

# Expression von DNA aus Bodenproben in *Streptomyces* für den Nachweis neuer Enzymaktivitäten

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von Eckart Bonacker  
geb. Am 11. Januar 1972 in Esslingen a. N.

Hauptberichter: Prof. Dr. R. D. Schmid  
Mitberichter: Prof. Dr. D. H. Wolf  
Vorsitzender: Prof. Dr. E. Roduner  
Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2002

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2002



## Danksagung

Prof. Dr. Rolf D. Schmid danke ich für die Überlassung des Themas und seinem stetigen Interesse an meiner Arbeit. In den vergangenen Jahren hatte ich die Gelegenheit viel von ihm zu lernen.

Ich möchte Dr. Jutta Schmitt für die ständige Gesprächsbereitschaft und Anregungen, die mir wesentlich geholfen haben, sehr herzlich danken.

Dr. J. Altenbuchner und Dr. G. Muth danke ich für die wertvollen Hinweise im Zusammenhang mit der Arbeit mit Streptomyceten.

Herzlich danken möchte ich vor allem der Genetik Gruppe und dem gesamten Institut.

Dipl. Chem. Cornelius Bessler und Dipl. Chem. Kai Doderer danke ich für anregende und aufschlußreiche Diskussionen.

Danken möchte ich auch meinen Kollegen im Screening Center Projekt, insbesondere Dipl. Biol. Isabelle Kauffmann.

Diese Arbeit wurde von der BASF AG unterstützt.

Meiner Familie und Dipl. Ing. Monica Casale möchte ich für ihr Verständnis und die Unterstützung danken, die sie mir stets haben zukommen lassen.

## Zusammenfassung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Genbanken aus Boden DNA in *Streptomyces* erstellt und auf Enzymaktivität gescreent. In diesem Zusammenhang wurden anfänglich mehrere Reportergene in *Streptomyces* exprimiert und verschiedene Methoden zur Transformation von *Streptomyces* im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit und Effizienz getestet und optimiert. Als geeignetste Transformationsmethode erwies sich die Protoplastentransformation. Mit dieser Methode konnten Transformationseffizienzen von  $10^6$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA in *Streptomyces lividans* erzielt werden und damit ausreichende Werte für die Herstellung von Genbanken erhalten werden. Nach Aufreinigung genomischer DNA aus Böden wurde eine mehr als 18500 Klone umfassende Genbank in *Streptomyces lividans* erstellt und auf Lipase- bzw. Esteraseaktivität getestet. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Gene für die Catechol-2,3-dioxygenase und die BTL2- Lipase, die in verschiedenen Schritten der Aufreinigungsprozedur von Boden-DNA eingebracht wurden, in einem anschließenden Screening aufgefunden werden können. Durch das Wiederfinden dieser Gene wurde die Durchführbarkeit dieser Methoden demonstriert. So konnte die Catechol-2,3-dioxygenase in einem von 2200 gescreenten Kolonien und die BTL2- Lipase in zwei von 3000 gescreenten Kolonien nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde auf den Einsatz von Streptomyceten in verschiedenen Assaysystemen hingearbeitet, die eine Verwendung von Mikrotiterplatten zum Hochdurchsatz Screening erfordern. Es konnte gezeigt werden, daß Mikrotiterplatten im 96er und 384er Format, sowohl bei Verwendung des halbsynthetischen R5 Mediums für die Kultivierung von *Streptomyces*, als auch für die qualitative und quantitative Durchführung von Farbassays im Kulturüberstand geeignet sind.

## Abstract

It exists a great interest in industrial applicable enzymes, deriving from new sources. Out of this reason within the last years every effort was made to get access to new enzymes out of environmental samples. In this context mainly bacteria are of interest due to their high natural diversity. Since there are only 4000 bacteria characterized (Bull, Goodfellow et al. 1992), it is assumed that more than 99.5 % are not cultivable and out of this not accessible to the classic methods for gaining new enzymes (Torsvik, Goksoyr et al. 1990a; Torsvik, Salte et al. 1990b; Rondon, August et al. 2000). The application of suitable methods for extraction and purification is in common considered as the best solution to tap the resources of microbial diversity (Porteous, Armstrong et al. 1994; Entcheva, Liebl et al. 2001). These methods should be able to extract the genomic DNA of all microorganisms within the soil sample. A further condition is that it should also remove traces of humic acids and heavy metals (Watson and Blackwell 2000; Santosa 2001), in order to achieve good results in restriction, ligation and transformation of this DNA in suitable vectors and host organisms. *E. coli* as the most common bacterial host has proven difficulties in the functional expression of DNA from common soil bacteria like actinomycetes. Out of this reason as a further host organism beneath *E. coli* for the heterologous expression of genomic DNA from soil samples *Streptomyces* was chosen.

Streptomycetes are, like the pleomorph actinomycetes, gram-positive and filamentous growing soil bacteria (Anne and Van Mellaert 1993). With an average GC content of 72 % the highest value in nature is obtained (Wright and Bibb 1992). The linear chromosome has in common a size of 8 mega bases (mb). Streptomycetes are mainly of interest due to their ability in producing antibiotics and other secondary metabolites (Martin 1992; Baltz 1998). Since the life cycle of *Streptomyces* is more complex than others, e.g. *E. coli*, cultivation and transformation offer some difficulties. Of importance for microbial experiments are mainly the cell wall of this gram-positive organism, its high GC content and codon usage. It is further to mention that for the heterologous expression in *Streptomyces* some codons have proven difficulties (Leskiw, Bibb et al. 1991). Due to their seldom occurrence in *Streptomyces* mainly the leucine codons TTA (0.2 %) and CTA (0.5 %) codon should be avoided. Also restriction enzymes and proteases expressed by some Streptomycetes can hinder the recombinant expression (Alvarez, Chater et al. 1993; Brawner 1994). Of advantage is the ability of *Streptomyces* to secrete proteins, remarkably also from human origin, in high amounts directly into the medium (Gilbert, Morosoli et al. 1995).

The aim of this work was the production of gene libraries for the expression of soil DNA in *Streptomyces* and screening these libraries for enzyme activity. For the usage of *Streptomyces* as host organism for the expression of genomic DNA from soil several steps were performed. After suitable strains for transformation were selected, different transformation systems for *Streptomyces* were optimised due to an application for the transformation with soil DNA. For this purpose also several reporter genes were tested. With these optimised expression systems an agar plate screening for lipase and esterase activity was performed.

In case for the test of other enzyme activities, e.g. epoxide hydrolyses, in which no suitable agar plate assays are available, alternative methods for the high throughput screening with *Streptomyces* should be developed. As a possible solution for this problem the cultivation of Streptomycetes in microtiter plates was examined.

For the expression of gene libraries in *Streptomyces* and for a screening under high throughput conditions, at first several constructs with reporter genes in the *E. coli*-*Streptomyces* shuttle vectors pGM121 or pGM160 were prepared. An important condition for the later usage was the reproducible and quantifiable expression of the transformed genes in *Streptomyces* as host organism. For these purpose the catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida*, EGFP from *Aequorea victoria*, DsRed from *Dicosoma species*, the BTL2 lipase from *Bacillus thermocatenuatus* and the  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* were cloned. After transformation of these constructs either in *S. lividans* TK23 or *S. lividans* TK64 and growth for 3 d under appropriate conditions, the assays for the detection of enzyme activity were performed.

The plasmid pEBO1 was obtained by ligation of the of the catechol 2,3-dioxygenase in pGM160. After protoplast mediated transformation in *S. lividans* TK64 the enzyme catalyzed reaction of catechol to the yellow 2-hydroxymuconicacid-semialdehyde was followed visually, or by absorption measurement at a wavelength of 395 nm. Like the tyrosinase from *S. antibioticus* which was already under control of a suitable promoter in the plasmid pIJ702, also the catechol 2,3- dioxygenase has proven to be a suitable reporter system for the usage in *S. lividans* as host organism. Both reporter genes already show a codon usage which is similar to *S. lividans*, further the as critical considered rare codons were not present within these genes. In order to perform assays also with fluorescent reporter genes, EGFP and DsRed were used. In case of EGFP an excitation wavelength of 488 nm stands opposite an emission wavelength of 507 nm. For DsRed respectively, the wavelengths are 558 and 583 nm. The genes were both ligated in pGM121. By this the constructs pEBO2A, respectively pEBO2B

were obtained. After protoplast transformation of pEBO2B in *S. lividans* TK64 as well by visual control of the colony color as with a SDS-PAGE no enzyme could be detected. It can be assumed that 5 TTA codons are responsible. The leucine codon TTA is not represented in *Streptomyces* genes which are used for vegetative growth. Since it can only be founded in some genes expressed during differentiation, it is assumed, that an early usage of this codon leads to a 'switch' from primary to secondary metabolism. A possible solution would consist in modifying TTA codons by site directed mutagenesis.

However, *S. lividans* TK64-pEBO2A expressed EGFP in low amounts, which could also be detected by SDS-PAGE. The quantitative detection was performed by fluorescence measurement in a microtiter plate reader. For the cultivation in microtiter plates two media were used. The synthetic medium was not suitable due to a low expression of EGFP. In a complex medium higher amounts of EGFP were obtained, but aromatic amino acids disturbed the measurements. In both cases the deviation of fluorescent measurements of cells expressing EGFP in comparison to wild type cells as background was too low and out of this not used in further experiments. Meanwhile in literature a suitable reporter system with EGFP is mentioned. By insertion of several point mutations a higher expression was obtained.

For evaluation of the expression of soil DNA and detection of lipase activity as a control also the BTL2 lipase from *B. thermocatenuatus* was used. Belonging to the triacylglycerineester-hydrolases (EC 3.1.1.3) an assay on agar plates can be performed by the enzymatic cleavage of the insoluble tributyrine to a water-soluble diglyceride and butyric acid. By this reaction, on tributyrine containing agar plates clear halos are formed. After PCR reaction the gene fragment was isolated and cloned in pGM121. This resulted in the construct pEBO2C. After transformation in *S. lividans* TK23 or TK64 respectively, and growth on tributyrine containing R5 agar, clear halos were obtained. The SDS-PAGE of cell lysate from *S. lividans* TK64-pEBO2C showed after coomassie staining a band with the expected size of 41 kDa.

Further agar plate screening systems are also for  $\alpha$ -amylases described.  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1) catalyse by insertion of water the random cleavage of the  $\alpha$ -1,4 glycoside bond of oligo- and polysaccharides. After the cleavage of the substrates dextrans are formed, which are further degraded to maltose, isomaltose and branched polysaccharides. The detection of amylase activity can be performed by decolourisation of the iodine-starch-complex. For the cloning of the  $\alpha$ -amylases from *B. amyloliquefaciens* the plasmid pJGSF14 was used. The BAA gene was isolated from pGBAA-WT and after insertion in pJGSF14 the plasmid pEBO3 was obtained. After transformation in *E. coli* ET12567 (pUB307) and growth on LB agar plates containing the antibiotic for selection and 1 % insoluble starch, within 24 h of

incubation in some cases halos were visible. Positive clones were selected and after cultivation over night, plasmids were transformed by intergeneric conjugation in *S. lividans* TK64. After growth approximately 80 % of the *Streptomyces* colonies showed halos. The SDS-PAGE of the cell lysate of *S. lividans* TK64- pEBO3 showed a band with the expected size of 58 kDa. The  $\alpha$ -Amylase from *B. amyloliquefaciens* was successfully expressed in both *E. coli* and *S. lividans* and can be used as a standard for amylase measurements.

In further experiments the different methods for the transformation of *Streptomyces* (protoplast transformation, electroporation, direct transformation and intergeneric conjugation) were evaluated due to an application for the preparation of gene libraries from soil DNA in *Streptomyces*. Of importance in this case is mainly the transformation efficiency, defined as colony forming units/  $\mu\text{g}$  DNA (cfu/  $\mu\text{g}$  DNA), but also the handling of the method, its reproducibility and possibilities for long time storage of competent cells. All methods require optimizations due to growth conditions, which are connected with the composition of the different media. The transformation efficiency is also influenced by the DNA, which is used for transformation. Since several *Streptomyces* strains express restriction enzymes, which cut foreign DNA with different methylation patterns, it was shown that higher transformation efficiencies were obtained after usage of unmethylated DNA. Unmethylated DNA can be obtained either by PCR reaction or alternatively by application of DNA from an *E. coli*- *Streptomyces* shuttle vector, which was grown in a methylation deficient *E. coli* strain like *E. coli* JM110 or ET12567. Further results the usage of single stranded plasmid DNA in higher transformation efficiencies. It is assumed that single stranded DNA, which is obtained by denaturation with heat or in alkaline environment, easier passes the cell wall. All methods for transformation were performed in accordance with standard instructions and in order to obtain reproducible results in common one parameter was modified. For the determination of the transformation efficiency for each experiment the number of transformants of 4 to 6 plates were used and the average calculated. Depending on the experiment, either the catechol 2,3-dioxygenase (pFis-Xyl) or the tyrosinase (pIJ702) was used.

In preliminary experiments some *Streptomyces* and Actinomyces strains were tested for their ability to restrict plasmid DNA. Cell lysates, which were obtained after ultrasonic treatment of the strains, were incubated with pGM160 plasmid DNA. After gel electrophoresis either smears were visible, indicating that the plasmid DNA was restricted, or the plasmid band was obtained uncut. From the tested strains *S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64 and *S. venezuelae* showed no restriction of plasmid DNA. Other strains like *S. coelicolor* A3(2), *S.*

*albus*, *S. rimosus*, *S. venezuelae* and *S. griseus* and the Actinomyces strain *Amycolatopsis mediterranei* showed in some cases in a strong degradation of plasmid DNA. From these strains also *S. coelicolor* A3(2) was further examined.

The influence of unmethylated and heat denaturated pGM160 plasmid DNA was examined after protoplast transformation in *S. lividans* TK64 and *S. coelicolor* A3(2). Like expected showed the transformation of *S. lividans* TK64 with unmethylated and heat denaturated DNA no improvement of transformation efficiencies. Up to  $10^6$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA were obtained. With *S. coelicolor* A3(2) as host organism  $10^4$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA were obtained in case of unmethylated and heat denaturated DNA. It can be assumed that non modified DNA is easier cleaved by *S. coelicolor* A3(2).

Out of these results in all further experiments unmethylated and heat denaturated plasmid DNA were used for the evaluation of the different transformation methods.

The protoplast mediated transformation of *Streptomyces* is the most common method. Of importance for the quality of competent cells are the growth medium, the age of harvested mycel for transformation and further the charge and polymerization grade of the polyethylenglycole (PEG) used in the transformation buffer. Best results were obtained when *S. coelicolor* A3(2) was cultivated until reaching the late log phase. In case of *S. lividans* TK23 and TK64 the harvest of cells within the early logarithmic growth phase has proven better results. In case PEG1000 from Fluka was used best transformation efficiencies of  $10^6$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA were obtained. Higher polymerization grades (PEG4000 and PEG6000) resulted in fewer colonies, like usage of PEG from other companies. Of influence was further the medium used for agar plates. The usage of R5 medium as plate medium, followed by an overlay with antibiotic containing R3 soft agar, have proven best results. *S. lividans* TK23 or TK64 showed with  $10^6$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA the highest transformation efficiencies. For the transformation of *S. coelicolor* A3(2) not more than  $10^4$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA could be obtained.

Another method for the transformation of *Streptomyces* can be performed by electroporation. The application of a short electrical impulse of high voltage introduces the DNA in the target cell. In comparison to the protoplast transformation by electroporation in common less transformands are obtained, of advantage is that less efforts have to be made to adapt this method to another strain.

After cultivation of *S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64 and *S. coelicolor* A3(2) in CRM medium, cells were harvested, mixed with plasmid DNA and submitted to an electrical impulse of 2.0 V and 400  $\Omega$ . After growth for 24 h on R5 agar medium, the plates were overlaid with antibiotic containing R3 soft agar. Highest transformation efficiencies of  $10^2$

cfu/  $\mu\text{g}$  DNA were obtained after 3 d of cultivation with *S. lividans* TK23 or TK64 as host organism. For the transformation of *S. coelicolor* A3(2) values lower than  $10^1$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA were obtained.

The direct transformation of the mycel was introduced as an alternative method, mainly in cases where the development of a protoplast transformation protocol was either too difficult or impossible, e.g. for *Nocardia* and *Amycolatopsis* strains. After the direct transformation of *A. mediterranei* with the conditions described in the standard protocol 5 colonies were obtained. The application of this method towards *S. lividans* TK23 did not result in the formation of colonies. Mainly out of low transformation efficiencies but also due to long cultivation times of 2 to 3 weeks this method is not suitable for standard applications.

Another method for introduction of DNA in *Streptomyces* is the intergeneric conjugation. This method requires mobilized elements within the host organism. By application of the standard protocol *S. coelicolor* A3(2) and *S. lividans* TK64 spores or mycel were transformed with pJGSF14 plasmid DNA. In case of *S. coelicolor* A3(2) transformation efficiencies of maximal  $10^3$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA were obtained, whereas after transformation of *S. lividans* TK64  $10^5$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA were counted. The intergeneric conjugation is an easy performable method and requires in comparison to the protoplast transformation less time. Within this project the intergeneric conjugation may not be used for the transformation of soil DNA. Out of this reason the method of choice is the protoplast transformation. A comparison of transformation efficiencies obtained for the different methods is shown in figure 1.

