996 mittels so genannter Suicide Plasmide zu erhalten.

In *Comamonas testosteroni* stellt die  $3\alpha$ -HSD ein Schlüsselenzym dar, das als kataboles Enzym in der Lage ist, komplexe Kohlenwasserstoffverbindungen zu mineralisieren. Dazu zählen auch insbesondere Steroide und steroidähnliche Verbindungen. Bei ihrer Anwesenheit kommt es zur verstärkten Genexpression der  $3\alpha$ -HSD, die unter der Kontrolle der Substrate selbst steht (Talalay et Wang, 1955; Wacker et al., 1965; Watanabe et al., 1973).

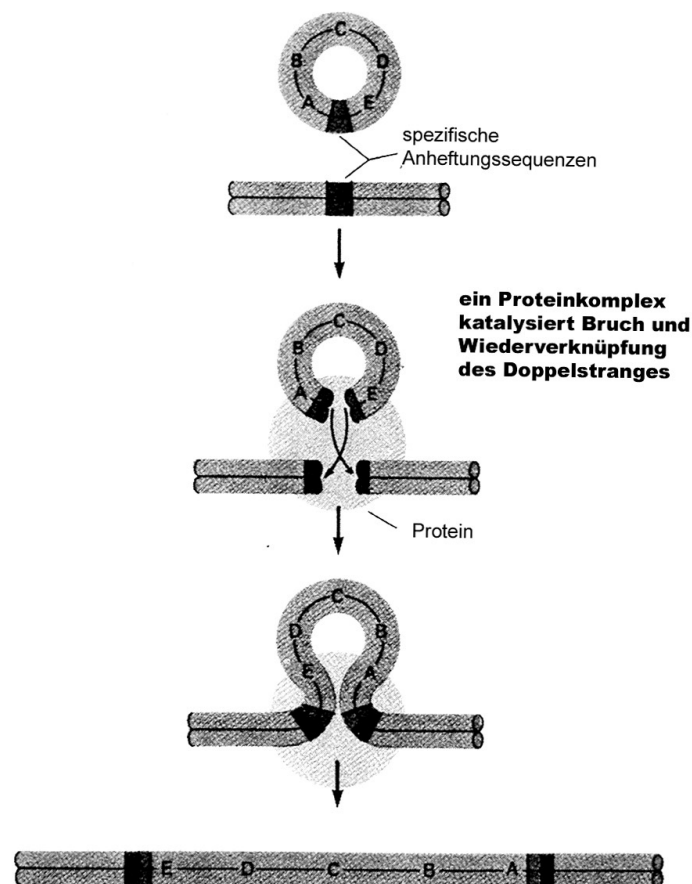
Für die Untersuchungen wurde ein schon für frühere Experimente verwendetes 5257 kb *EcoRI*-Fragment, das von chromosomaler DNA von *Comamonas testosteroni* isoliert wurde (Möbus et Maser, 1998), verwendet. Das Fragment enthält sowohl die Gensequenz für die  $3\alpha$ -HSD (*hsdA*), als auch für ein weiteres am Steroidstoffwechsel beteiligtes Enzym, die 3-Ketosteroid-Isomerase (*3-ksi*) und verschiedene offenen Leserahmen (*orf1-4*, s. Abb. 12).

In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Funktion des *orf2/Repressor B*; aber auch andere Genabschnitte im Bereich der  $3\alpha$ -HSD wurden mit in die Experimente einbezogen (s. Abb. 13).

#### 5.1.1 Methodik: Suicide Plasmide

Die Unterbrechung chromosomaler oder Plasmid-DNA kann sehr wichtig sein für eine große Vielfalt genetischer Experimente. Einige Ansätze sind bereits beschrieben, sowohl in *E. coli* (Winans et al., 1995; Shevell et al., 1988, Russel et al., 1989), als auch in einer Vielzahl anderer Bakterien (Ruvkun and Ausubel, 1991; Chater and Bruton, 1993; Miller and Mekalanos, 1988; Stibitz et al., 1989). Auch mit Genen eukaryontischer Kerne und Organellen sind diese Experimente beschrieben worden (Shortle et al., 1982; Schwartzberg et al., 1989, Goldschmidt, 1991; Newman et al., 1991; Lorenz et al., 1995; Nargang et al., 1995).

Das Prinzip der Suicide Plasmide ist in Abb. 28 dargestellt: Es werden spezielle Plasmide hergestellt, die DNA-Fragmente aus dem zu untersuchenden Genabschnitt enthalten. Durch einen Proteinkomplex werden sowohl Plasmid-DNA als auch chromosomale DNA aufgetrennt und anschließend beide DNA-Doppelstränge kreuzweise wieder verknüpft (cross linking). Somit ist diese spezifische Stelle der DNA durch die Integration der Plasmid DNA „zerstört“.



**Abb.28: Prinzip der Suicide Plasmide (cross linking)**

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Suicide Plasmide (pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6) hergestellt und in verschiedene Genabschnitte des schon genannten 5.275 kb-*EcoRI*-Fragments aus *C. testosteroni* cloniert. Das Insert PCR1 für das Plasmid pK1

wurde in zwei entgegengesetzten Promotorrichtungen cloniert, so dass man pK1a (der *lacZ*-Promotor befindet sich in entgegengesetzter Richtung zur 3 $\alpha$ -HSD) und pK1b (der *lacZ*-Promotor ist in Richtung 3 $\alpha$ -HSD lokalisiert) unterscheiden muss. Die Integration der Plasmide erfolgte an Genabschnitten, von denen vermutet wurde, dass sie für die Genregulation der 3 $\alpha$ -HSD eine Bedeutung haben könnten:

Plasmide pK1a und pK1b wurden bei 2519 bp (*AvrII*-Schnittstelle 2520 bp) vor den Operator- und Promotorbereich der 3 $\alpha$ -HSD integriert. Das Ziel dabei war, Operator- und Promotorbereich voneinander zu entfernen und den *lacZ*-Promotor in die Nähe der 3 $\alpha$ -HSD zu lokalisieren (pK1b). Es wurde somit ein Anstieg der Genexpression von *hsdA* erwartet.

Plasmid pK2 wurde bei 3980 bp stromaufwärts von orf2 (4048-4320 bp) integriert. Falls orf 2 eine Repressorfunktion auf DNA-Ebene hat, wäre durch die Vergrößerung des Abstandes zwischen beiden Genabschnitten ein Anstieg der Genexpression zu erwarten.

Plasmid pK3 wurde bei 4170 bp in die chromosomale DNA integriert. Damit wäre die Repressorfunktion von orf2 komplett aufgehoben.

Plasmid pK4 wurde am Ende von orf2 integriert bei 4320 bp. Durch die Positionierung von *lacZ* in Richtung des orf2-Gens könnte man eine erhöhte Repressoraktivität erwarten.

Plasmid pK5 wurde bei 4800 bp integriert. Dieses Suicide Plasmid führt zur Inaktivierung von orf3, dessen Funktion noch ungeklärt ist.

Plasmid pK6 wurde bei 2578 bp integriert, direkt hinter den Operator (OP2) und vor *hsdA*. Damit ist der *lacZ*-Promotor direkt vor *hsdA* (2516bp) lokalisiert und orf4 zerstört: Eine deutlich höhere Genexpression der 3 $\alpha$ -HSD ist zu erwarten.

### **5.1.2 Diskussion zu den Ergebnissen der Integration der Suicide-Plasmide**

Um die Integration der Suicide Plasmide zu erreichen, wurden zwei Methoden verwendet und auf ihren Erfolg überprüft: Die Mating-Methode und die Methode durch Elektroporation. Beide Methoden erwiesen sich als gleichwertig, die Ergebnisse unterschieden sich bei den angewendeten Methoden nicht.

Der kulturelle Nachweis ist in der Abb. 16 (Mating-Methode) und in Abb. 17 (Elektroporationsmethode) dargestellt: Dadurch, dass die integrierten Plasmide ein Kanamycin-resistenzgen (s. Abb. 10) tragen, *Comamonas testosteroni* jedoch nur gegen Ampicillin resistent ist, können nur die *C. testosteroni*-Kulturen auf einer Agarplatte mit beiden Antibiotika wachsen, die Plasmid-DNA enthalten.

Der Nachweis mittels PCR ist in Abb. 19 dargestellt. Die Strategie der Primerauswahl (s. Abb. 18) ist so gewählt, dass die Primer zum Teil Plasmid-DNA, zum Teil chromosomale DNA enthalten. Stellvertretend für alle verwendeten Plasmide sind in Abb. 19 pK1a und pK1b dargestellt. Anhand des mitgeführten Markers, einer Negativkontrolle und *C. testosteroni* ohne Plasmid lassen sich die Größen der Banden ablesen.

Der Nachweis mittels Southern Blot erfolgte sowohl von Proben aus der Mating- als auch aus der Elektroporations-Methode. In den Abb. 20 und 21 sind Banden mit einer Größe von ca. je 2.6 kb zu erkennen, die den integrierten Plasmiden entsprechen. Zusätzliche Banden sind bei den Plasmiden pK2 und pK6 aufgetreten, die sich nicht sicher erklären lassen. Möglicherweise sind diese Banden durch unvollständigen Verdau entstanden.

Zusätzlich wurde die Stabilität der integrierten Plasmide mittels Southern Blot untersucht. In Abb. 22 ist das Ergebnis nach 20 Generationen dargestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Integration der Plasmide sowohl mit als auch ohne Antibiotikazusatz stabil blieb. Es zeigten sich auch hier zusätzliche Banden: In der Mutante pK3 bei 7 kb und in pK6 bei 4,25 kb. Man könnte vermuten, dass sich bestimmte Genabschnitte zu größeren Abschnitten neu angeordnet haben.

### **5.1.3 Diskussion zur den Ergebnissen der HPLC und ELISA**

Die Methode der HPLC wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser beschrieben und zur spezifischen Aktivitätsmessung der 3 $\alpha$ -HSD eingesetzt (Oppermann et Maser, 1996; Möbus et Maser, 1998; Xiong et Maser, 2001). Die Grundaktivität liegt bei 6.101 nmol/mg/min. Diese Grundaktivität erklärt sich aus der Tatsache, dass in dem Plasmid p6, das eine Länge von 5275 bp aufweist und in pUC18 kloniert wurde (s. Abb. 12), alle regulatorischen Elemente für *hsdA* enthalten sind.



In Abb. 24 ist der Umsatz von 0,2 mM Metyrapon durch das in die chromosomale DNA integrierte Plasmid pK6 nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C dargestellt. Es ist kein Peak des Metaboliten Metyrapol bei 6 min zu erkennen. Dieses Ergebnis entspricht dem der anderen Analysen. Wir gehen davon aus, dass die Empfindlichkeit der HPLC-Methode nicht ausreichend war, den Metaboliten Metyrapol zu bestimmen (Empfindlichkeits-Minimum: 0,2 nmol/mg/min), da die Aktivität der 3 $\alpha$ -HSD nicht im Plasmid, sondern in der Gesamt-DNA von *C. testosteronei* gemessen wurde. Zusätzlich könnte der *lacZ*-Promotor eine Rolle spielen, der möglicherweise nicht gut in *C. testosteronei* erkannt wird (s. 1.1.4 Vergleich der Ergebnisse der ELISA-Messungen bei Plasmiden mit den Promotoren *tac* und *lac*).

Alternativ kann der Nachweis der quantitativen Proteinexpression ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) der 3 $\alpha$ -HSD mit Hilfe des ELISA geführt werden (Xiong et Maser, 2001; Xiong et al., 2001). Die Ergebnisse sind in Tab. 2 und Tab. 3 dargestellt.

Bei dem Vergleich der Mutanten pK1a (*lacZ*-Promotor in entgegengesetzter Richtung zu *hsdA*) und pK1b (*lacZ* in gleicher Richtung wie *hsdA*) kam es bei pK1b in allen Untersuchungen zu höheren Genexpressionen als bei pK1a. Diese Tatsache ist durch die Lage des *lacZ*-Promotors zu erklären.

Die Mutante pK6 wurde so integriert, dass der *lacZ*-Promotor direkt vor der 3 $\alpha$ -HSD positioniert wurde, aber noch vor dem Operatorbereich (OP2). Es konnte im Vergleich zu pK1b eine höhere Genexpression gemessen werden.

Die Plasmide pK1a, pK1b und pK6 wurden in den Bereich orf4/Repressor A (2065-3328 bp) integriert, so dass man von einer Zerstörung dieses Genabschnittes ausgehen müsste. Die Ergebnisse anderer Arbeiten zeigten jedoch, dass das aktive Zentrum von Repressor A im Bereich von 2705-3327 bp liegt (Xiong et al., 2003). Die oben genannten Plasmide wurden stromaufwärts davon integriert.

Durch die Mutante pK3 sollte die Funktion von orf2/Repressor B vollständig zerstört werden; es konnte jedoch keine signifikant erhöhte 3 $\alpha$ -HSD Expression gemessen werden. Das integrierte Plasmid zeigte zudem eine gewisse Instabilität, wie aus dem Ergebnis des Southern Blots zu erkennen ist (s. Abb. 20).

Die Mutanten pK2 und pK4 zeigten überhaupt keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression.

Die Mutante pK5, die orf3 zerstörte, zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression der 3 $\alpha$ -HSD. Über die Rolle von orf3 in Bezug auf die Regulation von *hsdA* ist zurzeit noch wenig bekannt.

Tab. 3 zeigt die Unterschiede in der Menge der *hsdA*-Genexpression auf, je nach dem, ob das Plasmid frei in *E. coli* existiert oder ob das jeweilige Plasmid in die chromosomale DNA von *C. testosteroni* integriert ist. Das Plasmid pKAN12, dessen *lacZ*-Promotor in Richtung der 3 $\alpha$ -HSD lokalisiert ist (s. Abb. 24), weist in *E. coli* eine sechsfach höhere Menge an Genexpression auf als dasselbe Plasmid nach Integration in die DNA von *C. testosteroni*. Das Plasmid pKAN10, dessen *lacZ*-Promotor in entgegengesetzter Richtung zur 3 $\alpha$ -HSD lokalisiert ist, weist in *E. coli* wie erwartet eine sehr niedrige Genexpression auf. Alle anderen untersuchten Plasmide (pK6, pK5n und pK1a) wiesen eine ähnlich niedrige Genexpression auf. Dies legt den Schluss nahe, dass der *lacZ*-Promotor in *C. testosteroni* nicht gut erkannt wird

Eine Ausnahme bildet das Plasmid pBBAX7, das in der Lage ist, in *C. testosteroni* frei zu replizieren. Durch die Ausschaltung der Operatorregion als Bindungsmöglichkeit für orf4/Repressor A (s. Xiong et al., 2001) konnte eine hohe Menge an Genexpression gemessen werden.