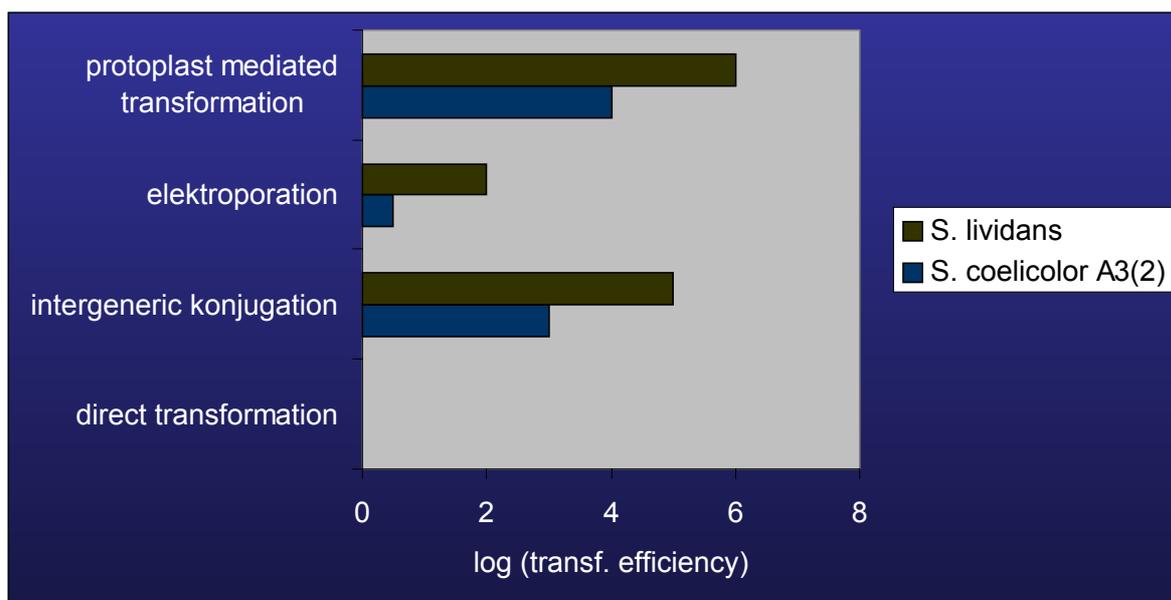


Figure1: Transformation efficiencies obtained for the different transformation methods of *Streptomyces*.

As a suitable method for gaining DNA out of soil samples a combined extraction with liquid nitrogen and a mechanical disruption with glass beads has proven the best results. After precipitation of proteins with ammonium acetate and twice phenol chloroform extraction, the DNA was precipitated from the supernatant with ethanol. Due to a high content with humic acids and heavy metals a further purification with the Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System or with Chroma Spin + TE-1000 columns was required. Afterwards a partial or complete digestion under standard conditions with *Sau3AI*, *BamHI*, *BglII*, *SacI*, *DraIII*, *NcoI* or *XbaI* as restriction enzymes was possible. *BglII* digested DNA was ligated in pIJ702 and with *NcoI* or *XbaI* restricted DNA was introduced in pGM160. Since both plasmids show with a size of 5.7 kb and 7.8 kb respectively, low ligation and transformation efficiencies also the *Streptomyces* part of pGM160 was used. After digestion of the pGM160 shuttle vector with *SacI*, the 3.5 kb fragment was religated and the resulting construct pEBO2' was used for the ligation via *SacI*, *DraIII* and *NcoI* restriction sites. Best results for the ligation of DNA from soil were obtained after digestion with *BglII* or *DraIII*, followed by insertion in the plasmids pIJ702 or pEBO2'. By usage of these restriction enzymes in average 80 to 120 clones per plate were obtained. These plasmids were introduced by protoplast mediated transformation in *S. lividans* TK23 or TK64. After 3 d of cultivation the assay for lipase activity was performed by an overlay with a R5 softagar/ tributyrin emulsion. Further control experiments were required since both the *S. lividans* TK23 and TK64 genome are probably coding several lipases. Out of this reason the BTL2 lipase was used as a control. *S. lividans* TK23-pEBO2C and *S. lividans* TK64-pEBO2C grown on R5 medium and overlaid with softagar and tributyrin showed after 1 to 2 d the formation of halos. In comparison showed *S. lividans* TK23 and TK64 cells transformed with pGM121 not before 5 to 6 d halos as reaction for genome coded lipases. Out of these results it was assumed that the active expression of a new lipase from soil DNA would also lead within 1 or 2 d to the formation of halos. Altogether approximately 18500 clones were screened for lipase activity, but no positive clone was obtained.

For the validation of the preparation of gene libraries of DNA from soil, at the beginning of the purification procedure the plasmid pEBO1, containing the catechol 2,3-dioxygenase, was added to the soil sample. After the overlay of transformed *S. lividans* TK23 with catechol containing softagar, the expression of the catechol 2,3-dioxygenase was in some cases detected. 2 from 3000 screened colonies proved by the application of the assay to contain the gene. In another experiment pEBO2C, containing the BTL2 lipase, was added to the soil sample. In this case 1 of 2200 screened colonies showed after transformation in *S. lividans*

TK64 the formation of a halo. These results show that in principle it is possible to find DNA within the soil sample by screening. In contrast a comparatively high amount of DNA had to be added to get a positive result. It can be assumed that much higher number of colonies have to be screened to achieve a hit.

In further experiments the ability of mycel forming *Streptomyces* to grow in microtiter plates was examined. A further criteria was the ability of *Streptomyces* to express a recombinant enzyme in reproducible amounts. By this the suitability of *Streptomyces* for performing assays in microtiter plates was tested.

In order to achieve good growth conditions for the cells at first a solid medium was chosen. Colonies of *S. albus*, *S. albus* G, *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23 and TK64 were picked and transferred to the plates containing 200 µl of solid R5 medium per well solid medium. After cultivation at 30 °C for 72 h the formation of *Streptomyces* mycel was observed in all cases. To investigate if *Streptomyces* is a suitable host for the high throughput screening of heterologously expressed genes, *S. lividans* TK23 pFis-147.9 and *S. lividans* TK64 pFis-147.9, expressing the catechol 2,3-dioxygenase, were grown on 200 µl of solid R5 medium per well. After 24 h of cultivation, 40 µl of R5 agar medium with the appropriate antibiotic for selection was added for plasmid selection. 48 h later expression of the reporter enzyme catechol 2,3-dioxygenase was detected by addition of an aqueous solution of catechol in different concentrations per well. Incubation for 30 minutes at 30 °C resulted in the production of the yellow product in wells with 360 µM catechol. For all other concentrations used, the formation of a brownish color, as result of the oxidative effect of catechol on the medium, was observed.

Next, the growth behaviour of *S. albus*, *S. albus* G, *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23 and TK64 in 96 well plates containing liquid medium was investigated. Therefore, 200 µl of TSB, R5, MG or SM medium were inoculated with the appropriate strains and cultivated for 72 h of at 30 °C and 220 rpm. A reproducible growth of these strains was only detected in R5 medium, whereas in TSB and SM medium and especially in the synthetic MG medium, growth of the cells was observed in less than 90 % of the inoculated wells. Therefore, further cultivation experiments were performed in R5 medium.

For the expression of the catechol 2,3-dioxygenase in 96 well format, wells were inoculated with *S. lividans* TK23 pFis-147.9 and *S. lividans* TK64 pFis-147.9 in R5 medium and incubated for 24 h at 30 °C and 220 rpm before adding 50 µl of R5 medium with 250 µg/ml thiostrepton. After further 48 h of cultivation under the same conditions the supernatant was separated by centrifugation. The assay for the detection of catechol 2,3-dioxygenase activity

was performed by addition of 720  $\mu\text{M}$  catechol. The cells were further incubated for 30 min at 30  $^{\circ}\text{C}$ , followed by measuring the absorption of the product in the supernatant at 410 nm. Reproducible values of 1.48 and 1.46 were obtained for *S. lividans* TK64 pFis-147.9 and *S. lividans* TK23 pFis-147.9, respectively. Background measurements of wild type strains resulted in absorption values of 0.68, while the absorption of the R5 medium itself was 0.62 .

As 384 well plates are frequently used for high throughput assays, the ability of *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23 and TK64 to grow in R5 medium in this format was tested. 100  $\mu\text{l}$  of R5 medium were inoculated with the different strains, and grown at 30  $^{\circ}\text{C}$  and 220 rpm. After 72 h, cell growth was detected in approximately 95 percent of the inoculated wells, indicating that also this format is still useable with streptomycetes. For the expression of the catechol 2,3-dioxygenase in 384 well plates, *S. lividans* TK23 pFis-147.9 and *S. lividans* TK64 pFis-147.9 were grown in 80  $\mu\text{l}$  R5 medium at 30  $^{\circ}\text{C}$  and 220 rpm. After 24 h of cultivation 20  $\mu\text{l}$  of R5 medium thiostrepton were added. After 48 h of cultivation under the same conditions the assay for the catechol 2,3-dioxygenase was performed by the addition of 90  $\mu\text{M}$  catechol per well. In contrast to the 96 well plates, it was not possible to distinguish the yellowish color with the naked eye, due to the low amount of the heterologous expression product within one well. Nevertheless, absorption measurements resulted in values of 1.77 and 1.68 for *S. lividans* TK64 pFis-147.9 and *S. lividans* TK23 pFis-147.9, respectively (Figure 2).

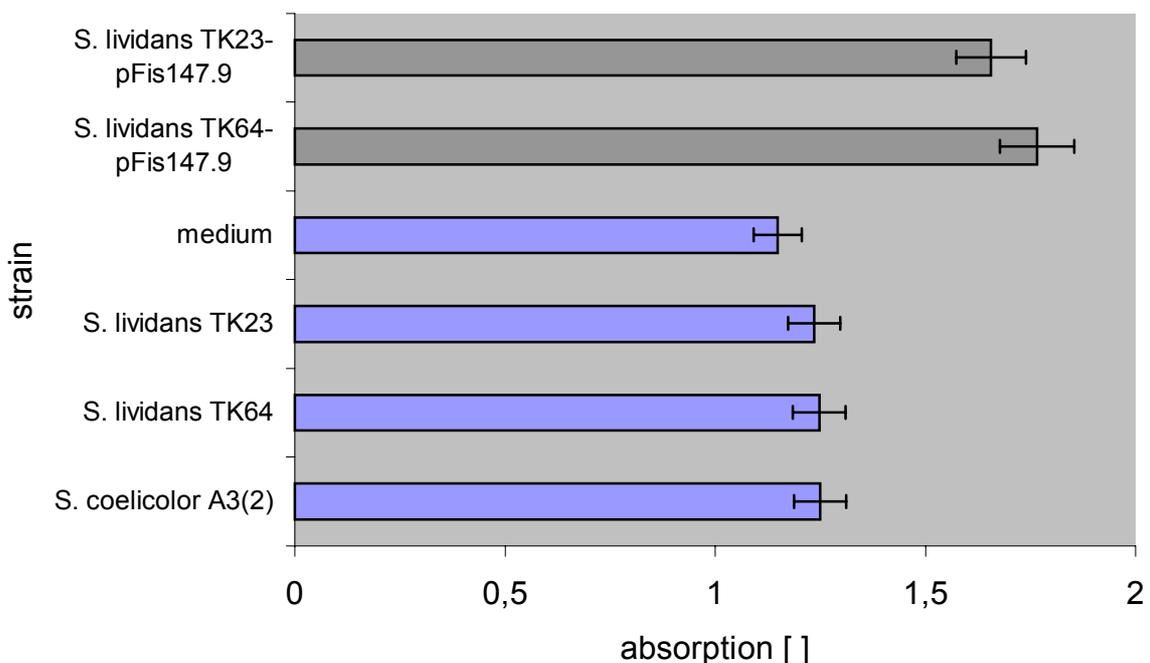


Figure 2: Absorption measurements in 384 well microtiter plates.

In order to substantiate the reliability of these results the standard deviation of approximately 50 wells of each strain, *S. lividans* TK64 pFis-147.9 and *S. lividans* TK23 pFis-147.9, in both 96 and 384 well format, was determined. The standard deviation for 96 well microtiter plates was  $\sigma = 0.07$  and  $\sigma = 0.05$  for the 384 well format. By this, results were obtained which could be compared with assay systems performed in *E. coli* as host organism.

*Streptomyces* strains can be cultivated in 96 well and 384 well microtiter plates. Due to their hydrophobic surface, the *Streptomyces* mycel attached the wells at the surface of the liquid. Out of this the separation of mycel and supernatant resulted in comparatively long centrifugation times of approximately 45 minutes at 4000 g. Suitable filterplates offered a possibility in avoiding long centrifugation times. The assay for the detection of the catechol 2,3-dioxygenase activity could be performed in a reproducible way, with deviations less than 10 percent.

From these results we conclude that other enzyme assays based on absorption or fluorescence measurements are realizable with similar error rates. This leads to a possible usage of *Streptomyces* as host organism for performing high throughput screening in microtiter plates, offering with its codon usage and high GC content a suitable screening system for the detection and mutagenesis of enzymes from streptomycetes and related organisms with similar GC contents.

1	Einleitung .....	1
1.1	Actinomyceten.....	1
1.2	Streptomyceten.....	2
1.2.1	Lebenszyklus.....	4
1.2.2	Genetische Merkmale.....	6
1.2.3	Streptomyces als Expressionssystem .....	8
1.3	Enzyme aus Umweltproben.....	11
1.4	Zielsetzung.....	14
2	Material und Methoden .....	15
2.1	Geräte.....	15
2.2	Chemikalien und Enzyme.....	16
2.3	Kommerzielle Kits.....	18
2.4	Primer .....	19
2.5	Verbrauchsmaterialien.....	19
2.6	Bakterienstämme, Plasmide und Stammlösungen .....	20
2.7	Nährmedien .....	22
2.8	Stammhaltung und Kultivierung .....	24
2.8.1	Stammhaltung von <i>E. coli</i> .....	24
2.8.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	24
2.8.3	Stammhaltung von <i>Streptomyces</i> .....	25
2.8.4	Kultivierung von <i>Streptomyces</i> .....	25
2.9	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.9.1	Isolierung genomischer DNA aus Actinomyceten bzw. Streptomyceten .....	26
2.9.2	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> mit Kits von Qiagen, Peqlab oder Gibco.....	26
2.9.3	Mini-Plasmid Extraktion für Schnelltests .....	26

2.9.4	Isolierung von Plasmid DNA (Mini Lyse) aus <i>Streptomyces</i> .....	27
2.9.5	Nachweis stammspezifischer Restriktionsbarrieren.....	28
2.9.6	Transformation von <i>E. coli</i> (DMSO Methode) .....	28
2.9.7	Transformation von <i>E. coli</i> (RbCl Methode) .....	28
2.9.8	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation.....	29
2.9.9	Protoplastentransformation von <i>Streptomyces</i> .....	30
2.9.10	Elektroporation von <i>Streptomyces</i> .....	33
2.9.11	Direkte Transformation von <i>Streptomyces</i> .....	34
2.9.12	Intergenerische Konjugation .....	36
2.9.13	Schnellbestimmung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> bzw. <i>Streptomyces</i> Kolonien .....	36
2.9.14	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	37
2.9.15	DNA- Fällung mit Ethanol.....	37
2.9.16	DNA- Fällung mit Isopropanol .....	37
2.9.17	Phenol-Chloroform Extraktion.....	37
2.9.18	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	38
2.9.19	DNA Restriktionsverdau und Ligation .....	38
2.9.20	Direkte Klonierung von PCR Produkten.....	38
2.9.21	Agarosegelelektrophorese von Plasmid DNA.....	38
2.9.22	SDS PAGE .....	40
2.9.23	Aufschluß und Aufreinigung von DNA aus Böden .....	42
2.9.24	Erzeugung von Genbanken aus DNA aus Böden.....	43
2.9.25	Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	43
2.9.26	DNA Sequenzierung .....	44
2.9.27	Lipase-, bzw. Esteraseassay mit 1-Naphthylacetat .....	45
2.9.28	Lipase-, bzw. Esteraseassay mit tributyrinhaltigen Agarplatten .....	46
2.9.29	Assay auf Amylaseaktivität mit stärkehaltigen Agarplatten .....	46
3	Ergebnisse .....	47
3.1	Konstrukte für die Validierung der Expression.....	47
3.1.1	Catechol-2,3-dioxygenase .....	47
3.1.2	EGFP und DsRed .....	48
3.1.3	BTL2 Lipase.....	50
3.1.4	$\alpha$ -Amylase aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BAA).....	52