#### 5.1.4 Diskussion zu den Promotoren *tac* und *lac*

Der *tac*-Promotor wurde nach Verdau von pHA10 mit *Bam*HI isoliert. pHA10 ist ein 12,1 kb großer Expressionsvektor mit dem Gen für eine Ampicillinresistenz (Arai et al., 1991), dessen *tac*-Promotor sowohl in *E. coli* als auch in *Comamonas testosteroni* eine starke Wirkung entfalten kann. In Abb. 26 ist die Konstruktion der Plasmide pKKp1, pKtacA8, pKtac16 dargestellt: pKKp1 besitzt den *lacZ*-Promotor und enthält den Genabschnitt von Repressor B und der 3 $\alpha$ -HSD. pKtac16 enthält die gleichen Gensequenzen wie pKKp1, besitzt aber den *tac*-Promotor. pKtacA8 besitzt den *tac*-Promotor und nur den Genabschnitt der 3 $\alpha$ -HSD; der Operatorbereich fehlt komplett.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der *tac*-Promotor von *C. testosteroni* erkannt wird und dort eine stärkere Wirkung entfaltet als der *lacZ*-Promotor. Dieser

Sachverhalt wird in Abb. 27 deutlich, in der die Ergebnisse der Messungen zur Genexpression der 3 $\alpha$ -HSD mittels ELISA dargestellt sind. Die Plasmide mit dem *tac*-Promotor weisen durchschnittlich eine höhere Proteinmenge auf als die Plasmide mit dem *lacZ*-Promotor. Die höchste Proteinmenge weist das Plasmid pKtacA8 auf, da der *tac*-Promotor in unmittelbarer Nähe zur 3 $\alpha$ -HSD lokalisiert ist und ein Teil des Operatorbereichs für den Repressor A fehlt. Der *lacZ*-Promotor der Plasmide pK1b und pK6 befindet sich ebenso in unmittelbarer Nähe zu dem Gen *hsdA* (s. Abb.13). Daher wäre auch eine hohe Genexpression und damit Proteinmenge zu erwarten. Diese Tatsache, dass nur sehr geringe Mengen zu verzeichnen sind, deutet darauf hin, dass der *lacZ*-Promotor keine besonders starke Wirkung in *C. testosteroni* entfaltet.

Nach Induktion der oben genannten Plasmide mit Testosteron (270  $\mu\text{g/ml}$ ) steigt die Proteinmenge an 3 $\alpha$ -HSD bei allen Plasmiden etwa gleich an. Dieser Sachverhalt spiegelt die Ergebnisse von Xiong und Maser (2003) wieder: Die Expression der 3 $\alpha$ -HSD scheint über eine De-Repression reguliert zu werden.

### 5.1.5 Diskussion zu den möglichen Repressoren der 3 $\alpha$ -HSD

Wie im Ergebnisteil schon erläutert, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser zur Eingrenzung einer möglichen Operatorregion durch Computeranalysen zwei je 10 Nukleotide umfassende, pallindromische Sequenzen gefunden. Sie liegen im Abstand von 1,633 kb zueinander (OP1: 0,935 kb-0,944 kb, OP2: 2,568-2,577 kb, s. Abb. 12). OP2 findet sich 9 bp stromaufwärts des Promotors von *hsdA*. Der Transkriptionsstart von *hsdA* konnte 28 bp stromaufwärts vom Translationsstart identifiziert werden (Xiong et al., 2001). Die Promotorregion befindet sich innerhalb der 93 bp-Region stromaufwärts von *hsdA* (Xiong et al., 2001). Weiterhin konnte in der Arbeit von C. Schäfers (2005) gezeigt werden, dass an OP1 und OP2 eine spezifische Proteinbindung im Electrophoretic mobility assay (EMSA) erfolgt. Dort könnte somit eine Operatorfunktion vorliegen. Sie konnte auch zeigen, dass der aktiv bindende Operatorbereich sich nicht nur auf die pallindromische Sequenz OP2 erstreckt, sondern diese enthält und sich darüber hinaus auf die benachbarten Bezirke ausdehnt. Die Arbeitsgruppe hat zusätzlich festgestellt, dass in erster Linie ein Protein, das im Bereich von *orf4* (2,065-3,328 kb) liegt, als Repressorprotein (Repressor A) fungieren könnte. We-

der Proteine, die von orf2 noch orf3 codiert werden, zeigten eine Bindungsaktivität an die verwendete DNA von *C. testosteroni*.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von orf2/Repressor B. Nachdem keine signifikanten Ergebnisse mittels der Suicide-Plasmid-Methode erzielt werden konnten, die den oben genannten Ergebnissen der Arbeitsgruppe entsprachen, konnte in weiteren Experimenten ein Repressorprotein, ausgehend von orf2, gefunden werden, das ca. 78 Aminosäuren enthält, eine geschätzte molekulare Masse von 8,8 kDa aufweist und seine repressorische Aktivität auf mRNA-Ebene entfaltet (Xiong, et al., 2003).

## 5.2 Genregulation in Bakterien

Da bei Bakterien unvorhersehbare Schwankungen in der Nährstoffversorgung vorkommen, ist es essentiell, schnell auf diese Veränderungen reagieren zu können. Neben der Schnelligkeit ist auch die Wirtschaftlichkeit von entscheidender Bedeutung, da es nachteilig wäre, energieaufwendige Stoffwechselwege in Gang zu setzen, um auf die veränderten Umweltbedingungen reagieren zu können. Diese Art der Regulation wird durch die so genannte Induktion vollbracht, bei der bestimmte Enzyme nur dann synthetisiert werden, wenn das entsprechende Substrat vorhanden ist. Das Substrat funktioniert dabei als Induktor. In Abwesenheit des Induktors wird das Operon auf einem sehr niedrigen Grundniveau transkribiert. Sobald ein Induktor vorhanden ist, wird die Transkription gestartet. Die Menge an mRNA steigt dann auf ein bestimmtes Niveau, das einem Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der mRNA entspricht. Da die gebildete mRNA meist sehr instabil ist und eine niedrige Halbwertszeit besitzt, lässt sich die Induktion zügig wieder rückgängig machen, bis das Grundniveau an zu bildender mRNA erreicht ist. Dieser Zusammenhang erklärt, warum Bakterien auf Änderung des Nährstoffangebots so schnell reagieren können.

Das *lac*-Operon in *Escherichia coli* ist ein Paradebeispiel für diese Art von Kontrollmechanismus. Dieses grundlegende Konzept für die Kontrolle der Transkription in Prokaryonten wurde von Jacob und Monod (1961) postuliert. Das *lac*-Operon besteht aus einem Cluster von drei Genen (*lacZYA*), die der Verstoffwechslung von Laktose in *Escherichia coli* dienen. Die Transkription dieser drei Gene wird durch ein Repressor-

gen bestimmt, das vom Gen *lacI* exprimiert wird. Dieses Gen hat eine unabhängige Transkription mit eigenen regulatorischen Sequenzen. Es handelt sich um einen klassischen *trans*-agierenden Regulator. Das Repressorprotein (LacR) kann sich zu einem Tetramer zusammenlagern und besteht dann aus vier identischen Untereinheiten à 38 kDa. Modellhaft erklärt, bindet es an eine *cis*-agierende Sequenz, den Operator ( $O_{lacI}$ ), der zwischen dem Promotor ( $P_{lac}$ ) und den Strukturgenen (*lacZYA*) liegt. In diesem Fall überlappt die Operatorregion mit der des Promotors. Er erstreckt sich von -5 stromaufwärts bis +21 bis in die Transkriptionseinheit hinein (Miller et Reznikoff, 1978)

Eine häufige Kontrollmöglichkeit bei Bakterien ist die negative Regulation, bei der ein Repressorprotein die Expression eines Gens verhindert. Die Transkription eines Genabschnittes wird durch Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor initiiert, und zwar solange, bis das Repressorprotein an den Operator, der sich in der Nähe des Promotors befindet, bindet. Damit wird die RNA-Polymerase an der Initiation der Transkription gehindert. Die Genexpression ist abgeschaltet. Außerdem sind bakterielle Gene häufig in Clustern organisiert.

Bei der positiven Kontrolle benötigt die RNA-Polymerase einen Transkriptionsfaktor, um an den Promotor binden und die Transkription initiieren zu können. Das Gen ist also zunächst inaktiv. Erst die Bindung einiger oder aller *trans*-wirkender Faktoren (Genprodukte, die vom Ort ihrer Synthese wegdiffundieren und an einer anderen Stelle wirken), deren Zielstellen sich in der Nähe des Promotors befinden, ermöglicht es der RNA-Polymerase, die Transkription zu starten.

Zusammenfassend besteht das gemeinsame Prinzip darin, dass die Regulatorgene *trans*-wirkende Faktoren sind, die *cis*-wirkende Elemente stromaufwärts des Gens erkennen. Abhängig von der Art des jeweiligen Regulatorproteins, werden die Gene aktiviert oder reprimiert. Interessanterweise sind die entscheidenden Erkennungssequenzen für die Proteine viel kürzer als die gesamte Strecke, die sie an die DNA bindet. Die entscheidende Erkennungssequenz der Polymerase bei der Initiation liegt um die Positionen -35 und -10, obwohl sie insgesamt mehr als 70 bp bedeckt.

Schon Möbus et al. haben 1997 gezeigt, wie *Comamonas testosteroni* auf verschiedene Nährstoffangebote reagiert. Als Bodenbakterium ist es ständig wechselnden Bedingun-

gen durch Temperaturwechsel, Trockenheit oder Überangebot an Wasser und wechselndes Nahrungsangebot ausgesetzt. Es kann sich sogar in einem völlig anderen Milieu wie dem menschlichen Gastrointestinaltrakt vermehren. Um ein Überleben in diesen verschiedenen Lebensräumen zu ermöglichen, haben sich verschiedene Enzymsysteme entwickelt. Die fakultative Expression der steroid-metabolisierender Enzyme steht unter der Kontrolle der Steroide selbst, um möglichst ökonomisch zu existieren. Während man die Expressionssteigerung der steroidabbauenden Proteine erwarten konnte, zeigte sich auch die Induktion von Enzymen, die bei der Degradation polyzyklischer aromatischer Verbindungen eine Rolle spielen. Einige der testosteroninduzierten Proteine wurden bereits identifiziert; z.B. konnte die  $3\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase kloniert, sequenziert, überexprimiert und kristallisiert werden (Möbus und Maser 1998). Als Proteobakterium nutzt *C. testosteroni* ubiquitär vorhandene Aminosäuren als Energie- und Kohlenstoffquelle (Madigan et al. 1997).

Umgekehrt kann auch die endoge Synthese von Substraten an exogene Bedingungen angepasst werden. Falls ein Substrat, das normalerweise mit Hilfe eines Enzyms endogen hergestellt wird, plötzlich im Nährstoffmedium vorhanden ist, wird die Produktion des Enzyms sofort abgebrochen. Man nennt diesen Effekt Repression.

### 5.2.1 Repressoren in Bakterien

Der Repressor ist ein entscheidender Faktor im Regulationssystem. In Abwesenheit eines Induktors werden die Gene nicht transkribiert, da der Repressor in aktiver Form vorliegt und an den Operator bindet. Bei Anwesenheit eines Induktors wird der Repressor in eine inaktive Form umgewandelt. Dadurch wird der Operator freigegeben, und die Transkription kann am Promotor beginnen. Der Repressor besitzt also zwei Funktionen: Er kann einerseits die Transkription verhindern und andererseits den Induktor erkennen. Er muss also auch zwei Bindungsstellen haben. Bindet der Induktor an der entsprechenden Stelle, kommt es zu einer Konformationsänderung des Repressors, der nun nicht mehr an den Operator binden kann. Diese Art der Kontrolle nennt man allosterische Kontrolle. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse hat man sowohl die dreidimensionale Struktur mehrere bakterieller Repressoren, als auch deren spezifische Bindung an die Operator-DNA aufgeklärt. Die meisten dieser Proteine sind Homodimere, deren Monomere mit den Basen in einer Hälfte der Operator-DNA ähnliche Kontakte

bilden. Da die meisten dimeren Repressoren symmetrisch sind, stellen die meisten Operatoren kurze, umgekehrte Sequenzwiederholungen (inversed repeats) dar (Galan, 2003). Ein Operator besteht also aus zwei Hälften, von denen jede Hälfte ein Monomer des dimeren Repressorproteins bindet. Bei vielen dimeren Repressoren ragt eine  $\alpha$ -Helix – auch Erkennungshelix genannt – in die große Furche der DNA-Helix. Die meisten Aminosäureseitenketten, die mit der DNA in Kontakt treten, stammen von dieser Helix ab. Dass sich meistens Repressordimere ausbilden, liegt darin begründet, dass ein Repressormonomer zu wenige Wechselwirkungen ausbilden kann, um eine gewisse Stabilität mit der DNA zu bilden. Repressordimere können doppelt so viele Wechselwirkungen eingehen wie Monomere, so dass eine hohe Affinität zwischen Repressor und Operator besteht. Die Erkennungshelix ragt aus der Oberfläche des bakteriellen Repressors heraus und erkennt durch das Eindringen in die große Furche der DNA die DNA-Sequenz. Normalerweise wird sie zusätzlich mit einer zweiten  $\alpha$ -Helix stabilisiert. Dieses Strukturelement, das sich bei zahlreichen bakteriellen Repressoren findet, bezeichnet man als „helix-turn-helix-motif“ (Kimsey, 2003).

Es gibt allerdings auch Repressortetramere, die aus vier Monomeren bestehen. Der Arc-Repressor des Bakteriophagen P22 ist z.B. ein Tetramer, das mit den Basen des Operatorhalbelementes und der großen DNA-Furche über die Seitenketten zweier antiparalleler  $\beta$ -Stränge in Wechselwirkung tritt (Raumann et al., 1994). Die Repressoren LacR, FruR und RafR in *E. coli* können ebenso Tetramere ausbilden.

### **5.3 Bedeutung von *Comamonas testosteroni* in Medizin und Umwelt**

#### **5.3.1 Medizin**

Die Bedeutung von *Comamonas testosteroni* für die Humanmedizin ergibt sich aus den Substraten, die durch das Bakterium verstoffwechselt und abgebaut werden.

Dazu gehören die Steroide, die im menschlichen Organismus in Form von Gallensäuren, Cholesterin und Hormonen vorkommen. Erhöhte Serum-Cholesterinwerte sind eine der Ursachen für die so genannten „Volkskrankheiten“. Dazu gehören sämtliche Gefäßerkrankungen wie die koronare Herzkrankheit, die periphere arterielle Verschlusskrankheit oder die chronisch venöse Insuffizienz. Eine Senkung des LDL-Cholesterinspiegels um 10 % führt laut Studien zu einer Senkung der Letalität von Herzerkrankungen um

20 % (Yusuf et al., 1988). Das menschliche Cholesterin stammt aus zwei Quellen. Zum einen wird es durch die Nahrung aufgenommen, zum anderen stammt es aus der endogenen Cholesterinsynthese des Körpers (ca. 1,0g pro Tag). Von der mit der Nahrung zugeführten Cholesterinmenge werden nur ca. 40 % resorbiert. 60 % der aufgenommenen Cholesterinmenge werden über den Darm ausgeschieden.

Trotz Kontrolle der Cholesterinsynthese durch negative Rückkopplung kann es bei übermäßiger Zufuhr von Fett mit langkettigen Fettsäuren oder bei erhöhter Energiezufuhr zu einer Hypercholesterinämie kommen. Durch gesättigte Fettsäuren wird die Aktivität der LDL-Rezeptoren gesenkt und damit der LDL-Abbau in der Leberzelle gehemmt. Als Folge davon steigt das LDL-Cholesterin im Plasma. Die Ausscheidung von Cholesterin erfolgt mit der Galle über den Darm als Cholesterin (ca. 600 mg/Tag) oder als Gallensäuren (ca. 400 mg/Tag).

Da erhöhte Konzentrationen von Cholesterin, insbesondere von LDL-Cholesterin in der Pathogenese der Atherosklerose eine große Rolle spielen, zielt die Therapie der Hyperlipidämie auf eine Normalisierung der Konzentration von Cholesterin und/oder Triglyceriden im Serum. Reicht eine Diät alleine zur Normalisierung nicht aus, ist eine medikamentöse Therapie notwendig. Für die Pharmakotherapie gibt es mehrere Prinzipien, deren Wirkungsmechanismen nur zum Teil verstanden werden (Zöllner 1992):

- A. Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren mit nachfolgender Verminderung des Cholesteringehaltes der Leberzellen, Stimulation des LDL-Rezeptors und Steigerung des LDL-Abbaus, z.B. durch Anionenaustauscherharze,
- B. Hemmung der Resorption von Cholesterin, z.B. durch Sitosterin
- C. Hemmung der HMG-CoA-Reduktase mit Verminderung des Cholesteringehaltes der Leberzellen, Stimulation des LDL-Rezeptors und Steigerung des LDL-Abbaus, z.B. durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren,
- D. Hemmung der Synthese cholesterintransportierender Lipoproteine, z.B. durch Nikotinsäure oder Fibrate

Diese Medikamente sind zum Teil mit starken Nebenwirkungen verbunden oder sind bei vorliegenden Kontraindikationen nicht einsetzbar.