3.2	Transformation von Streptomyces .....	53
3.2.1	Stammspezifische Restriktion .....	55
3.2.2	Modifikation von Plasmid DNA .....	56
3.2.3	Protoplastentransformation .....	58
3.2.4	Elektroporation .....	62
3.2.5	Direkte Transformation .....	64
3.2.6	Intergenerische Konjugation .....	65
3.3	E. coli BL21-CodonPlus als Expressionssystem für GC-reiche DNA .	65
3.4	Genbanken aus Boden DNA .....	68
3.4.1	Validierung der Herstellung der Genbanken aus Boden DNA .....	72
3.5	Expression in Mikrotiterplatten .....	73
3.5.1	Kultivierung und Expression im 24 und 64 well Format .....	73
3.5.2	Kultivierung im 96 well Format mit Festmedium .....	75
3.5.3	Kultivierung in 96 well Format mit Flüssigmedium .....	76
3.5.4	Kultivierung und Expression im 384 well Format .....	79
4	Diskussion .....	84
4.1	Optimierung der Transformation .....	85
4.2	E. coli BL21-CodonPlus .....	88
4.3	Erstellung von Genbanken aus Boden DNA .....	88
4.4	Screening der Genbanken auf Enzymaktivität .....	90
4.5	Wachstum von Streptomyces in Mikrotiterplatten .....	91
5	Zusammenfassung .....	95
6	Literatur .....	96
7	Eidesstattliche Erklärung .....	109
8	Lebenslauf .....	109

## Abkürzungen

<i>A.</i>	<i>Amycolatopsis</i>
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	stöchiometrische Konzentration [mol/ l]
Cam/ Cat	Chloramphenicol
d	Tag (day)
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	3'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig (double stranded)
DSM	Deutsche Stammsammlung
DsRed	<i>Discosoma</i> red fluorescent protein
dTTP	3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
F	Farad (Kapazität eines Widerstands [ $s A^2/ W$ ])
FACS	fluorescence activated cell sorting
g	Erdbeschleunigung [ $9.81 g/m^2$ ], <i>Gramm</i>
h	Stunde
HTP	Hochdurchsatzscreening (high throughput screening)
IPTG	Isopropyl- $\lambda$ -thio-galactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter

lacZ	$\beta$ -Galactosidasegen ( <i>E. coli</i> )
LB <sub>0</sub>	Luria Bertani-Medium
m	Meter
M	Molar [mol/ l]
M/ V	Masse pro Volumen
mA	Milliampère
mel	Tyrosinasegen
Min.	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MTP	Mikrotiterplatte
Nal	Nalidixinsäure
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
pH	potentia hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen (H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> )
rha	Rhamnose
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
SDS	Natrium dodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
Spc	Spectinomycin
Str	Streptomycin
ss	Einzelsträngig (single stranded)
Str	Streptinomycin
TAE	Tris-Eisessig-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEff.	Transformationseffizienz
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	N-tris[Hydroxymethyl]methyl-2-aminoethansulfonsäure
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tsr	Thiostrepton

upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V/ V	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
Xyl	Xylanase
$\lambda$	Wellenlänge in nm
$\Omega$	Ohm

# 1 Einleitung

## 1.1 Actinomyceten

Actinomyceten sind in der Natur weit verbreitet, etwa ein Drittel aller Bakterien zählt zum diesem Genus (Goodfellow et al. 1984; Goodfellow 1989). Eine vorläufige Zuordnung von Bakterien kann aufgrund der Gram-Färbung, einer Farbreaktion des Zellwandbestandteils Peptidoglycan (Rogers 1974; Petit 1978) mit Kristallviolett und der Bestimmung des prozentualen Gehalts des Bakteriengenoms an den Nukleotiden Guanin und Cytosin (GC-Gehalt) erfolgen. So werden Gram-positive Bakterien in die Gruppe der GC-armen Organismen, zu denen beispielsweise *Bacillus*, *Clostridium* und *Staphylococcus* zählen und die GC-reichen Organismen, die sogenannten Actinomyceten, unterteilt. Außer einem GC-Gehalt von mehr als 55 Mol% ist den Actinomyceten das überwiegend vorkommende mycelartige Wachstum gemein. Eine Eigenschaft, die sie den Pilzen ähneln läßt und bis zu Beginn des 19. Jahrhunderts zu einer falschen Klassifizierung führte. Um die natürliche Diversität dieses Genus zu beschreiben, hat sich eine Unterteilung aufgrund der Taxonomie und des Phänotyps als unzureichend erwiesen, so daß heute überwiegend auf die Sequenzanalyse von hoch konservierten Bereichen, beispielsweise der 16S RNA (Olsen & Woese 1993; Mehling et al. 1995; Ovreas et al. 1998), zurückgegriffen wird. Aufgrund einer zu hohen Homologie der 16S RNA können die Verzweigungen des phylogenetischen Stammbaums innerhalb der Gruppe der Grampositiven Bakterien allerdings nicht ausreichend aufgelöst werden (Fox et al. 1992). So ergibt der paarweise Homologievergleich von *Bacillus* Stämmen Werte zwischen 82.7% und 94.5 % auf 16S RNA Basis. In Abbildung 1 wird anhand des Transkriptionsfaktors *hrcA* (Ahmad et al. 1999), zuständig für die Regulation von Hitzeschockproteinen, die Verwandtschaft der Actinomyceten zu den Gram-positiven Bakterien niedrigen GC-Gehalts verdeutlicht. In diesem Fall liegt die Homologie in einem Bereich von 24% bis zu 80%.

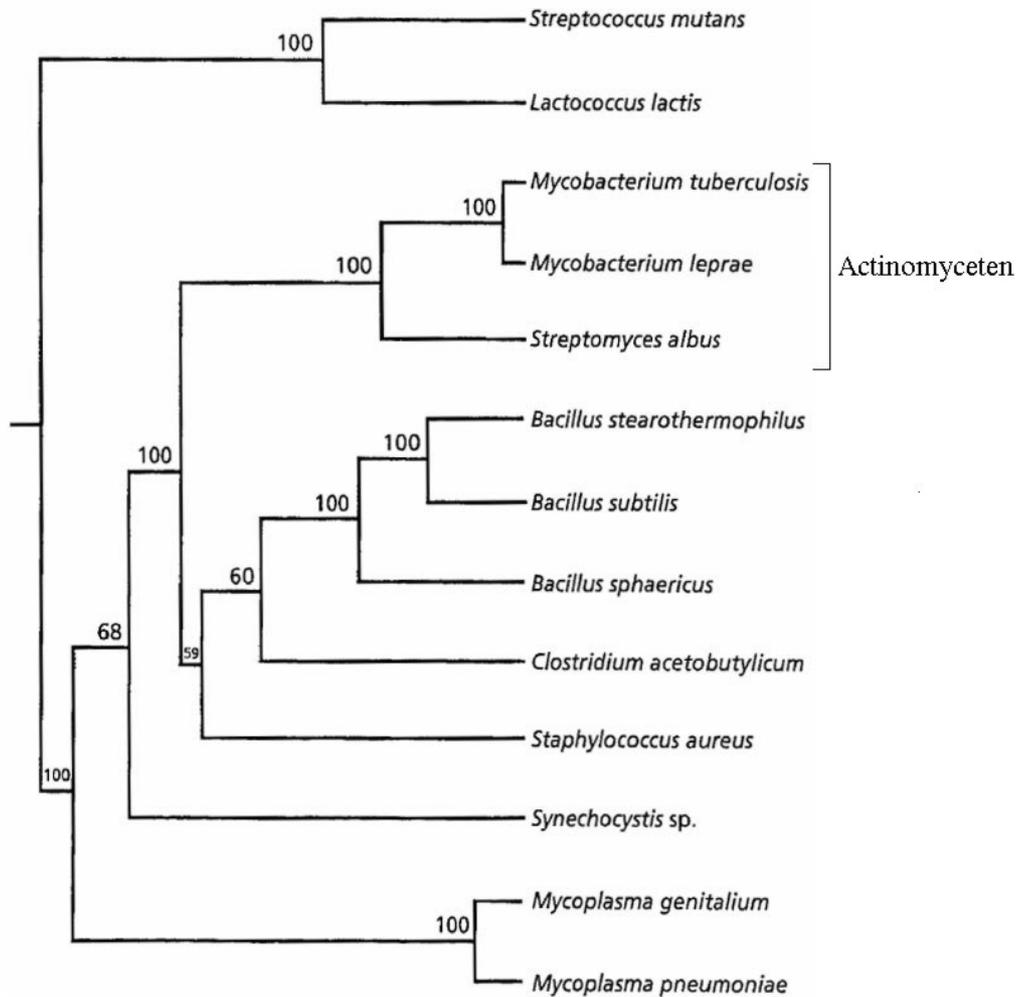


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum von Gram-positiven Bakterien anhand des Transkriptionsfaktors *hrcA*.

## Streptomyceten

Streptomyceten sind wie die pleomorphen Actinomyceten Gram-positive und filamentös wachsende Bakterien, die überwiegend in Böden (Anne & Van Mellaert 1993) vorkommen. Mit einem GC-Gehalt von durchschnittlich 72% erreicht das Streptomyceten Genom den höchsten in der Natur vorkommenden Wert (Wright & Bibb 1992). Das lineare Chromosom besitzt im Regelfall eine Größe von etwa 8 Megabasen (mb) und ist damit doppelt so groß wie das Genom von *Escherichia coli*. Vor allem durch die Produktion verschiedenster Antibiotika und Hybridantibiotika (Martin 1992; Hutchinson et al. 1993; Bibb 1996; Baltz 1998) sind Streptomyceten in den Blickpunkt der Molekularbiologie gerückt. So werden von Bakterien des Genus *Streptomyces* über die Hälfte der momentan bekannten Antibiotika (etwa 10000 bis 12000) produziert. Im Regelfall kodiert das Genom eines

Streptomyceten für mehrere Antibiotika Biosynthesewege aber auch für eine Vielzahl anderer Sekundärmetabolite zum Beispiel Cytostatika, Herbizide, Fungizide, Enzym-Inhibitoren und andere Substanzen mit pharmakologischer Wirkung (Anne & Van Mellaert 1993). Insgesamt werden mehr als zwei Drittel aller biologisch aktiven Substanzen von Streptomyceten produziert.

Streptomyceten durchlaufen einen wesentlich komplexeren Lebenszyklus als beispielsweise *E. coli*. Das äußert sich u.a. in einer Vielzahl von verschiedenen Faktoren und Promotoren zur Genregulation. Als problematisch hat sich die gegenseitige Abhängigkeit von Differenzierung und Primär- bzw. Sekundärmetabolismus erwiesen. Fortschritte auf diesem Gebiet verspricht man sich u.a. von der kürzlich fertiggestellten Genomsequenz von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Sanger Center, Norwich, Great Britain). Gemeinhin wird *S. coelicolor* A3(2) als ‚Modellorganismus‘ (Redenbach et al. 1996) für die übrigen Streptomyceten angesehen.

In Abbildung 2 ist die Genomkarte von *S. coelicolor* A3(2) abgebildet. Das Genom umfaßt 8.67 mb in dem mehr als 7500 offene Leseraster (ORFs) und damit etwa 20 Prozent mehr Gene als in *Saccharomyces cerevisiae* kodiert werden. Die Größe des Genoms läßt sich in diesem Fall nur teilweise auf Gene des Sekundärstoffwechsels zurückführen. 25 Gencluster, davon vier zur Antibiotikabiosynthese, kodieren für Sekundärmetabolite, die jedoch nur sechs bis sieben Prozent des *S. coelicolor* A3(2) Genoms repräsentieren. Eine Vielzahl von Genen wird außerdem für komplexe Regulationsmechanismen benötigt. Mehrere hundert Transkriptionsregulatoren und etwa 60  $\sigma$  Faktoren, die als Untereinheit des RNA-Polymerase-Holoenzym zur Transkription notwendig sind, geben Hinweise auf die Anpassungsfähigkeit von *S. coelicolor* A3(2) und anderen Streptomyceten an verschiedenste Umweltbedingungen und den komplexen Lebenszyklus.

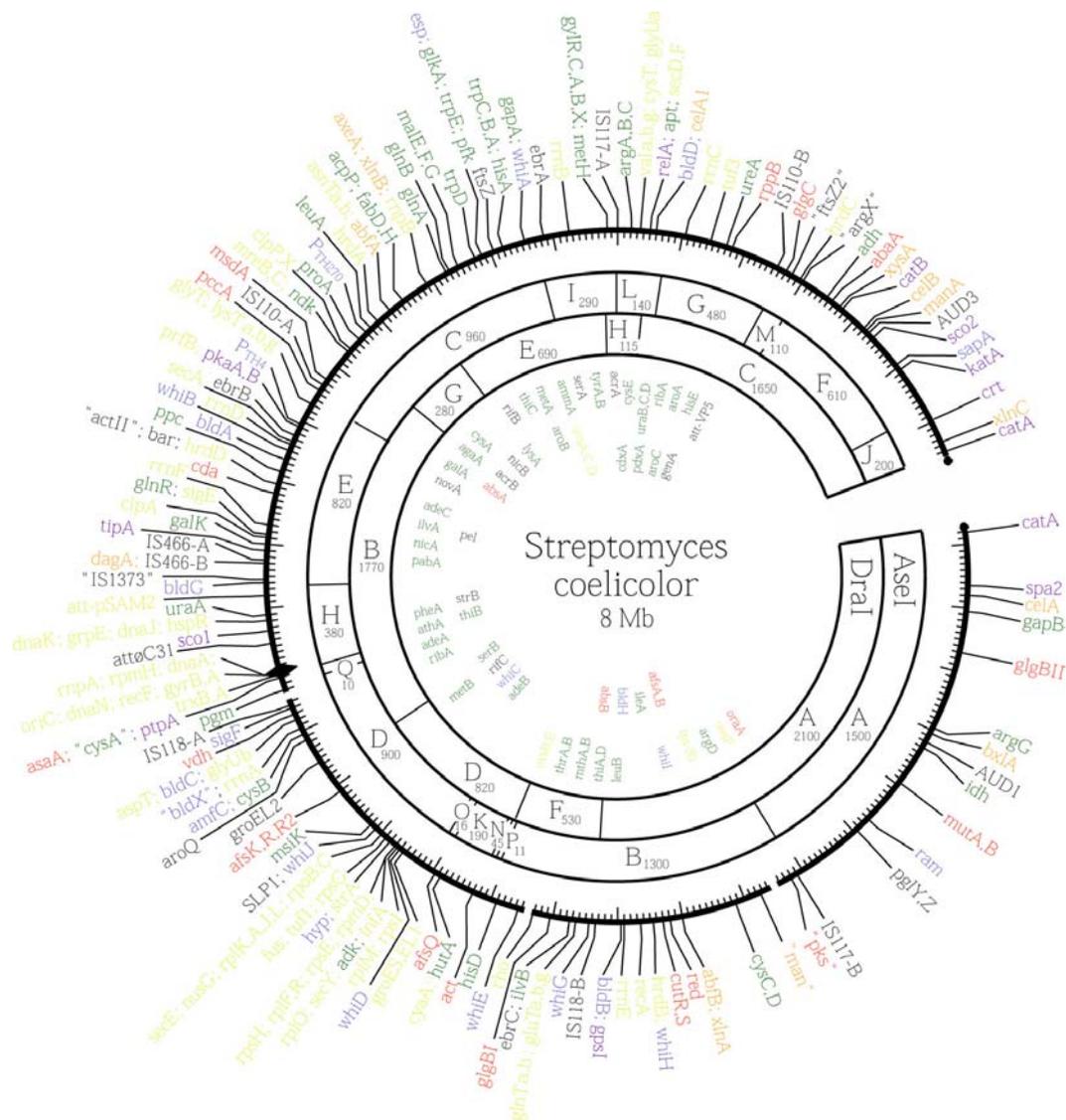


Abbildung 2: Genomkarte von *S. coelicolor* A3(2) (Redenbach et al. 1996). Im äußeren Ring ist die Position der Gene und des Transkriptionsstarts markiert. Die beiden inneren Ringe enthalten die *AseI* und *DraI* Restriktionsschnittstellen, die zum Aufbau einer Cosmidbank herangezogen wurden.

### 1.1.1 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus (Hopwood 1988; Minas et al. 2000), in Abbildung 3 gezeigt, ist für die Stammhaltung und molekularbiologischen Arbeiten von entscheidender Bedeutung. Streptomyceten wachsen im Allgemeinen unter obligat mesophilen und aeroben Bedingungen in einer eher trockenen Umgebung, so beispielsweise in Böden (Anne & Van Mellaert 1993). Ausgehend von einer Kolonie erweitern sich die Zellwände in Form von septierten, multinuklealen Hyphen. Die Gesamtheit der Hyphen bildet das Mycel. Hier wird zwischen dem Luft- und Substratmycel unterschieden. Letzteres ist für die Aufnahme der Nährstoffe

verantwortlich und in der Lage, unlösliches organisches Material, wie Zellwände von Pilzen oder Pflanzen, zu durchdringen. Im Luftmycel werden in der späten exponentiellen Wachstumsphase Zellwände aufgebaut, wodurch die mehrere Kopien des Genoms enthaltende Hyphe in mehrere Einzelkompartimente, mit jeweils nur einer Kopie des Genoms, unterteilt wird. Diese Aneinanderreihung der Einzelkompartimente erlaubt der Zelle in der stationären Wachstumsphase oder in der einsetzenden Sterbephase die Aufteilung in Sporen. Die Sporen, als ungeschlechtliche Vermehrungskörper, sind nach Keimung in der Lage, eine neue Kolonie auszubilden und so den Kreislauf von Neuem zu durchlaufen.

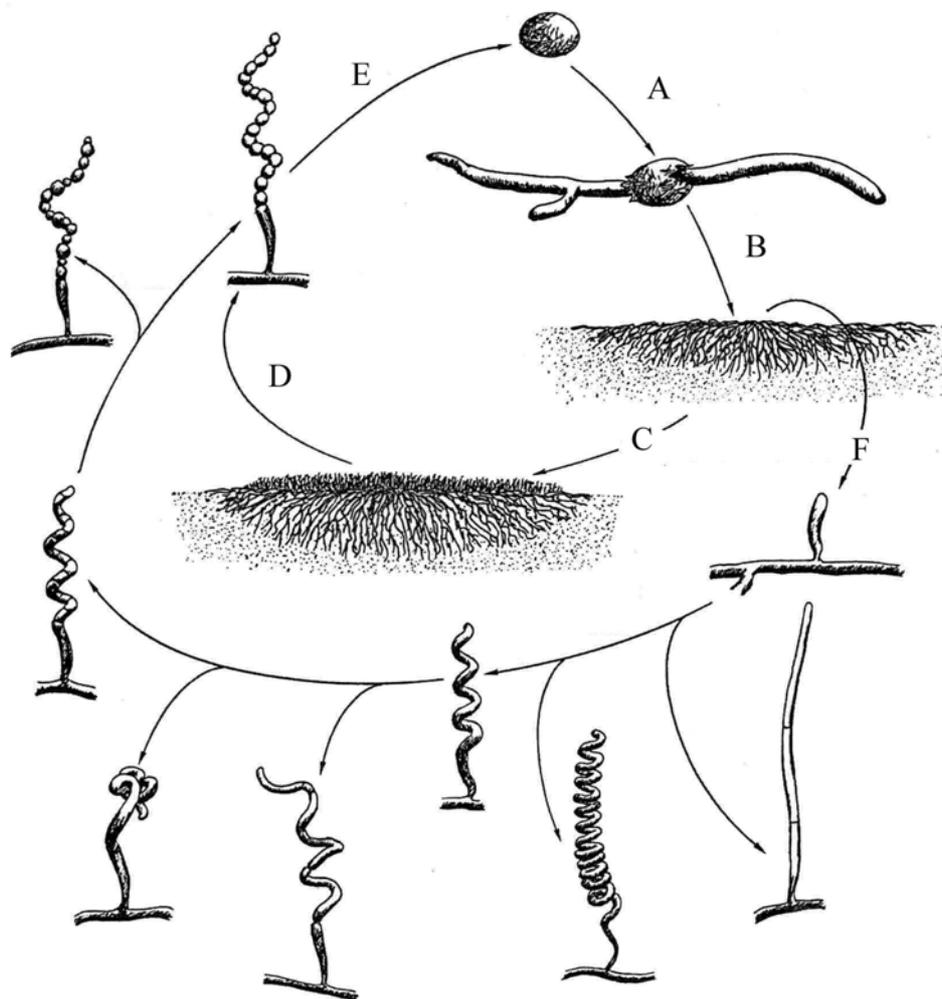


Abbildung 3: Lebenszyklus von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bibb et al. 2000): Unter optimalen Bedingungen entwickeln sich aus einer Spore zwei Hyphen (A). Durch Verlängerung und Verzweigung der Hyphen entsteht das Substratmycel (B), aus dem sich nach 2 bis 3 Tagen das Luftmycel entwickelt (C). Durch die Ausbildung von Zellwänden im Luftmycel entstehen Sporen (D), die den Zyklus von Neuem durchlaufen können (E). Die Entwicklung der Lufthyphen bis hin zur Sporenkette (F): durch die Gene *whiA* bis *whiK* bilden sich die ersten Einzelkompartimente innerhalb des Luftmycels aus. Mit verstärkter Unterteilung bildet sich die charakteristische spiralförmige Struktur, bis hin zur Sporenkette.

Am Wachstumsprozeß sind eine Vielzahl von Genen bzw. deren Produkte beteiligt. A-Faktoren (Beppu & Horinouchi 1991; Horinouchi & Beppu 1992), Moleküle von niedrigem Molekulargewicht wie beispielsweise das  $\gamma$ -Butyrolacton (Bibb 1996), fungieren als Signalüberträger und spielen eine entscheidende Rolle bei der Hyphenbildung. Die Sporenbildung hingegen wird weitgehend von *whi* Genen (Davis & Chater 1992; Kelemen et al. 1996; Kelemen et al. 1998; Molle et al. 2000) gesteuert. Für die Bildung der hydrophoben Oberfläche des Luftmycels, allgemein für die Differenzierung, sind *sap* Gene verantwortlich. Sie erniedrigen die Oberflächenspannung auf der Kolonieoberfläche und ermöglichen die Ausbildung der Lufthyphen. Die Aufklärung der an der Differenzierung beteiligten Gene erfolgte durch gezielte Mutationen. Sie resultierten in Mutanten (Servin-Gonzalez et al. 1997; Bibb et al. 2000), die verschiedene Defekte bei Hyphenbildung und Sporulation aufweisen und Kolonien mit glatter Oberfläche bilden.

### 1.1.2 Genetische Merkmale

Die Genregulation bei *Streptomyces* ist komplexer als bei *E. coli*. Eine Vielzahl von  $\sigma$  Faktoren (Kelemen et al. 1996; Missiakas & Raina 1998) kombiniert mit bis zu vier hintereinandergeschalteten Promotoren dienen zur Regulation der Genexpression. Der Transkriptionsstart erfolgt in 63% der Fälle mit ATG (Methionin), weiterhin werden auch GTG (Valin) mit 36 % sowie TTG und CTG (beide Lysin) unter einem Prozent gefunden. Die Termination wird, wie teilweise auch bei *E. coli*, durch rho-unabhängige Faktoren reguliert. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Ausbildung selbstkomplementärer Strukturen am Ende des Gens, die durch den hohen GC-Gehalt begünstigt werden (Wright & Bibb 1992; Moreau et al. 1994). Durdurch erfolgt das Abfallen der Polymerase vom DNA-Strang und somit eine Termination der Transkription.

Streptomyceten sind in der Lage, eine Vielzahl von organischen Substraten als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) zu verwerten (Sabater et al. 1972; Salas et al. 1984; Cortes et al. 1986). Allerdings bestehen zwischen verschiedenen Streptomyceten Unterschiede im Primärmetabolismus. Hauptsächlich werden Glycolyse, der Hexose Monophosphat Pathway und der Krebszyklus benutzt, nachdem im Regelfall Zucker aus dem Nährmedium nach vorheriger Phosphorylierung durch spezifische Kinasen in die Zelle importiert wurden. Es hat den Anschein, daß die Zelle bei der Verwendung dieser Zyklen einer Induktion durch das Substrat unterliegt. Weiterhin kann eine Katabolitrepessionen erfolgen, bei der die Verwendung einer C-Quelle die anderen Stoffwechselwege unterdrückt. Bei dem Übergang

vom Primär- zum Sekundärmetabolismus kommt es oftmals zu Änderungen im Stoffwechsel (Cochrane 1996), es werden andere Biosynthesewege und damit andere Substrate verwendet. Dadurch wird zwar die Produktion der Antibiotika begünstigt, unter Umständen jedoch die Expression von rekombinanten Proteinen erschwert. Weiterhin kann bei Streptomyceten das lacZ Gen nicht als Marker verwendet werden (King & Chater 1986), da sie nicht zur Verstoffwechslung von Lactose in der Lage sind.

Für die Metabolisierung von Stickstoff werden in allen Streptomyceten mehrere Biosynthesewege benützt (Bascaran et al. 1989). So kann die Assimilierung von geringen Stickstoffkonzentrationen aus der Umgebung über die Glutamat-Synthase erfolgen. Durch die 2-Oxoglutarat Transaminase ist der Organismus hingegen befähigt, Stickstoff in höherer Konzentration aufzunehmen.

Der Aminosäurekatabolismus (Aharonowitz & Friedrich 1980; Behrmann et al. 1990; Hood et al. 1992) ähnelt weitgehend dem der anderen Bakterien. Ein deutlicher Unterschied besteht jedoch in der Regulation (Streicher & Tyler 1981). So liegt bei Streptomyceten und bei einigen Actinomyceten im Gegensatz zu den übrigen Bakterien kein Regulationsmechanismus vor. Eine Eigenschaft, die wahrscheinlich mit der Tatsache erklärt werden kann, daß Actinomyceten fast ausschließlich unter Minimalbedingungen existieren und so eine Regulation nicht benötigen. Die für die Biosynthese der Aminosäuren benötigten Enzyme werden generell nur in geringen Konzentrationen in der Zelle vorgefunden.

Der Aufbau der Zellwand (Abbildung 4) von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Rogers 1974; Petit 1978; Chatterjee 1997) ist entscheidend für die Entwicklung von Methoden zu Transformation und Zellaufschluß. Die Zellwand besteht aus einer Lipiddoppelschicht, weiter außen gefolgt von der Peptidoglycanwand bzw. Mureinwand, die von unterschiedlicher Dicke sein kann. Bei Gram-positiven Bakterien bestehen etwa 80% der Zellwand aus Peptidoglycan, im Gegensatz zu 20% bei Gram-negativen Bakterien. Das Peptidoglycan ist eine dreidimensionale, teilweise über Peptidbindungen quervernetzte Struktur einer alternierenden Abfolge von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Aufgrund dieser Polysaccharidketten ist ein enzymatischer Abbau der Zellwand von Gram-positiven Bakterien mit Lysozym möglich. Übrig bleibt die verhältnismäßig dünne Lipiddoppelschicht, die beispielsweise bei der Protoplastentransformation mit Polyethylenglycol für DNA durchgängig gemacht werden kann.

Bei Gram-negativen Bakterien folgt auf das Peptidoglycan zusätzlich eine Lipidschicht mit nach außen gerichteten Lipopolysacchariden. Daher ist in diesem Fall

Lysozym zum Abbau der Zellwand nicht ausreichend. So muß zusätzlich ein Chelatbildner hinzugegeben werden.

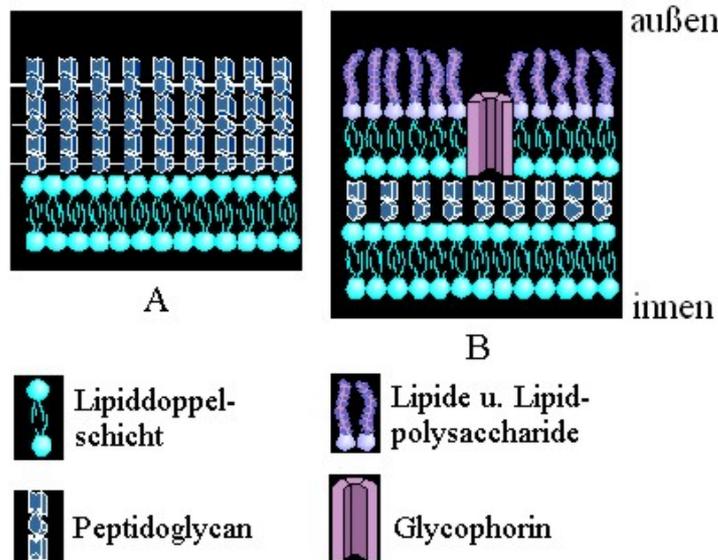


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Zellwand von Gram-positiven (A) und Gram-negativen (B) Bakterien (mit Ausnahme der Mycobakterien). Die Zellwand Gram-positiver Bakterien zeichnet sich durch einen einfacheren Aufbau und eine dickere Peptidoglycanschicht aus.

### 1.1.3 Streptomyces als Expressionssystem

Von Bedeutung für molekularbiologische Arbeiten ist der hohe GC-Gehalt des Streptomycetengenoms. Die durchschnittlich 72 % für *Streptomyces* setzen sich aus etwa 71 % für das erste, 50 % für das zweite und 91 % für das dritte Nukleotid eines Codons zusammen (Wright & Bibb 1992). Daraus resultieren Schwierigkeiten bei der Polymerase-Kettenreaktion einerseits aufgrund der hohen Schmelztemperatur der DNA (Moreau et al. 1994), andererseits wegen der erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Bildung selbstkomplementärer Strukturen und damit zur Entstehung von Schleifen, die bei der PCR zu einem verfrühten Abfallen der Polymerase führen können. Teilweise kann dieses Problem durch Zusätze von Additiven (Varadaraj & Skinner 1994), hauptsächlich Dimethylsulfoxid, aber auch Glycerin und Hexamethylphosphorsäuretriamid behoben werden. Der Vorteil des hohen GC-Gehalts besteht in der Vorhersehbarkeit des dritten Nukleotids (Bibb et al. 1984). Bei PCR Reaktionen mit degenerierten Primern wird es mit ausreichender Wahrscheinlichkeit durch ein G oder C festgelegt. Außerdem können durch statistische Auswertung der

Nukleotidsequenzen die offenen Leserahmen (ORF) identifiziert werden. Hierbei werden die möglichen sechs Leserahmen gegen den durchschnittlichen GC Gehalt des dritten Nukleotids aufgetragen (sog. Leserasteranalyse). In Abbildung 5 ist ein Vergleich der Codonverwendung von *S. lividans* und *E. coli* K12 dargestellt.

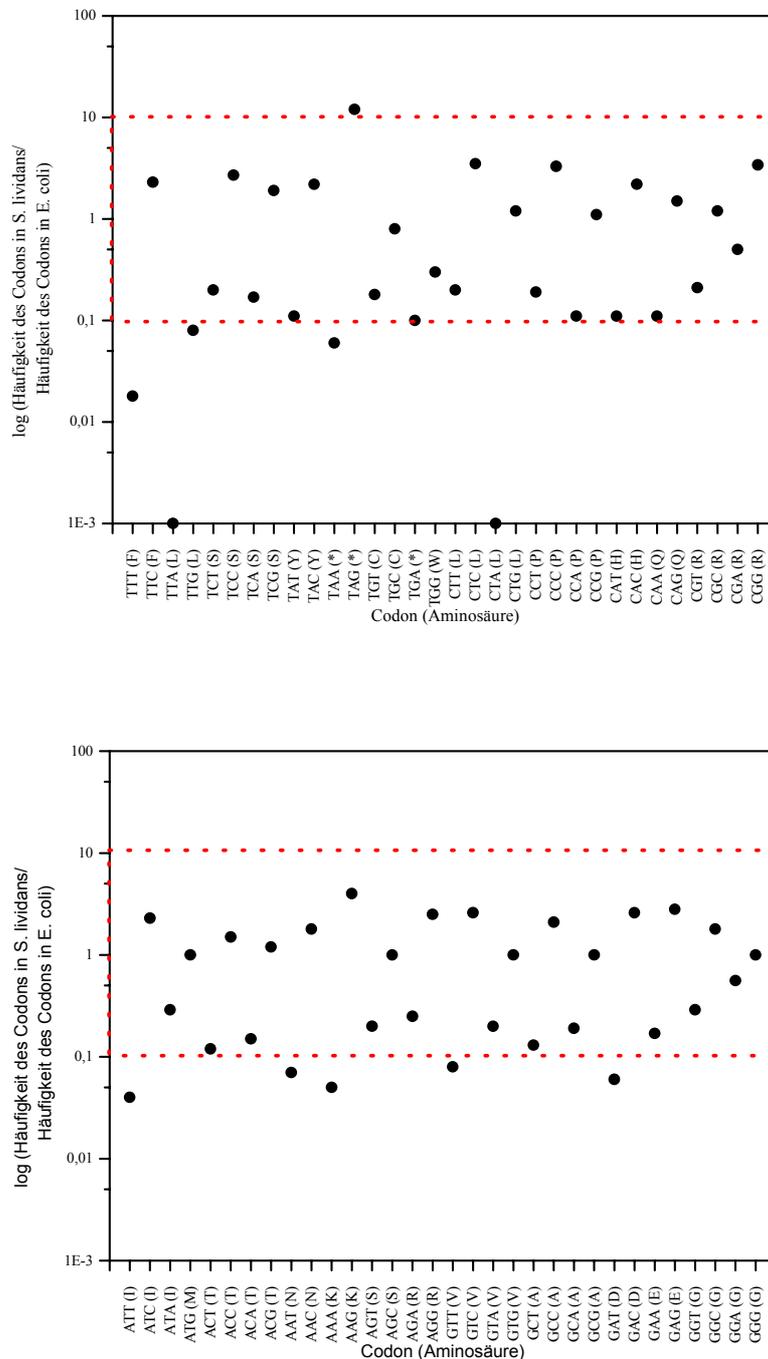


Abbildung 5: Vergleich der Codon usage von *S. lividans* und *E. coli* K12. Es wurden die Codons, bzw. Aminosäuren, gegen das Verhältnis der Häufigkeit der jeweiligen Codons von *Streptomyces* zu *E. coli* aufgetragen. Innerhalb des umrandeten Bereiches liegen die Codons, bei denen das Verhältnis der jeweiligen Häufigkeit den Faktor 10 nicht übersteigt.