Hier könnte möglicherweise ein zusätzlicher Therapieansatz durch die Nutzung des Enzymapparates des Bakterium *Comamonas testosteroni* bestehen. Zum einen ist die Einschleusung des Bakteriums in den Gastrointestinaltrakt vorstellbar, um den enterohepatischen Kreislauf zu unterbrechen. Zum anderen ist eine gentechnische Herstellung der zum Cholesterolabbau notwendigen Enzyme denkbar, die selbst schon im Blut befindliches Cholesterin abbauen könnten. Es konnte bereits für bestimmte Mikroorganismen ein Einfluss auf die Stoffwechselfvorgänge, im Besonderen der gastrointestinale Abbau von steroidal Verbindungen in Eukaryonten, nachgewiesen werden. So zeigte sich am Beispiel von Schweinen eine signifikante Senkung des Gesamtcholesterinspiegels und eine Senkung des LDL-Cholesterins durch die Gallensalzhydrolyse (BSH) von *Lactobacillus reuteri* (De Smet et al., 1988). Gleiches konnte für *Lactobacillus casei* nachgewiesen werden (Bomba et al., 1998).

Zusätzlich sind die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) zu nennen, die dann für den Menschen relevant werden können, wenn sie in den Körper gelangen. Die akute mittlere tödliche Dosis hat sich im Tierversuch als relativ hoch erwiesen (Parkinson et al. 1983). Beim Verzehr hochgradig kontaminierter Lebensmittel oder auch im Umgang mit polychlorierten Biphenylen am Arbeitsplatz kann es aber immer wieder zu chronischen Vergiftungserscheinungen kommen. Man kann annehmen, dass die intestinale Resorptionsrate beim Menschen ähnlich hoch ist wie im Tierversuch (über 90 %) und die PCBs rasch aus dem Blut in alle Körpergewebe transportiert werden. Daher ist eine bakterielle Behandlungsstrategie nur bei akuten oralen Intoxikationen denkbar. *Comamonas testosteroni* ist z.B. in der Lage, die PAHs Naphthalen, Phenanthren und Anthrazen (Goyal und Zylstra, 1996) oder 4-Chlorphenol und Phenol (Bae et al., 1997) abzubauen.

### 5.3.2 Umwelt

Nach der so genannten „Östrogen-Hypothese“ vermutet man, dass die gemeinsame Ursache der bei Tieren und Mensch beschriebenen Fortpflanzungs- und Entwicklungsstörungen eine erhöhte Belastung durch natürliche und synthetische Umweltöstrogene während der Embryonalzeit ist. Das synthetische 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol, einem Ausscheidungsprodukt hormonaler Kontrazeptiva, ist in Kläranlagen schwer eliminierbar und kann somit in alle Gewässer gelangen. Die Effekte auf die kritische Entwicklungs-

phase der Geschlechterdifferenzierung beim Menschen sind zwar noch nicht abschließend einschätzbar, wurde aber bereits für einige im Wasser lebende Organismen nachgewiesen (Colborn et al. 1993). Daher könnte *C. testosteroni* als ubiquitär vorkommendes Bakterium, das in der Lage ist, neben Steroiden auch nicht steroidale Kohlenwasserstoffe (wie zum Beispiel polychlorierte Biphenyle) zu verstoffwechseln, eine neue Möglichkeit für den Einsatz in Kläranlagen bieten. Mikrobiologische Verfahren zur Abwasserreinigung werden in Kläranlagen in der Regel schon angewendet.

*Comamonas testosteroni* könnte demnach, nach entsprechender genetischer Optimierung (z.B. durch Ausschaltung der Repressoren), eine Innovation auf dem Gebiet der Reinigung von Umwelt, Böden und Gewässern darstellen.

## 6. Anhang

### 6.1 Abbildungen

Abb. 1: Gonangerüst	Abb. 2: Cholesterol .....	6
Abb. 3: Squalen .....		6
Abb. 4: Übersicht einiger natürlicher Steroide und steroidaler Verbindungen .....		7
Abb. 5: Vereinfachtes Schema des bakteriellen Steroidabbaus. Verändert nach Träger 1977 .....		14
Abb. 6: Schema des Transportes der Steroidhormone in die Zelle und ihre Wirkung auf die Genexpression (verändert nach Oppermann, 1995) .....		17
Abb. 9: Restriktionskarte von pUC18/19 (Ampicillinresistenz, <i>lacZ</i> -Promotor, ori) .....		28
Abb. 10: Restriktionskarte von pK18 (Kanamycinresistenz, <i>lacZ</i> -Promotor, ori) .....		29
Abb. 11: Restriktionskarte des Vektors pBBR1MCS-2 .....		29
Abb. 12: Restriktionskarte des 5.257 kb- <i>EcoRI</i> -Fragmentes von <i>C. testosteroni</i> .....		45
Abb. 13: PCR-Strategie zur Herstellung von Suicide Plasmiden .....		47
Abb. 14 Darstellung der Sequenz der in pK18 integrierten Primer PCR1-PCR6. ....		49
Abb. 15: Restriktionsverdau der Suicide Plasmide (hier als Beispiel pK4) mit <i>EcoRI</i> .50		
Abb. 16: Kultureller Nachweis der erfolgreichen Geninsertion (Mating) .....		53
Abb. 17: Kultureller Nachweis der erfolgreichen Geninsertion durch Elektroporation.54		
Abb. 18: PCR-Strategie zum Nachweis der Plasmid-Integration .....		55
Abb. 19: PCR-Kontrolle .....		56
Abb. 20: Southern Blot nach der Mating-Methode .....		57
Abb. 21: Blot von Elektroporation .....		58
Abb. 22: Stabilitätsnachweis .....		58
Abb. 23: Chromatogramm des Umsatzes von 0,2mM Metyrapon durch die rekombinante <i>hsdA</i> .....		59
Abb. 24: HPLC .....		60
Abb. 25 Schematische Darstellung der neben pK1-pK6 für den ELISA benutzen Plasmide .....		61

Abb. 26: Konstruktion von pKtacA8, pKKp1 und pKtac16 .....	65
Abb. 27: Auswirkungen verschiedener Promotoren auf die Genexpression der <i>hsdA</i> ....	65
Abb.28: Prinzip der Suicide Plasmide (cross linking).....	68