Für die heterologe Expression in *Streptomyces* haben sich einige Codons als st erwiesen (Leskiw et al. 1993). Aufgrund ihres geringen Vorkommens in *Streptomyces* sind insbesondere TTA (0.2 %) und CTA (0.5 %) zu vermeiden. TTA wird ausschließlich von einer tRNA erkannt, die in späteren Wachstumsphasen auftritt. So ist anzunehmen, daß diesem Codon eine Regulationsfunktion bei der Genexpression zukommt. Ähnliches scheint auch für CTA zu gelten.

Die Existenz von Restriktionsbarrieren (Alvarez et al. 1993) und der hohe Proteasegehalt (Brawner 1994; Binnie et al. 1997) stellen beim Einsatz von Streptomycceten als Wirtsorganismus für die rekombinante Produktion von Proteinen ein Hindernis dar. Im Allgemeinen exprimieren Streptomycceten verschiedene Restriktionsenzyme. Diese Restriktionsbarriere verhindert das Eindringen von Fremd-DNA in den Organismus. Das wiederum resultiert in Problemen bei der Expression in Streptomycceten. So müssen u.U. bei der zu transformierenden DNA die entsprechenden Schnittstellen entfernt werden, oder das für die Restriktion verantwortliche Gen deletiert werden.

Weiterhin weisen Streptomycceten eine hohe Zahl an Proteasen auf, die zu exprimierende Proteine degradieren können. Arbeiten, bei denen zahlreiche Proteasen in Streptomycceten deletiert wurden, zeigen eine oft verschlechterte Expression eines rekombinanten Proteins (Brawner 1994). Eine besondere Bedeutung für die heterologe als auch homologe Expression kommt v.a. *S. lividans* 66 (Hopwood et al. 1983; Takano et al. 1995) und seinen näheren Verwandten *S. lividans* TK23 und *S. lividans* TK64 zu. Diese Stämme sind hoch homolog zu *S. coelicolor* A3(2), so daß Informationen aus dem Genomprojekt übertragen werden können. Außerdem werden vergleichsweise wenig Proteasen exprimiert und Restriktionsbarrieren sind nicht vorhanden. Des weiteren handelt es sich bei *S. lividans* TK23 bzw. *S. lividans* TK64, im Gegensatz zu den meisten Streptomycceten, um plasmidfreie Stämme. Diese Stämme sind im Allgemeinen besser für eine Expression geeignet (Anne & Van Mellaert 1993; Lammertyn et al. 1996), u.a. weil nicht von vornherein zu einem einzubringenden Plasmid identische Replikationsursprünge vorliegen, die eine Expression verhindern.

Von Vorteil gegenüber anderen bakteriellen Expressionssystemen wie *E. coli* hat sich die Fähigkeit zur Proteinsekretion (Gilbert et al. 1995; Sathyamoorthy et al. 1996; Morosoli et al. 1997) erwiesen. Eine Reihe von Propeptiden mit unterschiedlicher Effizienz zur Sekretion sind bekannt. Allerdings ist die Homologie dieser Propetide untereinander nur gering. Gemeinsam ist ihnen der Aufbau: der N-Terminus besitzt überdurchschnittlich viele Arginine und ist positiv geladen. Es folgt der hydrophobe Kern mit einer Helixstruktur und im

Anschluß eine Proteaseerkennungssequenz, die häufig mit einem Prolin beginnt und eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweist. Vergleichende Arbeiten haben jedoch gezeigt, daß Probleme bei der Proteinproduktion in Streptomycceten im Regelfall nicht auf der Ebene der Sekretion auftreten, sondern bei Transkription und Translation (Gilbert et al. 1995).

Inzwischen wurden in Anlehnung an die klassischen Verfahren zum DNA-Transfer eine Reihe von Methoden für Streptomycceten entwickelt. Zu nennen sind hierbei v.a. Plasmide (Hopwood et al. 1987; Aidoo et al. 1990), deren Replikation in *Streptomyccetes* nach dem rolling-circle Mechanismus erfolgt. Weiterhin existieren Möglichkeiten, Gene sowohl in das Genom zu integrieren (Kinashi et al. 1992), als auch über einen intergenerischen Transfer (Bierman et al. 1992; Motamedi et al. 1995) zwischen verschiedenen Spezies zu transferieren. Neben Cosmiden ermöglicht die Existenz von linearen Plasmiden darüberhinaus den Transfer sehr großer DNA Moleküle von mehreren hundert Kilobasen (Kinashi et al. 1992). Von dem Aktinophagen  $\Phi$ C31 abgeleitete Phagenvektoren bieten weitere Möglichkeiten zum DNA Transfer (Hopwood et al. 1987).

## 1.2 Enzyme aus Umweltproben

Es besteht ein großes Interesse an industriell verwertbaren Enzymen, die aus neuen, bisher noch nicht erschlossenen Quellen stammen. In den letzten Jahren werden deswegen verstärkt Anstrengungen unternommen, um Enzyme aus Umweltproben wie Böden zugänglich zu machen. In diesem Zusammenhang sind v.a. Bakterien von Interesse, da sie aufgrund ihrer hohen Wachstumsgeschwindigkeit, Mutationsrate und ihrer Fähigkeit zum vertikalen und horizontalen Gentransfer eine ausgeprägte Diversität besitzen. Allerdings sind beispielsweise nur 4000 Bakterienarten phylogenetisch erfaßt und charakterisiert (Bull et al. 1992). Es wird angenommen, daß die Mehrzahl aller Mikroorganismen aus Böden, etwa 99.5 bis 99.9%, nicht kultiviert werden können (Torsvik et al. 1990 a; Torsvik et al. 1990 b; Rondon et al. 2000) und sich daher den klassischen Isolierungsmethoden entziehen.

Um das Spektrum der mikrobiellen Diversität zu erschließen, besteht der geeignetste Zugang über die Anwendung von Aufschluß- und Aufreinigungsmethoden (Porteous et al. 1994; Zhou et al. 1996; Henne et al. 1999; Entcheva et al. 2001), deren Ziel es ist, alle in der Bodenprobe enthaltenen Mikroorganismen aufzuschließen, Verunreinigungen zu entfernen und die Gesamt-DNA in möglichst reiner Form zu erhalten. Für den Zellaufschluß kommen prinzipiell alle physikalischen und chemischen Methoden in Frage, bewährt haben sich

überwiegend Kombinationen der verschiedenen Verfahren (Coutinho et al. 1999; Courtois et al. 2001). Bei den einzelnen Verfahren sind insbesondere die mechanischen Aufschlußmethoden, wie das Mörsern der Probe in flüssigem Stickstoff oder mit Glasperlen geeigneter Größe in einer Kugelmühle, zu erwähnen. Chemische Aufschlußmethoden beruhen auf dem enzymatischen Abbau der Zellwand, durch physikalische Methoden wird der Zellinhalt beispielsweise mittels Ultraschall freigesetzt.

Ziel ist hierbei, alle im Boden vorhandenen Mikroorganismen in gleicher Qualität und Quantität aufzuschließen. Im Anschluß muß die DNA noch aufgereinigt werden, um v.a. Schwermetalle und Huminstoffe (Watson & Blackwell 2000; Santosa 2001) zu entfernen, die einen Restriktionsverdau erheblich erschweren oder unmöglich machen. Huminstoffe, ein Gemisch von teilweise aliphatisch und teilweise aromatisch substituierten Carbonsäuren, stellen ein besonderes Problem dar, da sie aufgrund ihrer vielfältigen Strukturmerkmale in der Lage sind, sich über Wasserstoffbrücken, ionische Bindungen und Komplexbildung an die DNA anzulagern. Schwermetalle binden ebenfalls an die DNA und sind in der Lage u.U. Enzyme, insbesondere bei der Restriktion und Ligation der DNA, irreversibel zu inhibieren. Mögliche Lösungen hierfür bestehen in der Aufreinigung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese und Ionenaustauschsäulen.

Die so erhaltene DNA kann einem vollständigen oder partiellen Restriktionsverdau unterworfen werden und nach Ligation in geeignete Vektoren in den Wirtsorganismus eingebracht werden. Im Anschluß erfolgt mittels verschiedener Assaysysteme der Nachweis des Umsatzes eines Substrates oder der direkte Nachweis des Enzyms. Die Anforderungen an ein Screening sind einerseits ein hoher Durchsatz (Hochdurchsatz-Screening, HTS) (Arai 2001; Wolcke & Ullmann 2001) und eine eindeutige, möglichst quantitative, Umsetzung des Substrats.

Von Interesse ist in manchen Fällen die Klassifizierung der aufgereinigten DNA im Hinblick auf ihre natürliche Diversität. Die Analyse erfolgt meist durch die Analyse der 16S RNA (Ovreas et al. 1998). Weitere Kriterien sind die Schmelzpunktbestimmung der DNA und die Auftrennung im Cäsiumchlorid Dichtegradienten nach dem GC-Gehalt.

Häufig schließt sich als weiterer Schritt die sogenannte Normalisierung an, deren Ziel es ist, häufig auftretende DNA abzureichern und im Gegenzug selten auftretende DNA anzureichern. Dies geschieht durch thermische Denaturierung von Doppelstrang-DNA in ihre Einzelstränge. Häufig auftretende DNA wird bei Abkühlung einer schnelleren Kinetik zur Rekombination folgen, so daß zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der thermischen Denaturierung ein Gemisch aus doppelsträngiger, häufig auftretender DNA und

einzelsträngiger, selten auftretender DNA existiert. Doppel- bzw. einzelsträngige DNA wiederum kann aufgrund ihrer unterschiedlich starken Anlagerung an Hydroxyapatit [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ] aufgetrennt werden (Torsvik et al. 1990 a) und nach Renaturierung bei tieferen Temperaturen, Entsalzung und Aufkonzentrierung zum Restriktionsverdau eingesetzt werden. In Abbildung 6 wird die klassische Aufreinigung von kultivierbaren Mikroorganismen mit der Aufreinigung der DNA aus einer Umweltprobe verglichen.

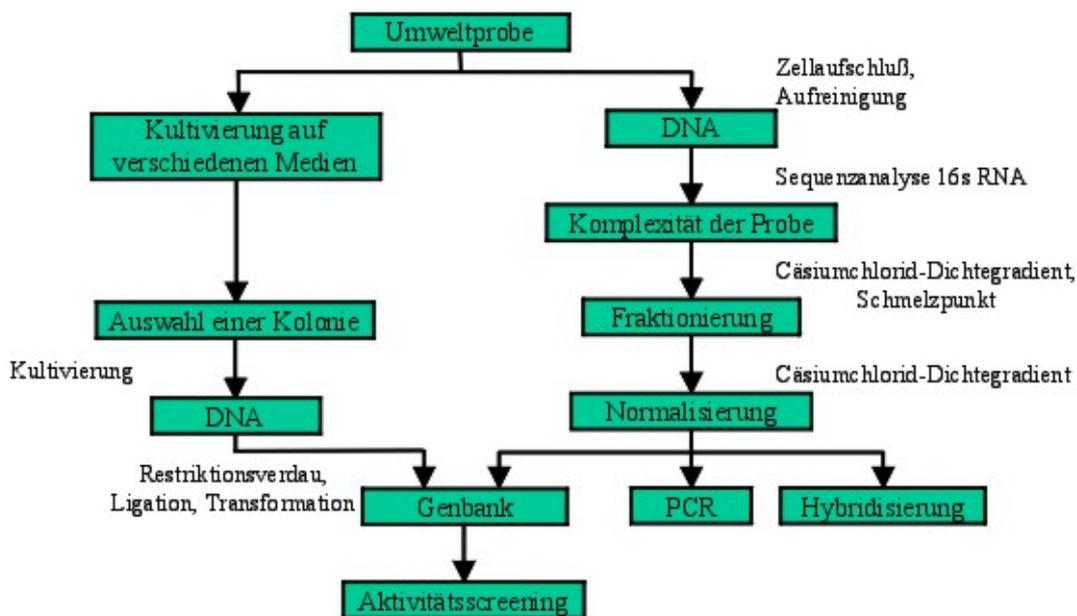


Abbildung 6: Aufarbeitungsschema von Umweltproben.

Schwierigkeiten bereiten indes noch die Expression von aus Boden aufgereinigter DNA, da *E. coli* als das am häufigsten genutzte und am besten charakterisierte Expressionssystem nicht immer in der Lage ist, DNA aus in Böden weitverbreiteten Organismen wie Actinomyceten funktionell zu exprimieren. Für die Expression von DNA aus Actinomyceten scheint *S. lividans* aufgrund fehlender Restriktionsbarrieren und eines niedrigen Proteasegehalts als Wirtsorganismus geeignet zu sein.

### 1.3 Zielsetzung

Das Ziel des Projekts bestand in der Herstellung von Genbanken für die Expression von Boden DNA in *Streptomyces*. Nach einer vergleichenden Optimierung der für *Streptomyces* bekannten Transformationssysteme und einer Validierung der Expression mit verschiedenen Genen sollte ein geeignetes Expressionssystem etabliert werden. Im Anschluß sollte mit diesem Expressionssystem ein Agarplattenscreening der Genbanken aus Boden DNA auf Lipase- bzw. Esteraseaktivität erfolgen. Für den Test auf andere Enzymaktivitäten, die den Einsatz von Plattenassays nicht zulassen, sollten alternative Methoden für ein Hochdurchsatzscreening mit *Streptomyces* entwickelt werden, so beispielsweise geeignete Mikrotiterplattenassays.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Agarose Gelelektrophorese	DNA Sub Cell™, Mini Sub™ DNA Cell, Mini Sub™ Cell GT	BioRad
	Video Copy Processor P66E BWM 9X Monitor UV-Leuchttisch	Mitsubishi Javelin Electronics MWG-Biotech
DNA-Sequencer	373A DNA Sequencer, 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems
Elektroporation	Gene Pulser®, Pulse Controller	BioRad
Fluorimeter	Fluostar	BMG
Gefriertrockner	Lyovac GT 2	Finn-Aqua
Homogenisator	Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel
Inkubatoren	HT - Inkubator (30°C, 37°C) Certomat R Incubator (42°C) WTE UM 500	Infors AG Braun Binder Memmert
Mikroskop	Axiolab E	Zeiss
Mikrowellengerät	Micro-Chef FM A935	Moulinex
Kugelmühle	MM 2000	Retsch , Haan
Objektive	Achroplan 10x/0,25, 40x/0,65, 100x/1,0	Zeiss
PAGE	Minigel-Twin G42 Model 583 Gel Dryer Phast System	Biometra® BioRad Pharmacia
PCR	Mastercycler Gradient DNA Thermocycler Robocycle® Gradient 40	Eppendorf Perkin Elmer Stratagene®
pH-Meter	Digital pH Meter pH525	WTW
Pickroboter	BioPick	BioRobotics Ltd.
Power Suppliers	Power Pac 3000, Power Pac 300, Model	BioRad

	200/2.0 Power Supply	
Sonifier	Sonifier 250 Sonorex Super RK 514 H	Branson Bandelin
SpeedVac	Concentrator 5301	Eppendorf
Spektrophotometer UV/VIS	Biochrom 4060 Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech Pharmacia Biotech
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Basic, MC1 Research RC 210 D Precision Advanced	Sartorius OHAUS®
Wasserbad	Wasserbad B3	Haake-Fisons
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5417 C Eppendorf Zentrifuge 5415 R Eppendorf 5810 R Universal 30 F KR 22 i (Rotor: AK 500-11, 155 mm) G412 Sorvall RC - 5B (Rotor: SA 600)	Eppendorf Eppendorf Eppendorf Hettich Jouan Jouan Du Pont Instruments

## 2.2 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Fluka bezogen.

Aceton

Acrylamid (30 % (m/v))

Agar

Agar (Bioselect)

Gibco

Agarose

Serva

Ammoniumchlorid

Ammoniummolybdat

Ammoniumpersulfat (APS)

Ampicillin (Na Salz)

Bromphenolblau

Calciumchlorid

Casaminoacids  
Chloramphenicol  
Coomassie Brilliant Blue R250  
Dimethylsulfoxid (DMSO)  
Eisessig  
Eisen(III)chlorid  
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)  
Ethanol  
Fast Red TR  
Gentamicin  
Glucose  
Glycin  
Glycerin  
Glycerol  
Hefeextrakt  
Kaliumacetat  
Kaliumdihydrogenphosphat  
Kaliumhydrogenphosphat  
Kaliumsulfat  
Kanamycin  
1 kB extension-ladder  
1 kB ladder  
Kupferchlorid  
LMP Agarose  
Lysozym  
Magnesiumchlorid  
Magnesiumsulfat  
Mangansulfat  
Mannitol  
2-Mercapto1.1.3  
Methanol  
Naphthylacetat  
Natriumchlorid  
Natriumborat

Difco

Natriumdihydrogenphosphat	
Natriumdodecylsulfat	
Natriumhydrogenphosphat	
Natriumsulfat	
Natronlauge	
Nutrient Broth Powder	Difco
Polyethylenglycol 1000	Fluka, Merck, ICN, Roth
Polyethylenglycol 4000	
Polyethylenglycol 6000	
L-Prolin	
Proteinase K	
RNaseI	
Saccharose	
Salzsäure	
Spectinomycin	
Stärke (löslich)	Sigma
Stärke (unlöslich)	
Spectinomycin	
Streptomycin	
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	
N-tris[Hydroxymethyl]methyl-2-aminoethansulfonsäure (TES)	Sigma
Thiostrepton	
Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan	
Triton X-100	
Trypton	Difco
Tryptic Soja Broth	
Zinkchlorid	

### 2.3 Kommerzielle Kits

Spin-Mini-Plasmid-Präparations-Kit	Qiagen GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH
E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab Biotechnologie GmbH
Concert™ Rapid Plasmid Midiprep System	Gibco BRL, Life Technologies

Wizard® PCR Preps DNA Purification System

Promega

Chroma Spin + TE-1000 Columns

Clontech Laboratories Inc.