## 6.2 Literatur

- Ahmad, D.**, Masse, R., Sylvestre, M (1990): Cloning and expression involved in 4-chlorobiphenyl transformation by *Pseudomonas testosteroni*: homology to polychlorobiphenyl-degrading genes in other bacteria. *Gene* **86**, 53-61
- Arai, H.**, Igarashi, Y., Kodama, Tohuru (1991): Construction of Novel Expression Vectors Effective in *Pseudomonas* Cells. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2431-2432
- Bae, H. S.**, Lee, J. M., Kim, Y. B., Lee, S. T. (1997): Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation* **7**, 463-469
- Barbaro, D. J.**, Mackowiak, P. A., Barth, S. S. und Southern Jr., P. M. (1987): *Pseudomonas testosteroni* infection: eighteen recent cases and a review for the literature. *Rev. inf. Dis.* **9**, 124-9
- Barriault, D.**, Sylvestre, M. (1993): Factors affecting PCB degradation by an implanted bacterial strain in soil microcosms. *Can. J. Microbiol.* **39**, 594-602
- Beato, M.** (1989): Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335-344
- Ben-Tovim, T.**, Eylan, E., Romano, A., Stein, R. (1974): Gram-negative bacteria isolated from external eye infections. *Infection* **2**, 162-165
- Bergeron, J. M.**, Crews, D., McLachlan, J. A. (1994): PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ. Health Perspect.* **102**, 780-786
- Bergeron, J.**, Ahmad, D., Barriault, D., Larose, A., Sylvestre, M. (1994): Identification and mapping of the gene translation products involved in the first step of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl/chlorobiphenyl biodegradation pathway. *Can. J. Microbiol.* **40**, 743-754
- Bicho, P. A.**, Martin, V., Saddler, J. N. (1995): Growth, induction, and substrate specificity of dehydroabietic acid-degrading bacteria isolated from a kraft mill effluent enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3245-3250
- Bioshop, G. J.** and Yokota, T. (2001): Plant steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant Cell Physiol.* **42**, 114-120
- Bomba, A.**, Gancarcikova, S., Nemcova, R., Herich, R., Kastle, R., Depta, A., Demeterova, M., Ledeck, V., Zitnan, R. (1998): The effect of lactic acid bacteria on intestinal metabolism and metabolic profile in gnotobiotic pigs. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **105**, 384-389
- Braun Howland, E. B.**, Vesico, P. A., Nierzwicki-Bauer, S. A. (1993): Use of a simplified cell blot technique and 16S rRNA-directed probes for identification of common environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3219-3224

- Busse, H. J.**, El-Banna, T., Oyaizu, H., Auling, G. (1992): Identification of xenobiotic-degrading isolates from the beta subclass of the Proteobacteria by a polyphasic approach including 16S rRNA partial sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 19-26
- Chater, K. F.**, Bruton, C. J. (1983): Mutational cloning in *Streptomyces* and the isolation of antibiotic production genes. *Gene* **26**, 67-78
- Cheng, K. C.**, White, P. C., Qin, K. N. (1991): Molecular cloning and expression of rat liver 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol. Endocrinol.* **5**, 823-828
- Colborn, T.**, vom Saaö, F. S., Soto, A. M. (1993): Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Eviron. Health Perspect.* **101**, 378-384
- Coulter, A. W.**, Talaty, P. (1968): Studies on the microbiological degradation of steroid ring A. *J. Biol. Chem.* **243**, 3238-3247
- Dagley, S.**, Geary, P. J., Wood, J. M. (1968): The metabolism of protocatechoate by *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem. J.* **109**, 559-568
- DeSmet, I.**, DeBoever, P., Verstraete, W. (1988): Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *Br. J. Nutr.* **79**, 185-194
- DeVos, P.**, Kerstens, K., Falsen, E., Pot, B., Gillis, M., Segers, P., De Ley, J. (1985): *Comamonas Davis* and Park 1962 gen. nov., nom. Rev. Emend., and *Comamonas terrigena* Hugh 1962 sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 443-453
- Davis, G. H. G.** und Park, R. W. A. (1962): A taxonomic study of certain bacteria currently classified as *Vibrio* species. *J. Gen. Microbiol.* **27**, 101-119
- Eltis, L. S.**, Bolin, J. T. (1996): Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.* **178**, 5930-5937
- Francis, M.**, Watanabe, M. (1982): Partial purification and characterization of a membrane-associated steroid-binding protein from *Pseudomonas testosteroni*. *Can. J. Biochem.* **60**, 798-803
- Franzetti, F. M.**, Cernushi, Esposito, R. und Moroni, M. (1992): *Pseudomonas* infections in patients with AIDS and AIDS-related complex. *J. Intern. Med.* **231**, 437-41
- Galan, B.**, Kolb, A., Sabz, J. M., Garcia, J. L., Prieto, M. A. (2003): Molecular determinants of the *hpa* regulatory system of *Escherichia coli*: the HpaR repressor, *Nucleic Acids Res.* **31**, 6598-6609
- Galarneault, T.**, Leifson, E. (1956): Taxonomy of *Lophomonas* n. gen. *Can. J. Microbiol.* **2**, 102-110
- Garcia-Valdes, E.**, Cozar, E., Rotger, R., Lalucat, J., Ursing, J. (1988): New naphthalene degrading marine *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2478-2485
- Geuns, J. M. C.** (1977): Steroid hormones and plant growth and development, *Phytochemistry* **17**, 1-14

- Gilardi, G. L.** (1971) Characterization of nonfermentative nonfastidious Gram-negative bacteria encountered in medical bacteriology. *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 623-644
- Gilardi, G. L.** (1985): Chapter 30. *Pseudomonas*, In: Lenette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J., Jr., Shadomy, H. J. (ed), Manual of clinical microbiology, ed. *American Society for Microbiology*, 350-372, 4<sup>th</sup> ed., Washington, D.C.
- Grimm, C., Maser, E., Klebe, G., Reuter, K. and Ficner, R.** (2000): The crystal structure of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* shows a novel oligomerisation pattern within the short chain Dehydrogenase/reductase family. *J. Biol. Chem.* **275**, 41333-41339
- Goldschmidt, C. M.** (1991): Transgenic expression of aminoglycosid adenine transferase in the chloroplast a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acid Res.* **89**, 4083- 4090
- Goyal, A. K., Zylstra, G. J.** (1996): Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 230-236
- Heftmann, E.** (1975): Functions of steroids in plants. *Phytochemistry* **14**, 891-901
- Hollender, J., Dott, W., Hopp, J.** (1994): Regulation of chloro- and methylphenol degradation in *Comamonas testosteroni* JH5. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2330-2338
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T.** (1994): Bergey's manual of determinative bacteriology (Ed. Hensyl, W. R.), Williams & Wilkins Baltimore
- Horowitz, H., Gilroy, S., Feinstein, S. und Gilardi, G.** (1990): Endocarditis associated with *Comamonas acidovorans*. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 143-145
- Huet, F., Ruiz, C., Richards, G.** (1993): Puffs and PCR: the in vivo dynamics of early gene expression during ecdysone responses in *Drosophila*, *Development* **118**, 613-627
- Jianming, L., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T. C., Chory, J.** (1996): A role for brassinosteroids in light-dependent of *Arabidopsis*. *Science* **272**, 398-401
- Kannenbergh, E. L., Perzl, M. and Härtner, T.** (1995): The occurrence of hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 255-262
- Karlson, P.** (1983): Why are so many hormones steroids? Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **364**, 1067-1087
- Kimsey, H. H., Waldor, M. K.** (2003): The CTXphi repressor RstR binds DNA cooperatively to form tetrameric repressor:operator complexes. *J. Biol. Chem.* **279**, 2640-2647
- Kinouchi, T., Kataoka, K., Miyanishi, K., Akimoto, S., Ohnishi, Y.** (1993): Biological activities of the intestinal microflora in mice treated with antibiotics or untreated and the effects of the microflora on absorption and metabolic activation of orally admin-

- istered glutathione conjugates of K-region epoxides of 1-nitropyrene. *Carcinogenesis* **14**, 869-874
- Kovach, M. E.**, Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., Peterson, K. M. (1995): Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes, *Gene* **166**, 175-176
- Keung, W. M.** (1995): Dietary estrogenic isoflavones are potent inhibitors of  $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase of *P. testosteroni*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **215**, 1137- 1144
- Klinman, N. R.**, Press, J (1975): The B cell specificity repertoire for the 2,4-dinitrophenyl and 2,3,6-trinitrophenyl determinants in neonatal BALB/c mice. *J. Exp. Med.*, **141**, 1133-46
- Kannenber, E.L.**, Perzl, M., Müller, P., Härtner, T., Poralla, K. (1996): Hopanoids lipids in *Bradyrhizobium* and other plant-associated bacteria and cloning of the *Bradyrhizobium japonicum* squalene-hopene cyclase gene. *Plant and Soil*, **186**, 107-112
- Lefebvre, Y.**, Lefebvre, D., Schultz, R., Groman, E.V., Watanabe, M. (1979): The effects of specific inhibitors and an antiserum of  $3\beta$  and  $17\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase on steroid uptake in *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem.* **10**, 519-522
- Lefebvre, Y.**, Schultz, R., Groman, E. V., Watanabe, M. (1979): Localization of  $3\beta$  and  $17\beta$ -hydrosteroid dehydrogenase in *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem.* **10**, 523-528
- Lenard, J.** (1992) Mammalian hormones in microbial cells. *Trends. Biochem. Sci.* **17**, 147-150
- Li, J.**, Nagpal, P. Vitart, V., McMorris, T. C. and Chory, J. (1996): A role for brassinosteroids in light-lymphoma. *Clin. Inf. Dis.* **19**, 559-560
- Locher, H. H.**, Leisinger, T., Cook, A. M. (1989): Degradation of *p*-toluenesulphonic acid via sidechain oxidation, desulphonation and *meta*-ring cleavage in *Pseudomonas (Comamonas) testosteroni* T-2. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1969-1978
- Lorenz, M. C.**, Kovach, M. E., Elzer, M. E., Hill, P.H., Robertson, D. S., Farris, G. T., Roop, M. A., Peterson R. M., Four K. M. (1995) new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic resistance cassettes, *Gene* **166** 175-176
- MacDonald, I. A.**, Jellet, J. F. Mahony, D. E. and Holdeman, L. V. (1979): Bile salt  $3\alpha$ - and  $12\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase form *Eubacterium lentum* and related organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 992-1000
- MacDonald, I. A.**, Meier, E. C., Mahony, D. E., Costain, G. A. (1979):  $3\alpha$ -,  $7\alpha$ - and  $12\alpha$ - hydroxysteroid-dehydrogenase activities form *Clostridium perfringens*. *Biochem. Biophys. Acta* **450**, 142-153



- Madigan M. T.**, Martinko J. M., Parker J. (1997): Brock biology of microorganisms, Prentice-Hall International, London, UK
- Mallonee, D. H.**, Lijewski, M. A., Hylemon, P. B. (1995): Expression in *Escherichia coli* and characterization of a bile acid-inducible 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase from *Eubacterium sp.* Strain VPI 12708. *Curr. Microbiol.* **30**, 259-263
- Maser, E.**, Oppermann, U., Bannenberg, G., Netter, K. J. (1992): Functional and immunological relationship between metyrapone reductase from mouse liver microsomes and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *FEBS Lett.* **297**, 196-200
- Maser, E.**, Möbus, E., Xiong, G. (2000): Functional expression, purification and characterization of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonylreductase from *Comamonas testosteroni*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 622-628
- Miller, V. L.**, Mekalanos, J. J. (1988): A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins an virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J. Bacteriol.* **170**, 2575-2583
- Möbus, E.**, Jahn, M., Schmid, R., Jahn, D., Maser, E. (1997): Testosterone-regulated expression of enzymes involved in steroid an aromatic hydrocarbon catabolism in *Comamonas testosteroni*. *J. Bacteriol.* **179**, 5951-5955
- Möbus, E.**, Maser, E (1998): Molecular cloning, overexpression and characterization of steroid inducible 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*. A novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**, 30888-30896
- Nargang, F. E.**, Kuenkele, K. P., Mayer, A., Ritzel, R. G., Neupert, W. and Lill, R. (1995): 'Sheltered disruption' of *Neurospora crassa* MOM22, an essential component of the mitochondrial protein import complex. *EMBO J.* Mar **14**, 1099-1108
- Newman, S. M.**, Gillham, N. W., Harris, E. H., Johnson, A. M. and Byonton J. E. (1991): Targeted disruption of chloroplast genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Genet.* **230**, 65-74
- Oppermann, U.**, Maser, E. (1996): Characterization of a 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonyl reductase from the Gram-negative *Comamonas testosteroni*. *Eur. J. Biochem.* **241**, 744-749
- Oppermann, U.**, Netter, K. J., Maser, E. (1993): Carbonyl reduction by 3 $\alpha$ -HSD from *Comamonas testosteroni* – new properties and its relationship to the SCAD family. In: Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 4 (Ed. Weiner, H.) Plenum Press, New York
- Ourisson, G.**, Rohmer, M. and Poralla, K. (1987): Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 301-333

- Parkinson, A.**, Safe S., Robertson L., Thomas P. E., Ryan D. E., Reik L. M., Levin W. (1983): Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isoenzymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated and polybrominated biphenyls: a study of structure activity relationships. *J. Biol. Chem.* **258**: 5967-5976
- Pettigrew, C. A.**, Breen, A., Corcoran, C., Cayler, G.S. (1990): Chlorinated biphenyl mineralization by individual populations and consortia of freshwater bacteria. *Appl. Environ Microbiol.* **56**, 2036-2045
- Plesiat, P.**, Grandguillot, M., Harayama, S., Vragar, S., Michel-Briand, Y. (1991): Cloning, sequencing and expression of the *Pseudomonas testosteroni* gene encoding 3-oxosteroid delta 1-dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **173**, 7219-7227
- Pousette, A.**, Carlström, K. (1986): High affinity protein binding and enzyme inducing activity of methyltrienolone in *Pseudomonas testosteroni*. *A. Chem. Scan.* **B 40**, 515-521
- Pousette, A.**, Carlström, K. (1984): Partial characterization of an androgen-induced androgen-binding protein in *Pseudomonas testosteroni*. *A. Chem. Scan.* **B 38**, 433-438
- Pridmore, R. D.** (1987): New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**, 309-312
- Raumann, B. E.**, Rould, M. A., Pabo, C. O., Sauer, R. T. (1994): DNA recognition by beta-sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature* **367**, 754-757
- Redmont, J. W.**, Batley, M., Djordjevic, R. W., Innes, R. W., Kuempel, P. L. and Rolfe, B.G. (1986): Flavones induce expression of nodulation gene in *Rhizobium*. *Nature* **323**, 632-635
- Rowland, S. S.**, Falkner, W. A., Bashirelahi, N. (1992): Identification of an estrogen-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem. Molec. Biol.* **42**, 721-727
- Russel, C. B.**, Thaler, D. S. and Dahlquist, F. W. (1989): Chromosomal transformation of *Escherichia coli recD* strains with linearized plasmids. *J. Bacteriol.* **171**, 2609-2613
- Russel, D. W.** (1996): Green light for steroid hormones. *Science* **272**, 370-371
- Ruvkum, G. B.**, Ausubel, F. M. (1981): A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* **289**, 85-88
- Schäfers, C.** (2005): Identifizierung von cis- und trans-regulatorischen Elementen der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase-Expression in *Comamonas testosteroni*. Dissertation im Fachbereich Humanmedizin, Universität Marburg
- Shevell, D. E.**, Abou-Zamzam, A. M., Demple B., Walker, G. C. (1988): Construction of an *Escherichia coli* K-12 *ada* deletion by gene replacement in a *recD* strain reveals a second methyltransferase that repairs alkylated DNA. *J. Bacteriol.* **170**, 3294-3296