Phadebas Amylase Test

Pharmacia &amp; Upjohn in vitro

Diagnostik

## 2.4 Primer

Tabelle 2: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
121/160-Seq<	GGCGTCTCCGCCTCTGCC
121-Seq>	AGTTAGCTCACTCATTAG
160-Seq>	GGCCGTGCATTTGTACGG
BTL2-BglIII<	CGAAG CTACTTACTTAGGATCC
BTL2-NcoI>	CTCCATGGGTTTACAGGATGGG
DsRed-NcoI>	CATGCCATGGCCATGCGCAGCAGCAAGAATGTTATCAAGGAGTTC
DsRed-StuI<	GGTAGGCCTATTATTTTGTG
Xyl-HindIII<	CGAAGCTTCTACTTACTTAGGATCCCTTC
Xyl-NcoI>	CATGCCATGAACAAAGGTGTAATGC

## 2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Herstellerfirma
½ Mikro-Einmalplastikküvetten (10 x 4 x 45 mm)	Ratiolab
384 Well Plate Clear, non treated, PS; 24 und 64 well Nunclon™ Surface	Nalge Nunc International
50 ml Spritzen	Henke- Sass Wolf GmbH
Eppendorf-Reaktions-Gefäße 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Labortechnik
PS Microplate 96 well	Greiner Labortechnik
Sterilfilter, Millex®-GS 0.22 µm	Millipore

## 2.6 Bakterienstämme, Plasmide und Stammlösungen

Die verwendeten *Escherichia coli*-Stämme und Actinomyceten sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Verwendete *E. coli*-Stämme und Actinomyceten mit relevanten Eigenschaften und Resistenz soweit bekannt

Stamm	relevante Eigenschaften	Resistenz	Referenz
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>			(Lechevalier et al. 1986)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	DeoR endA1 gyrA96 hsdR17( $r_{k}^{-}$ $m_{k}^{-}$ ) recA1 relA1 supE44 thi-1 $\Delta$ (lacZYA-argFV169) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15, F $^{-}$	Nal $^{r}$	(Hanahan 1983)
<i>E. coli</i> JM110	RpsL (Str $^{r}$ ) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 $\Delta$ (lac-proAB) F' traD36 proAB laqI $^{q}$ Z $\Delta$ M15]	Str $^{r}$	(Yanisch-Perron et al. 1985)
<i>E. coli</i> ET12567 (pUB307)	Dam dcm hsd Autonom replizierendes RP4-Derivat (pUB307)	Cam $^{r}$ Kan $^{r}$	(Flett et al. 1997)
BL21- CodonPlus-RP	<i>E. coli</i> B F $^{-}$ ompT hsdS( $r_{B}^{-}$ $m_{B}^{-}$ ) dcm + Tet $^{r}$ gal $^{\lambda}$ endA Hte [argU proL Cam $^{r}$ ]	Cam $^{r}$	Stratagene
<i>S. albus</i>			DSM 40313
<i>S. albus</i> G			(Cruz et al. 1994)
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	SPC1, SPC2	Cam $^{r}$	(Rudd & Hopwood 1979), DSM 40783
<i>S. griseus</i>			DSM 40236
<i>S. lividans</i> TK23	SPC1, plasmidfrei	Spc $^{r}$	(Gusek & Kinsella 1992)
<i>S. lividans</i> TK64	str, plasmidfrei	Str $^{r}$	(Pelletier et al. 1994)
<i>S. rimosus</i>			DSM 40260

<i>S. venezuelae</i>			(Aidoo et al. 1990)
----------------------	--	--	---------------------

Die verwendeten Plasmide sind zusammen mit den relevanten Genotypen und Resistenz in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Verwendete Plasmide mit Genotypen und Resistenzen.

Plasmid	relevanter Genotyp	Resistenz	Referenz
pASKIBA-1CA-soyC	P-tet	Amp <sup>r</sup>	(Lutz- Wahl 1999)
pCYTEXP1-soyC	CI <sub>ts857</sub> , P <sub>RPL</sub>	Amp <sup>r</sup>	(Lutz- Wahl 1999)
pDsRed	P-lacZ	Amp <sup>r</sup>	Clontech
pEGFP	P-lacZ	Amp <sup>r</sup>	Clontech
pFIS-Xyl	P-mrpA'	Amp <sup>r</sup> , Tsr <sup>r</sup>	(Altenbuchner )
pJGSF14	P-SF1, tra-Element	Apra <sup>r</sup>	(Götz )
pJOE2775-soyC	P-rha	Amp <sup>r</sup>	(Lutz- Wahl 1999)
pGM 121	P-aph1	Amp <sup>r</sup> , Tsr <sup>r</sup>	(Muth )
pGM 160	P-aph1	Amp <sup>r</sup> , Tsr <sup>r</sup> , Gen <sup>r</sup>	(Muth et al. 1989)
PIJ702	MelC	Tsr <sup>r</sup>	(Katz et al. 1983)
pUC18	P-lacZ	Amp <sup>r</sup>	(Pridmore 1987)

Die verwendeten Antibiotika sind mit den Konzentrationen für die Stammlösungen und den Einsatz für Agarplatten in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Antibiotika und Induktoren mit Konzentrationen für die Stammlösungen (Lösungsmittel in Klammern angegeben) und verwendete Endkonzentration für Agarplatten.

Antibiotikum bzw. Induktor	Stammlösung (mg/ ml)	<i>S. liv.</i> , Platten (µg/ ml)	<i>S. liv.</i> , Weichagar zum Überschichten (µg/ ml)	<i>E. coli</i> , Platten (µg/ ml)
Ampicillin	100 (H <sub>2</sub> O)	-	-	100
Apramycin	100 (H <sub>2</sub> O)		500	100
Chloramphenicol	25 (EtOH)	25	100	40
Gentamicin	50 (H <sub>2</sub> O)	25	-	25
IPTG	200 (H <sub>2</sub> O)	-	-	20
Kanamycin	100 (H <sub>2</sub> O)	50	500	50
Nalidixinsäure	100 (H <sub>2</sub> O)	-	1000	-
Rhamnose	200 (H <sub>2</sub> O)	-	-	200
Spectinomycin	50 (H <sub>2</sub> O)	-	50	-
Streptomycin	50 (H <sub>2</sub> O)	-	500	50
Thiostrepton	50 (DMSO)	25	50	-

## 2.7 Nährmedien

Allgemein verwendete Nährmedien für *Streptomyces* und *E. coli*.

Für die entsprechenden Plattenmedien werden bei *Streptomyces* noch 15 g/ l Biosselect Agar und bei *E. coli* 15 g/ l Agar hinzugegeben.

S-Medium	Pepton	4 g
	Hefeextrakt	4 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
	H <sub>2</sub> O	ad 800 ml
	getrennte Zugabe von	
	Glucose	10 g
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0.5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 200 ml

## Material und Methoden

LB <sub>0</sub> (Luria-Bertani) Medium	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Malz-Medium	Malzextrakt	10.0 g
	Hefeextrakt	4.0 g
	Glucose	4.0 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
S-Medium	Pepton	4 g
	Hefeextrakt	4 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
	H <sub>2</sub> O	ad 800 ml
	getrennte Zugabe von	
	Glucose	10 g
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0.5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 200 ml
Soja-Mannit-Medium	Soja	20 g
	Mannitol	20 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
tsb-Medium	tryptic soja broth	30 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l

Yeme	Hefeextrakt	3 g
	Pepton	5 g
	Malzextrakt	3 g
	Glucose	10 g
	Saccharose	170 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
	getrennte Zugabe MgCl <sub>2</sub> (2.5 M)	2 ml
YEST	Saccharose	103.0 g
	MgCl <sub>2</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10.0 g
	Glucose	5 g
	Hefeextrakt	5 g
	Agar	22 g
	TES (1 M, pH 7.8)	20 ml
	Spurenelemente	2 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 900 ml
	getrennte Zugabe CaCl <sub>2</sub> (5 M)	2 ml

## 2.8 Stammhaltung und Kultivierung

### 2.8.1 Stammhaltung von *E. coli*

Verdünnungsausstriche der Stämme werden auf LB<sub>0</sub>-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum angefertigt. Die Platten werden bei 37 °C über Nacht inkubiert und bei ca. 10 °C maximal 4 Wochen aufbewahrt. Für die Langzeitlagerung wird 1 Vol. Kultur mit 1 Vol. Glycerol versetzt, durch Vortexen homogenisiert und bei – 80°C aufbewahrt.

### 2.8.2 Kultivierung von *E. coli*

In kleinerem Maßstab werden 2-5 ml Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C und 220 upm über Nacht kultiviert. Ansonsten werden Schüttelkolben 1:100 mit einer Vorkultur inokuliert und anschließend bei 37 °C und 220 upm über Nacht inkubiert.

Die Kultivierung erfolgt im Regelfall in LB<sub>0</sub>-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum.

### 2.8.3 Stammhaltung von *Streptomyces*

Zur Stammhaltung werden Streptomycceten auf Platten mit Sporulationsmedium bei 30 °C inkubiert und nach erfolgter Sporenbildung bei 4 °C aufbewahrt. Für die Langzeitlagerung werden die Sporen mit 5 ml 10%iger Saccharoselösung pro Platte abgewaschen (gegebenenfalls werden 0.1% Triton X-100 zur besseren Löslichkeit hinzugefügt) und durch sterile Watte filtriert. Das Filtrat wird zentrifugiert (1000 g, 5 Min., 4 °C), in 1 ml 50%iger Glycerollösung resuspendiert und bei – 80°C gelagert.

Sporulationsmedium	Saccharose	103.0 g
	MgCl <sub>2</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 g
	Glucose	5.0 g
	Hefeextrakt	5.0 g
	Agar	22 g
	TES	2.3 g
	Spurenelemente	2 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 980 ml
	getrennte Zugabe von	
	CaCl <sub>2</sub> (2.5 M)	20 ml

### 2.8.4 Kultivierung von *Streptomyces*

Für die Kultivierung im Maßstab von 2-5 ml werden entweder eine homogenisierte Streptomycceten Einzelkolonie oder 20 µl Sporensuspension im Schüttler bei 30 °C und 220 upm 2-3 d kultiviert. Um ein disperses Wachstum zu ermöglichen, wird das Reagenzglas zusätzlich mit einer Edelstahlfeder in den Abmessungen 20 mm x 0.3 mm versehen. Für größere Volumina werden mit Schikanen ausgestattete Schüttelkolben verwendet, wobei das Verhältnis des Mediumvolumens zur Größe des Schüttelkolbens 1:10 beträgt. Die Schüttelkolben werden 1:100 aus einer Vorkultur angeimpft und bei 30 °C und 220 upm 2-3 d kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in tsb Medium, gegebenenfalls wird ein Antibiotikum hinzugefügt.

## 2.9 Molekularbiologische Methoden

### 2.9.1 Isolierung genomischer DNA aus Actinomyceten bzw. Streptomyceten

Diese Methode nach (Kutchma et al. 1998) beruht auf dem Zellaufschluß des Mycel durch Behandlung mit Aceton, Lysozym, SDS und anschließenden Frier-Tau-Zyklen. Um RNA und Proteine zu entfernen, werden RNaseI und Proteinase K hinzugegeben. Im Anschluß erfolgt eine zweimalige Phenol-Chloroform Extraktion und die Fällung der DNA mit Ethanol.

Etwa 50 mg Mycel aus einer Kultur in tsb-Medium werden mit 1 ml TE Puffer (50 mM Tris, 20 mM Na-EDTA, pH 8.25) gewaschen und zentrifugiert (20200 g, 30 s, RT). Das Pellet wird in 1 ml kaltem Aceton resuspendiert, 10 Min. auf Eis inkubiert und zentrifugiert (20200 g, 30 s, RT). Es werden 75 µl 10%iges SDS und 125 µl 5 M NaCl hinzugegeben und vorsichtig durchmischt. Anschließend folgen drei Frier-Tau Zyklen mit jeweils 3 Min. bei -70°C und 3 Min. bei 65°C. Die Lösung wird 10 Min. auf Eis gekühlt und zentrifugiert (20200 g, 5 Min., 4°C). Zu dem Überstand werden zuerst 1.4 µl RNaseI (100 mg/ml) hinzugegeben und 15 Min. bei 37°C inkubiert, im Anschluß werden noch 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugegeben und für weitere 45 Min. bei der gleichen Temperatur inkubiert. Weiterhin wird eine zweimalige Phenol-Chloroform Extraktion und die ethanolische Fällung der DNA durchgeführt. Das Pellet wird in 200 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.9.2 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* mit Kits von Qiagen, Peqlab oder Gibco

Für die Präparation hochreiner Plasmid DNA für PCR, Restriktionsverdau, etc. werden die Mini/Midi-Prep Kits von Qiagen, bzw. Peqlab oder Gibco verwendet. Gemeinsames Prinzip ist die Zelllyse in alkalischer Umgebung, gefolgt von einer spezifischen Bindung der DNA an Ionenaustausch-Säulen. Nach Zentrifugation der *E. coli* Zellen wird die Plasmidisolierung nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.9.3 Mini-Plasmid Extraktion für Schnelltests

Die sogenannte Flexi-Prep Methode (Birnboim & Doly 1979) beruht auf der alkalischen Lyse und wird für Anwendungen benutzt, die keine hochreine DNA erfordern (analytischer Verdau von Plasmiden, etc.). 1-2 ml Zellen von ÜN-Kulturen werden zentrifugiert (20200 g, 30 s, RT) und das Pellet in 200 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend erfolgt die Zelllyse durch Zugabe von 200 µl Lösung II. Nach vorsichtigem Durchmischen und 5 Min. Inkubation bei

RT werden 200 µl Lösung III zugegeben. Durch Zentrifugation (20200 g, 5 Min., RT) werden Zellsatz und Proteine abgetrennt, aus dem Überstand wird die DNA mit Isopropanol gefällt und in 20 µl TE-Puffer resuspendiert.

Lösung I	Tris-HCl (pH 7.5)	100 mM
	EDTA	10 mM
	RNase I	400 µg/ml
Lösung II	NaOH	0.2 M
	SDS	1 % (m/v)
Lösung III	Kaliumacetat	29.4 g
	Eisessig	11.5 ml
	dH <sub>2</sub> O	28.5 ml

#### 2.9.4 Isolierung von Plasmid DNA (Mini Lyse) aus *Streptomyces*

Für die Mini-Lyse nach (Bibb et al. 2000) werden 1 ml Kultur homogenisiert und zentrifugiert (20200 g, 1 Min., RT). Das Pellet wird in 500 µl frischem L1-Puffer mit 2 mg/ml Lysozym resuspendiert, um den Mureinsacculus der bakteriellen Zellwand abzubauen und 1 h bei 37°C und 220 upm inkubiert. Im Anschluß werden die Zellen mit 250 µl einer alkalischen SDS-Lösung (0.3 M NaOH, 2% SDS) lysiert. Eine Temperaturerhöhung auf 70°C für 15 Min. bewirkt sowohl die Denaturierung der DNA, als auch den weitgehenden Abbau der RNA. Nach weiteren 15 Min. bei RT werden Proteine und chromosomale DNA durch eine dreifache Phenol-Chloroform Extraktion mit jeweils 100 µl Phenol-Chloroform (1:1, pH 5.4) abgetrennt. Um die Plasmid DNA zu erhalten, wird die obere wäßrige Phase mit Isopropanol gefällt. Nach Resuspension der DNA in 50 µl TE-Puffer erfolgt zur weiteren Reinigung eine Ethanol-fällung. Das Pellet wird bei 60 °C getrocknet und in 25 µl TE-Puffer resuspendiert.