- Schubert, K.**, Rose, G., Tümmler, R., Ikekawa, N. (1964): Sterine in *Escherichia coli*. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **339**, 293-296
- Schubert, K.**, Böhme, K. H., Ritter, F., Hörhold, C. (1968): Mikrobieller Abbau von Progesteron zu  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure und Bernsteinsäure. *Biochem. Biophys. Acta* **152**, 401-408
- Schwartzberg, P. L.**, Goff, S. P., Robertson, E. J. (1989): Germ-line transmission of a C-Abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* **246**, 799-803
- Sonnenwirth, A. C.** (1970): Bacteriemia with and without meningitis due to, *Yersinia enterocolitica*, *Edwardsiella tarda*, *Comamonas terrigena* and *Pseudomonas maltophilia*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **174**, 48-502
- Southern, P. J.**, Berg, P. (1982): Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 327-341
- Stackebrandt, E.**, Murray, R. G. E., Trüper, H. G. (1988): *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 321-325
- Stibitz, S.**, Aaronson, W., Monack, D. and Falkow, S. (1989): Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature* **338**, 266-269
- Shortle, D.**, Haber, J. E. and Botstein, D. (1982): Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. *Science* **217**, 371-373.
- Stonecipher, K. G.**, Jensen, H. G., Kastl, P. R., Faulkner, A., Rowsey, J. J. (1991): Ocular infections. *Am. J. Ophthalmol.* **112**, 46-49
- Summons R. E.**, Jahnke, L. L., Hope, J. M., Logan, G. A. (1999): 2-Methyl-hopanoids as adaptive enzymes. *Nature* **170**, 620-621
- Suzuki, F. W.**, Ueda, S., Sugiyama, M., Immmamura, S. (1993): Cloning and expression of a *Pseudomonas* 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase-encoding gene in *Escherichia coli*. *Gene*. **130**, 137-140
- Talalay, P.** und Wang, V. (1955): Enzymatic isomeration of  $\Delta^5$ -3-ketosteroids. *Biochem. Biophys. Acta* **18**, 300-301
- Tamaoka, J.**, Ha, D. M., Komagata, K. (1987): Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov. with an emended description of the genus *Comamonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 52-59
- Thomas, J. E.**, Carroll, R., Po, L., Watanabe, M. (1989): Isolation and characterization of a 50 kDa testosterone binding protein from *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **32**, 27-34

- Träger, L.** (1977): Steroidhormone. *Springer Verlag*, Berlin
- Uwajima, T.**, Takayama, K. and Terada, O. (1978): Production, purification and crystallization of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Arch. Biol. Chem.* **42**, 1577-1583
- Wacker, A.**, Drews, J., Pratt, W. B., Laurent, H., Petzoldt, K. (1965): Enzyminduktion mit Steroiden bei *Pseudomonas testosteroni*. *Z. Naturforschung* **20 b**, 547-553
- Wacker, A.**, Bauer, B., Träger, L. (1970): Enzyminduktion bei *Streptomyces hydrogenans* I. Merkmale der Enzyminduktion, Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **351**, 320-328
- Wang, Z.Y.**, Seto, H., Fujikota, S., Yoshida, S. and Chory, J. (2001): BRI1 is a critical component of a plasma membrane-receptor for plant steroids. *Nature* **410**, 380-383
- Watanabe, M.** und Po, L. (1974): Testosterone uptake by membrane vesicles of *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem.* **4**, 623-632
- Watanabe, M.**, Lefebvre, D., Lefebvre, Y., Sy, L.P. (1980): Membrane-bound dehydrogenase of *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem.* **13**, 821-827
- Watanabe, M.**, Phillips, K., Watanabe, H. (1973): Induction of steroid-binding activity in *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem. Biophys. Acta* **345**, 419-429
- Watanabe, M.**, Po, L., Hunt, D., Lefebvre, Y. (1979): Binding of steroids by a partially purified periplasmatic protein from *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **10**, 207-213
- Watanabe, M.**, Watanabe, H. (1974): Periplasmatic steroid-binding proteins and steroid transforming enzymes of *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **5**, 439-446
- Wettermark, M. J.**, Adhya, S. (1992): A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J. Biol. Chem.* **267**, 15869-15874
- Willems, A.**, de Vos, P., de Ley, J. (1992): The genus *Comamonas*. In: The procaryotes, a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification and applications. (Ed. Balows, A., Trueper, H. G. and Dworkin, M.) Springer Verlag, Berlin
- Winans, S. C.**, Elledge, S. J., Krueger, J. H. and Walker, G. C. (1985): Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**, 1219-1221
- Xiong, G.**, Maser, E. (2001): Regulation of steroid-inducible 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. *J. Biol. Chem.* **276**, 9961-9970
- Xiong, G.**, Martin, H.-J., Blum, A., Schäfers, C. and Maser, E. (2001): A model on the regulation of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonyl reductase expression in *Comamonas testosteroni*. *J. Chem. Biol. Int.* **130-132**, 723-736

- Xiong, G.**, Martin, H. J., Maser, E. (2003): Identification and characterization of a novel translational repressor of the steroid-inducible 3 alpha-hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. *J. Bio. Chem.* **278**, 47400-47407
- Xiong, G.**, Markowetz, S., Maser, E. (2003): Regulation of 3 alpha-hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*: function and relationship of two operators. *J. Chem. Biol. Int.* **143**, 411-423
- Yusuf, S.**, Wittes, J., Friedmann, L. (1998): Overview of results of randomized clinical trials in heart disease. II: Unstable angina, heart failure, primary prevention with aspirin, and risk factor modification. *J. Amer. Med. Ass.* **260**, 2259 - 2263
- Zöllner, N.**, Keller C, Wolfram G. (1992): Hyperlipidämie. In Forth, W., Henschler D., Rummel W., Starke K. (Hrsg.): Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. 6. völlig neu bearbeitete Auflage, BI-Wiss.-Verl., Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden oder werden publiziert:

1. Originalpublikation

- Xiong, G.**, Schüller, C., Döring, B. Maser, E. (2005): Identification of repressor A and B of the steroid-inducible 3 alpha-hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni* with marker suicide integration. *J. Chem. Biol. Int.* (in press)

2. Poster / Abstract

2.1 Poster

- Schüller, C.**, Xiong, G., Maser, E.: Marker suicide integration into the repressor and its binding domain of the 3 alpha-hydroxysteroid-dehydrogenase gene in *Comamonas testosteroni*. Tagungsband des Symposiums: Mechanismen der Genregulation bei Mikroorganismen, pp 51, Osnabrück, 25. – 28.11.1999

2.2 Abstract

- Xiong, G.**, Schüller, C., Maser, E.: Die Expression der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in *Comamonas testosteroni* wird durch ein Aktivatorprotein gesteigert. 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, R 161, Mainz, 12. – 14. März 2002

### 6.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

in Marburg

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Beato, Becker, Bertalanffy, Bette, Beyer, Bien, Bolm, Brilla, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Ebel, Eissele, Feuser, Fruhsdorfer, Geks, Gemsa, Geus, Görg, Gotzen, Griss, Gröne, Habermehl, Happle, Hartmann, Hasilik, Heeg, Hellinger, Herzum, Hesse, Höffken, Joseph, Katschinski, Kern, Klenk, Klose, Köhler, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lang, Lange, Lemke, Lennartz, Leppek, Lippert, Löffler, Maisch, Maser, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Petermann, Printz, Ramaswamy, Renschmidt, Renz, Reichardt, Richter, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schädel-Höpfner, Schäfer, Schnabel, Schneider, Schuermann, Schüffel, Schulz, Schurek, Seitz, Sekundo, Seyberth, Slenczka, Steiniger, Vohland, Voigt, von Garrel, Weihe, Werner, Westermann, Westphal, Wilke, Wolf, Wulff

in Ilanz/Schweiz

Bilat, Hardecker, Weltzel, Stäuble

## 6.4 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Prof. Dr. E. Maser, für die Überlassung des Themas und für die ausdauernde Betreuung im gesamten Verlauf der Promotion. Ebenso großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat Dr. G. Xiong, der mich bei der Durchführung des praktischen Teils in besonderer Weise unterstützt hat. Ferner danke ich dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der technischen Ausstattung.

Ein besonderer Dank gebührt Frau C. Dehlinger und Herrn R. Schmidt. Sie standen mir durch ihren vielseitigen Rat in allen Computerangelegenheiten tatkräftig zur Seite.

Auch Prof. Dr. P. Kroll, dem Leiter der Marburger Universitäts-Augenklinik, möchte ich an dieser Stelle danken. Er hat die Entstehung dieser Arbeit mit wohlwollendem und nachdrücklichem Interesse begleitet.

Von Herzen danke ich meinen Eltern: Sie haben durch Ihre moralische und nicht zuletzt finanzielle Unterstützung wesentlich dazu beigetragen, dass ich mir meinen Berufswunsch erfüllen konnte.