L1-Puffer	Tris	25 mM
	EDTA	25 mM
	Saccharose	300 mM
	auf pH 8.0 mit HCl einstellen	

### 2.9.5 Nachweis stammspezifischer Restriktionsbarrieren

*Streptomyces* bzw. *Actinomyces* Stämme besitzen zum Schutz vor Fremd-DNA häufig Restriktionsenzyme. Daher ist es bei unbekanntem Stämmen vor der Transformation notwendig, eine mögliche Restriktion von Plasmid DNA zu untersuchen. Dazu wird das Mycel aus 0.5 ml Kulturvolumen mittels Ultraschall aufgeschlossen, zentrifugiert (20200 g, 10 Min., 4 °C) und 50 µl Überstand mit 5 µl Plasmid DNA (Midi-Präp) versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wird die Probe im Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

### 2.9.6 Transformation von *E. coli* (DMSO Methode)

Für die DMSO Methode zur Transformation von *E. coli* nach (Chung et al. 1989) werden 50 ml LB<sub>0</sub>-Medium aus einer Vorkultur des entsprechenden *E. coli* Stammes angeimpft. Das Wachstum erfolgt im Schüttler bei 37 °C und 220 upm etwa 3 h bis 4 h. Nach Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0.4-0.5 werden die Zellen zentrifugiert (3000 g, 10 Min., 4 °C) und mit 20 ml kaltem Leitungswasser gewaschen. Anschließend wird das Zellpellet in 2 ml TSS-Puffer resuspendiert und in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots können direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Schockgefrieren mit flüssigem N<sub>2</sub> bei -80 °C gelagert werden.

20-100 ng Plasmid DNA (~ 1 µl) werden mit 200 µl kompetenten Zellen gemischt, 20 Min. auf Eis und 45 bis 75 s bei 42 °C inkubiert. Anschließend werden 0.8 ml LB<sub>0</sub>-Medium hinzugegeben. Nach 1 h bei 37 °C wird zentrifugiert (3000 g, 2 Min., RT) und die überstehende Lösung bis auf etwa 100 µl verworfen. Das Pellet wird im verbliebenen Medium resuspendiert und auf LB<sub>0</sub>-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

TSS- Puffer	PEG 6000	10 g
	DMSO	5 ml
	MgSO <sub>4</sub>	0.6 g
	LB <sub>0</sub> -Medium	ad 100 ml

### 2.9.7 Transformation von *E. coli* (RbCl Methode)

Eine weitere Möglichkeit zur Transformation von verschiedenen *E. coli* Stämmen besteht mit der Rubidium Chlorid Methode nach (Ano & Shoda 1992).

100 ml Psi Broth werden mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer  $OD_{578}$  von 0.5 bei 37 °C und 220 upm kultiviert. Im Anschluß werden die Zellen 15 Min. auf Eis gekühlt und zentrifugiert (3000 g, 10 Min., 4 °C). Das Zellpellet wird mit 40 ml TfbI gewaschen, zentrifugiert (3000 g, 10 Min., 4 °C) und in 4 ml TfbII resuspendiert. 0.2 ml Aliquots werden entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Die Transformation erfolgt analog zur Transformation mit DMSO kompetenten Zellaliquots.

Psi Broth	Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	MgSO <sub>4</sub>	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
TfbI	RbCl	12.1 g
	KOAc	5.6 g
	CaCl <sub>2</sub>	1.5 g
	MnCl <sub>2</sub> (1 M)	10 g
	Glycerol	150 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
	auf pH 5.8 mit HAc einstellen	
TfbII	MOPS	2.1 g
	CaCl <sub>2</sub>	11 g
	RbCl	1.2 g
	Glycerol	150 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1l
	Auf pH 6.5 mit NaOH einstellen	

### 2.9.8 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die Elektroporation von *E. coli* nach (Sambrook et al. 1989) stellt eine Alternative zu den chemischen Transformationsmethoden dar. Insgesamt ist sie aufwendiger durchzuführen, kann aber bessere Resultate liefern, die sich in einer höheren Transformationseffizienz äußern. *E. coli* Zellen in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase werden mit Lysozym

und PEG vorbehandelt um die Mureinwand abzubauen und die verbliebene Zellwand durchlässiger zu machen. Anschließend werden die Zellen in einem Puffer definierter Ionenstärke einem kurzen elektrischen Impuls von hoher Spannung unterworfen, regeneriert und ausplattiert.

100 ml LB<sub>0</sub> Medium werden angeimpft und bis zu einer OD<sub>578</sub> ~ 0.6 kultiviert. Nach 15 Min. Kühlung auf Eis wird zentrifugiert (4000 g, 10 Min., 4 °C). Die Zellen werden mit 100 ml und anschließend mit 50 ml eiskaltem Leitungswasser gewaschen, in 2 ml einer 10 %igen (V/V) Glycerollösung resuspendiert und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots können entweder direkt zur Elektroporation eingesetzt werden oder nach Schockfrieren in flüssigem N<sub>2</sub> bei -80°C gelagert werden.

1-2 µl DNA werden mit einem 100 µl Aliquot vermischt, in eine Elektroporationsküvette gegeben und 20 Min. auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgt die Elektroporation bei 2 kV (10 kV/cm), 25 µF und 400 Ω. Sofort im Anschluß werden 1 ml LB<sub>0</sub>-Medium hinzugegeben, 1 h bei 37°C inkubiert und auf antibiotikumhaltigen LB<sub>0</sub>-Platten aufgebracht.

### **2.9.9 Protoplastentransformation von *Streptomyces***

Die Protoplastentransformation von *Streptomyces* nach (Isogai et al. 1981) stellt mit 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> Kolonien/µg DNA diejenige Methode mit der höchsten Transformationseffizienz dar. Noch in der Wachstumsphase wird das Mycel geerntet und mittels Lysozym protoplastiert. Die Aufnahme der DNA wird durch Zugabe von Polyethylenglycol erreicht. Anschließend erfolgt die Protoplastenregeneration auf einem geeigneten Medium und nach etwa 20 h wird die Platte zur Selektion mit antibiotikumhaltigem Weichagar überschichtet.

25 ml S-Medium (oder Yeme-Medium) mit 1 % Glycin werden mit 250 µl einer Vorkultur angeimpft und bei 30°C und 220 upm 2- 3 d inkubiert. Das Mycel wird zentrifugiert (2750 g, 20 Min., 4°C) und das Pellet zweimal mit jeweils 10 ml kalter 10 %iger Sucrose gewaschen. Nach diesen Schritten kann das Pellet wahlweise in 10 ml kalter 10 %iger Sucrose resuspendiert und bei -20°C gelagert werden oder das Pellet wird in 10 ml L-Puffer resuspendiert und 30-60 Min. bei 30 °C und 220 upm inkubiert (~30 Min. für *S. lividans*, ~60 Min. für *S. coelicolor*), wobei die Protoplastenbildung mit dem Mikroskop verfolgt wird. Durch Zugabe von 20 ml kaltem Puffer P wird die Protoplastierung abgestoppt. Anschließend wird zur Abtrennung von verbliebenem Mycel durch Watte filtriert. Das Filtrat wird zentrifugiert (2750 g, 20 Min., 4°C), der Überstand vorsichtig abdekantiert und das Pellet möglichst schnell in 2 ml Puffer P resuspendiert. 100 µl Aliquots können entweder direkt zur

Protoplastentransformation oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -20°C oder -80°C gelagert werden.

In einer schnellen Variante werden 100 µl Protoplasten mit 300 µl Puffer T und 0.01-1 µg DNA gemischt. Davon werden jeweils 200 µl auf einer R5 Platte ausplattiert. Die Platte wird etwa 20 h bei 30 °C inkubiert bevor sie mit 2.5 ml antibiotikumhaltigem Weichagar überschichtet und anschließend für weitere 2-3 d bei 30 °C inkubiert wird.

Um eine höhere Transformationseffizienz zu erreichen, werden in einer alternativen Methode 100 µl Protoplasten zentrifugiert (1000 g, 3 Min., RT). Das Zentrifugat wird in 200 µl Puffer P oder Puffer L vorsichtig resuspendiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand weitgehend abdekantiert und das Pellet in 200 µl Puffer P gelöst und mit 0.01-1 µg DNA und 250 µl Puffer T gemischt. Anschließend wird 1 ml kalter Puffer P hinzugeben und zentrifugiert. Das Pellet wird in 200 µl Puffer P resuspendiert und ausplattiert. Das weitere Vorgehen gleicht dem bereits beschriebenen.

P-Puffer	Saccharose	100 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 860 ml
	getrennte Zugabe	
	Spurensalze	2 ml
	TES (250 mM, pH 7.2)	100 ml
	MgCl <sub>2</sub> (1 M)	10 ml
	CaCl <sub>2</sub> (250 mM)	10 ml
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (140 mM)	10 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (40 mM)	10 ml
L-Puffer	Saccharose (10.3% (m/v))	100 ml
	TES (5.73 % (m/v), pH 7.2)	10 ml
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2.5 % (m/v))	1 ml
	Spurensalze	0.2 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5 % (m/v))	1 ml
	MgCl <sub>2</sub> (2.5 M)	0.1 ml
	CaCl <sub>2</sub> (0.25 M)	1 ml
	Lysozym	1 mg/ml

Material und Methoden

L1-Puffer	Tris	25 mM
	EDTA	25 mM
	Saccharose	300 mM
	auf pH 8.0 mit HCl einstellen	
T-Puffer	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (140 mM)	100 µl
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (40 mM)	100 µl
	MgCl <sub>2</sub> (1 M)	100 µl
	CaCl <sub>2</sub> (250 mM)	100 µl
	Spurenelemente	30 µl
	PEG 1000 (50 % (m/v))	5 ml
	Tris-Maleat (1 M, pH 8.0)	500 µl
	Saccharose (10 % (m/v))	2.5 ml
	dH <sub>2</sub> O	1.17 ml
R-5 Medium	Saccharose	103.0 g
	Glucose	10.0 g
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
	MgCl <sub>2</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10.12 g
	Casaminoacids	0.1 g
	Hefeextrakt	5.0 g
	TES	5.73 g
	Agar	18.0 g
	Spurenelemente	2.0 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 900 ml
	getrennte Zugabe	
	CaCl <sub>2</sub> (3.68 % (m/v))	80 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.54 % (m/v))	10 ml
	L-Prolin (20 % (m/v))	15 ml
NaOH (1 M)	8 ml	

R3 Weichagar	Saccharose	171.0 g
	Glucose	10.0 g
	Pepton	4.0 g
	KCl	0.5 g
	MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	8.1 g
	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2.2 g
	Agar	8.0 g
	H <sub>2</sub> O	ad 860 ml
	getrennte Zugabe	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.5 % (m/v))	40 ml
TES (250 mM, pH 7.2)	100 ml	
Soft Nutrient Agar (SNA)	Difco Nutrient Broth Powder	8 g
	Agar	5g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Spurenelemente	FeCl <sub>3</sub>	200 mg
	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> * 10 H <sub>2</sub> O	10 mg
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	10 mg
	CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg
	MgCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	10 mg
	ZnCl <sub>2</sub>	40 mg
	dH <sub>2</sub> O	ad 1l

### 2.9.10 Elektroporation von *Streptomyces*

Im Vergleich zur Protoplastentransformation werden mittels Elektroporation nach (Pigac & Schrempf 1994) geringere Transformationseffizienzen erreicht. Die direkte Transformation des Mycels ist allerdings von Vorteil, da Protoplastenbildung und Protoplastenregeneration vermieden werden. Das Mycel wird wie bei der Protoplastentransformation i. A. in der frühen exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit geringen Mengen Lysozym behandelt. Anschließend wird das Mycel einem kurzen elektrischen Puls hoher Spannung unterworfen und ausplattiert. Nach 20 h wird die Platte mit Weichagar und Antibiotikum überschichtet.

100 ml CRM-Medium werden mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft und im Inkubator bei 30 °C und 220 upm 24-30 h inkubiert. Das Mycel wird zentrifugiert (2750 g, 20 Min., 4°C) und das Pellet zweimal mit jeweils 10 ml kalter 10 %iger Sucrose und anschließend mit 50 ml kaltem 15 %igem Glycerol gewaschen. Das Pellet wird in 10 ml kaltem 15 %igem Glycerol (100 µg/ml Lysozym) etwa 30 Min. bei 30°C und 220 upm inkubiert, zweimal mit 10 ml kaltem 15 %igem Glycerol gewaschen und in 2 ml kaltem Elektroporationspuffer resuspendiert. 50 µl Aliquots werden entweder direkt zur Elektroporation verwendet oder nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

50 µl elektrokompetente Streptomyceten werden mit 1-2 µl DNA in eine Elektroporationsküvette gegeben und 10 Min. auf Eis gehalten. Anschließend erfolgt die Elektroporation bei 2 kV (10 kV/ cm), 25 µF und 400 Ω, wobei die Zeitkonstante in einem Bereich von 6-8 ms liegen sollte. Nach maximal 15 Min. werden 1 ml CRM-Medium hinzugegeben und bei 30 °C 2-3 h inkubiert. Anschließend wird die gesamte Menge ausplattiert, die Platte unter der Sterilbank getrocknet und etwa 20 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Platte wird mit Weichagar und Antibiotikum überschichtet und bei 30 °C 2–3 d inkubiert.

CRM-Medium	Glucose	10.0 g
	Saccharose	103.0 g
	MgCl <sub>2</sub>	10.12 g
	Tryptic Soy Broth	15.0 g
	Hefeextrakt	5.0 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Elektroporationspuffer	PEG 1000	30.0 g
	Glycerol	10.0 g
	Saccharose	6.5 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### 2.9.11 Direkte Transformation von *Streptomyces*

Die direkte Transformation, beschrieben von (Madon & Hutter 1991), wird im Regelfall zur Transformation von Actinomyceten wie *Nocardia* und *Amycolatopsis* angewendet. Im Allgemeinen kommt diese Methode erst dann zur Anwendung, wenn die ‚klassischen‘

Methoden wie Protoplastentransformation, Elektroporation und Konjugation keine befriedigenden Ergebnisse liefern. Bei dieser Methode wird in Gegenwart von PEG, Cäsiumchlorid und Kalbsthymus-DNA das Mycel des betreffenden Stammes direkt transformiert.

25 ml tsb-Medium werden mit 0.25 ml einer Vorkultur angeimpft und im Inkubator bei 30 °C und 220 upm 48 h inkubiert. Das Mycel wird zentrifugiert (2750 g, 20 Min., 4°C) und das Pellet zweimal mit jeweils 25 ml kaltem TE-Puffer gewaschen und in 0.5 – 0.75 ml kaltem TE-Puffer resuspendiert. 100 µl Mycel-Suspension werden nacheinander mit 10 µl MgCl<sub>2</sub> (0.2 M), 60 µl CsCl (4 M), 30 µg Kalbsthymus-DNA und 30 µl der zu transformierenden DNA in TE-Puffer gemischt. Im Anschluß werden 200 µl 50 %iges PEG 1000 hinzugegeben, vorsichtig durchmischt und 30 bis 60 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (3000 g, 5 Min., RT) wird das Pellet mit 2 ml R2L-Einbettungsagar auf eine S27M-Platte aufgebracht und bei 30°C inkubiert. Nach 18 h wird die Platte mit Antibiotikum enthaltendem Weichagar überschichtet und bei 30°C inkubiert.

S27M-Medium	Pepton	5 g
	Hefeextrakt	3 g
	Mannitol	73 g
	Agar	15 g
R2L-Weichagar	Glucose	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Casaminoacids	0.1 g
	Mannitol	73 g
	MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	10 % (m/v)
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
	LMP Agarose	7 g
	H <sub>2</sub> O	ad 820 ml
	getrennte Zugabe	
	TES (250 mM, pH 7.2)	100 ml
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	(3.68 % (w/v))	80 ml

### 2.9.12 Intergenerische Konjugation

Bifunktionelle Plasmide können von *E. coli* nach *Streptomyces* mittels intergenerischer Konjugation einfach übertragen werden (Flett et al. 1997; Bibb et al. 2000). Hierbei werden die Transferfunktionen eines RP4-Plasmids in *E. coli* einem Repizienten (Shuttle-Vektor mit oriT-Region des RP4-Plasmids) zur Verfügung gestellt. Das auf diese Weise mobilisierte Plasmid ist in der Lage in Gram-negative, Gram-positive und manche eukaryontische Zellen zu transferieren, wobei es in *Streptomyces* im Regelfall in das Genom integriert wird.

*E. coli* ET12567 (pUB307) Zellen werden mit dem zu mobilisierenden Shuttle-Vektor nach der DMSO-Methode transformiert. 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika werden 1:100 aus einer Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 220 upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 kultiviert. Nach Zentrifugation (2750 g, 10 Min., 4°C) werden die Zellen zweimal mit jeweils 50 ml LB<sub>0</sub>-Medium gewaschen und in 10 ml LB<sub>0</sub>-Medium pH 7.3 resuspendiert. 100 ml LB<sub>0</sub>-Medium werden mit 1 ml einer Vorkultur des zu transformierenden Streptomycceten angeimpft und bei 30 °C und 220 upm 24-30 h inkubiert. Das Mycel wird zentrifugiert (2750 g, 10 Min., 4°C), zweimal mit jeweils 50 ml LB<sub>0</sub>-Medium gewaschen und in 100 ml LB<sub>0</sub>-Medium pH 7.3 resuspendiert. 500 µl Mycel werden mit 500 µl *E. coli* Zellen durchmischt und entweder auf Soja-Mannit oder R5-Platten aufgebracht. Nach 20 h bei 30°C werden die Platten mit jeweils 2.5 ml Weichagar mit Antibiotikum überschichtet und weitere 2-3 d bei 30°C inkubiert.

Trotz Integration des Shuttlevektors in das Genom des Streptomycceten sollte eine Kultivierung in Flüssigmedium mit Antibiotikum erfolgen, da einzelne *E. coli* Zellen im Mycel überleben können.

### 2.9.13 Schnellbestimmung von Plasmid-DNA aus *E. coli* bzw. *Streptomyces* Kolonien

Eine einzelne Kolonie wird gepickt und in 50 µl QSB-Puffer lysiert (etwa 5 Min. für *E. coli* und 20 Min. für *Streptomyces*). Anschließend wird zentrifugiert (2750 g, 20 Min., 4°C) und 20 µl Überstand auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Für etwa 30 s bis 45 s wird eine Spannung von 300 V angelegt, im Anschluß wird die Agarosegelelektrophorese unter Standardbedingungen durchgeführt.

QSB Puffer	Glycerol	60 µl
	SDS	10 mg
	RNase A	10 mg
	Bromphenolblau	0.1 % (m/v)
	1 x TE	ad 1 ml

#### 2.9.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente eines Restriktionsverdaus werden nach erfolgter Agarosegelelektrophorese mit dem Skalpell ausgeschnitten und die DNA nach Herstellerangaben mit dem QIAquick Gel Extraction Kit isoliert.

#### 2.9.15 DNA- Fällung mit Ethanol

Zu 1 Vol. gelöster DNA werden 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 4.8) und 2.5 Vol. Ethanol (100%, -20°C) gegeben. Durch Vortexen wird die Lösung durchmischt und mindestens 20 Min. bei -20 °C gehalten, um die Fällung zu ermöglichen. Nach Zentrifugation (20800 g, 20 Min., 4 °C) wird das Pellet mit Ethanol (70%, -20°C) gewaschen bei 60°C getrocknet und in TE- Puffer resuspendiert.

#### 2.9.16 DNA- Fällung mit Isopropanol

1 Vol. DNA in Lösung wird mit 0.7 Vol. Isopropanol vermischt. Nach mindestens 15 Min. Fällung bei Raumtemperatur wird zentrifugiert (20800 g, 20 Min., 4 °C), das Pellet mit Ethanol (70%, -20°C) gewaschen, bei 60°C getrocknet und in TE- Puffer resuspendiert.

#### 2.9.17 Phenol-Chloroform Extraktion

1 Vol. Probe wird mit 1 Vol. Phenol-Chloroform (1:1, pH 8.0) versetzt. Nach Vortexen wird zentrifugiert (20800 g, 5 Min., RT). Die obere, wäßrige Phase kann erneut mit Phenol-Chloroform extrahiert werden und anschließend einer DNA-Fällung mit Ethanol oder Isopropanol unterzogen werden.

### 2.9.18 DNA-Konzentrationsbestimmung

In verdünnter Lösung kann die DNA-Konzentration spektroskopisch bei 260 nm gegen das Lösemittel als Referenz bestimmt werden. Bei einer Schichtdicke von 10 mm wird die DNA-Konzentration näherungsweise durch folgende Formeln bestimmt:

$$\text{Doppelsträngige DNA: } c_{\text{dsDNA}} = \text{OD}_{260\text{nm}} * 50 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Einzelsträngige DNA: } c_{\text{ssDNA}} = \text{OD}_{260\text{nm}} * 33 \mu\text{g/ml}$$

Durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm kann eine Aussage über die Reinheit der Probe getroffen werden. Für eine reine Probe gilt:

$$\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} = 1.8$$

### 2.9.19 DNA Restriktionsverdau und Ligation

Enzymatische Restriktionen und Ligationen werden nach Herstellerangaben unter den jeweiligen Bedingungen durchgeführt.

Um die Religation einfach geschnittener Vektoren zu vermeiden, werden die 5'-Phosphatreste nach Herstellerangaben durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase entfernt.

### 2.9.20 Direkte Klonierung von PCR Produkten

In Anlehnung an den Topo Kit von Clontech kann der Restriktionsverdau bei der Klonierung eines PCR Produkts in ein Plasmid vermieden werden. Bei dieser Methode wird ausgenutzt, daß die PCR Reaktion mit Taq-Polymerase im Regelfall einen Adenin 3'-Überhang an dem Produkt erzeugt. Durch Inkubation einer mit glatten Enden geschnittenen Plasmid DNA mit Taq Polymerase und dTTP wird ein Thymin 3'-Überhang geschaffen. Mit den so erhaltenen komplementären Nukleotiden lassen sich Plasmid DNA und PCR Produkt ligieren.

10 µl Plasmid DNA (aus Mini Prep.) werden zusammen mit 250 µM dTTP, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 10x Polymerase Puffer und 1 U Taq Polymerase mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und 2 h bei 72 °C inkubiert. Im Anschluß wird das Plasmid aufgereinigt und mit dem PCR Produkt zur Ligation unter Standardbedingungen eingesetzt.

### 2.9.21 Agarosegelelektrophorese von Plasmid DNA

Das Prinzip der Agarosegelelektrophorese nach (Sambrook et al. 1989) beruht auf der Wanderung der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld in Richtung der Anode.

Befindet sich die DNA in einer porösen Matrix, beispielsweise einem Agarosegel, können kleine Fragmente schneller als große wandern. Somit ist eine Trennung aufgrund der Fragmentgröße möglich. Die Abschätzung der Zahl der Basenpaare erfolgt mit Hilfe eines Längenstandards (1kB- Ladder, Gibco oder 1kB- Extension Ladder, Gibco). Als Zusatz wird Ethidiumbromid verwendet, das in die Helixstruktur der DNA interkaliert und durch Bestrahlung mit UV- Licht fluoreszierende Banden verursacht.

Doppelsträngige DNA wird in einem 1 %igen Agarosegel in TAE- Puffer mit 0.05 % (V/V) Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wird in Flachbett- Agarosegelkammern bei einer konstanten Spannung durchgeführt. Bei qualitativer Durchführung etwa 20 Min. bei 120 V und bei einer präparativen Elektrophorese etwa 40 Min. bei 90 V, um durch Hitze verursachte Schädigungen der DNA zu vermeiden. Lange DNA Fragmente von 12 bis 40 kB werden unter Benutzung der kB extension- ladder 2 bis 4 h bei 40- 60 V aufgetrennt.

Vor dem Auftragen werden die Proben mit 6x Auftragspuffer versetzt, der durch seine hohe Dichte das Einsinken der Probe in die Probentasche zur Folge hat. Außerdem ermöglicht er die Kontrolle des Fortschritts der Elektrophorese durch einen blauen Farbmarder.

1 %iges Agarosegel	Agarose	4 g
	TAE (1x)	ad 400 ml
	Die Agarose wird in der Mikrowelle mit TAE (1x) aufgeköcht und bei 80 °C aufbewahrt.	
50 x TAE Puffer	Tris	242 g
	Eisessig	57.1 ml
	EDTA (0.5 M, pH 8)	100 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l
6 x DNA Auftragspuffer	Glycin	30 % (m/v)
	Bromphenolblau	0.2 % (m/v)
	EDTA (25 mM, pH 7.5)	

1 kb DNA Standard	1 kb ladder (1 mg/ml)	30 µl
	10 x TAE	40 µl
	6 x DNA Auftragspuffer	100 µl
	ddH <sub>2</sub> O	ad 500 µl
	10 Min. auf 56°C erhitzen	
1 kb extension DNA Standard	1 kb extension - ladder (1 mg/ml)	30 µl
	10 x TE	40 µl
	6 x DNA Auftragspuffer	100 µl
	NaCl	10 mM
	ddH <sub>2</sub> O	ad 500 µl
	10 Min. auf 56°C erhitzen	

### 2.9.22 SDS PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen werden SDS- Polyacrylamidgele eingesetzt. Die Proteine werden in Gegenwart von SDS in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli 1970). Durch die Zugabe von SDS und kurzzeitiges Erhitzen auf 95 °C werden die Proteine denaturiert. Durch die Bindung mit SDS entsteht in den Polypeptiden eine negative Ladung, die die natürliche Ladung der Aminosäuren überdeckt und so eine Auftrennung unabhängig von der Ladung der Aminosäuren ermöglicht.

Der Bereich in dem die Beweglichkeit eines Proteins im Polyacrylamidgel linear vom Logarithmus der Molmasse abhängt, ist bei dem verwendeten 12.5 %igen Gel auf eine Größe von 10 bis 75 kD beschränkt.

Die Proteinauftrennung erfolgt in einem vertikalen 12,5 %igen Trenngel. Das Trenngel wird mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet, auf welches die Proben aufgetragen werden.

Die Elektrophorese erfolgt etwa 1 h mit konstanter Stromstärke von 24 mA pro Gel.

Nach der Elektrophorese werden die Gele mindestens 2 h in Coomassie- Färbelösung gefärbt und anschließend 2 h mit der Entfärbelösung entfärbt. Zur Aufbewahrung werden die Gele bei 80 °C und unter Vakuum 2 h im Geltrockner getrocknet.

## Material und Methoden

Lower Tris 4 x	Tris	36.4 g
	SDS	0.8 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 200 ml
	auf pH 8.8 mit HCl eingestellt	
Upper Tris 4 x	Tris	12.11 g
	SDS	0.8 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 200 ml
	auf pH 6.8 mit HCl eingestellt	
12.5 %iges Trenngel	Acrylamidlösung (30 % (m/v))	3.33 ml
	Lower Tris 4 x	2 ml
	dH <sub>2</sub> O	2.67 ml
	TEMED	4 µl
	APS (10 % (m/v))	40 µl
4 %iges Sammelgel	Acrylamidlösung (30 % (m/v))	0.52 ml
	Upper Tris 4 x	1 ml
	dH <sub>2</sub> O	2.47 ml
	TEMED	4 µl
	APS (10 % (m/v))	40 µl
SDS-Laufpuffer	Tris	15 g
	Glycin	72 g
	SDS	10 % (m/v)
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l
auf pH 8,3 mit HCl eingestellt		
5 x Probenpuffer	Tris-HCl (pH 6.8)	320 mM
	Glycerin	50 % (m/v)
	SDS	10 % (m/v)
	β-Mercaptoethanol	25 % (m/v)
	Bromphenolblau	0.1 % (m/v)

Coomassie- Färbelösung	Coomassie- Brilliant Blue R- 250	2.5 g
	Ethanol	425 ml
	Methanol	50 ml
	Eisessig	100 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l
Entfärbelösung	Ethanol	100 ml
	Methanol	400 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

### 2.9.23 Aufschluß und Aufreinigung von DNA aus Böden

Ziel ist die Aufreinigung der DNA aus möglichst allen Mikroorganismen einer Bodenprobe unter gleichzeitiger Vermeidung einer zu starken Beanspruchung und daraus resultierender Scheerung der DNA Moleküle. Problematisch ist der hohe Gehalt an Huminstoffen und anderen Verunreinigungen, die einen Restriktionsverdau erschweren.

Für die modifizierte Aufreinigung von DNA aus Böden nach (Porteous et al. 1994; Zhou et al. 1996; Coutinho et al. 1999) wird die Probe einem kombinierten Aufschluß mit flüssigem N<sub>2</sub>, gefolgt von einer Behandlung mit Glasperlen in einer Retsch-Kugelmühle, unterworfen. Anschließend werden die Proteine mit einer Ammoniumacetat Fällung und Phenol-Chloroform Extraktion entfernt. Die DNA wird mit Ethanol gefällt und durch präparative Gelelektrophorese und Aufreinigung über das Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System oder über Chroma Spin + TE-1000 Säulen nach Herstellerangaben gereinigt. Anschließend kann sie zum Restriktionsverdau eingesetzt werden.

0.5 g Boden werden etwa 5 Min. mit flüssigem N<sub>2</sub> gemörsert. Anschließend wird die Probe mit 0.5 ml Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 8) aufgeschlemmt, mit 1.5 g Glasperlen (0.04- 0.07 mm) und 0.5 g Glasperlen (0.3 mm) versetzt und 250 µl SDS-Puffer hinzugegeben. Nach Vortexen wird die Bodenprobe in der Retsch Kugelmühle (10 Min., Amplitude 80) aufgeschlossen und zentrifugiert (20800 g, 5 Min., RT). 2 Vol. Überstand werden mit 5 Vol. 7.5 M Ammoniumacetat vermischt, 5 Min. auf Eis gehalten und zentrifugiert (20800 g, 10 Min., RT). Anschließend werden 2 Vol. Überstand mit 1 Vol. Phenol-Chloroform (1/1) versetzt, vermischt und zentrifugiert (20800 g, 10 Min., RT). Nach Wiederholung der Phenol-Chloroform Extraktion wird die DNA mit Ethanol gefällt, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

### 2.9.24 Erzeugung von Genbanken aus DNA aus Böden

Für den Totalverdau werden 30 µg DNA aus Böden in einem Gesamtvolumen von 40 µl mit 1.5 µl der Restriktionsenzyme *NcoI*, *SacI*, *DraIII*, *XbaI*, bzw. *BglII*, 4 µl des entsprechenden Puffers und 1 µl BSA für 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wird die DNA über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt, der Bereich zwischen 1 und 10 kb extrahiert und mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt.

Alternativ kann mit *Sau3AI* ein Partialverdau durchgeführt werden. Hierzu werden 5 Ansätze mit jeweils 30 µg DNA aus Böden in einem Gesamtvolumen von 40 µl mit 1.5 µl *Sau3AI*, 4 µl Puffer und 1 µl BSA bei 37 °C verdaut. Die Inkubationsdauer der Ansätze variiert zwischen 2 und 10 Min. Zum Abstoppen der Reaktion werden jeweils 4 µl 0.5 M EDTA (pH 7.5) gegeben und die Ansätze für 15 Min. bei 70 °C inkubiert. Die Aufreinigung wird analog zum Totalverdau durchgeführt.

20 µg pIJ702 bzw. pGM160 Plasmid DNA werden in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 1 µl Restriktionsenzym und 3 µl des entsprechenden Puffers für 2 h bei 37 °C verdaut. Im Anschluß werden 1.5 µl alkalische Phosphatase und 3 µl Puffer hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Agarosegelelektrophorese wird die DNA mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt.

Zur Ligation von Fragmenten mit entsprechender Plasmid DNA werden jeweils 5- 10 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 1 µl T4-DNA-Ligase und 5 µl 10x Liagsepuffer über Nacht bei 14- 16 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wird 5 Min. auf 55 °C erhitzt und eisgekühlt. Jeweils 10 bis 15 µl Ligationsansatz werden für eine Protoplastentransformation eingesetzt.

### 2.9.25 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Ziel der PCR Reaktion, beschrieben von (Mullis et al. 1986), ist die beinahe exponentielle Vermehrung eines bestimmten DNA Moleküls (Template) unter *in vitro* Bedingungen. Dabei wird ein aus drei Reaktionsschritten bestehender Zyklus mehrfach durchlaufen. Der erste Reaktionsschritt besteht in der Denaturierung des doppelsträngigen Templates in die beiden Einzelstränge bei etwa 95°C. In dem zweiten Reaktionsschritt, dem Annealing, lagern sich die Primer an jeweils einen Einzelstrang an. Dieser Schritt verläuft bei einer Temperatur von etwa 45 °C–70 °C und ist von der Schmelztemperatur des Primer-Template Adduktes abhängig. Hohe Schmelztemperaturen, wie sie bei der PCR GC-reicher DNA auftreten, können durch Zusatz verschiedener Chemikalien, wie beispielsweise DMSO, verringert werden. Als dritter

Schritt erfolgt die Extension bei 72 °C, bei der durch Verlängerung der Primer am 3'-Ende durch eine Polymerase zwei komplette Stränge synthetisiert werden. In Tabelle 7 ist die typische Zusammensetzung einer PCR Reaktion und in Tabelle 8 das dazugehörige PCR Programm angegeben.

Tabelle 7: Pipettierschema einer PCR Reaktion

Bestandteile	Endkonzentration
10x Polymerase Puffer	1x
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	0,2 mM
Primer A	50 pmol
Primer B	50 pmol
Template DNA	≅ 0.1 µg
DNA-Polymerase (Taq oder Pfu)	1 oder 2 U
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (nur für Taq Polymerase)	2 mM
DMSO (nur bei hoch GC Template DNA)	5- 10 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Tabelle 8: PCR Programm

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension	Wiederholung
1	3 Min., 95 °C			
2	1 Min., 95 °C	1 Min. 45- 70 °C	1 Min. 72 °C	35 x
3			2 Min. 72°C	

### 2.9.26 DNA Sequenzierung

Für die DNA Sequenzierung nach (Sanger et al. 1977) wird der 373A DNA Sequencer, bzw. der 377 DNA Sequencer und der BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit mit AmpliTaq® DNA Polymerase benutzt. In Anlehnung an die Methode von Sanger werden die vier mit fluoreszierenden Resten versehenen ddNTPs während der Sequenzierungs PCR in

die amplifizierten DNA Fragmente eingebaut. Die Detektion erfolgt mit Hilfe von zwei Argonlasern.

Der Sequenzierungsansatz wird wie folgend pipettiert:

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix	8µl
Sequenzierungsprimer	3.2 pmol
DNA	300 -500 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Sequenzierungs PCR erfolgt im Anschluß wie in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Sequenzierungs PCR

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension	Wiederholung
1	96 °C, 1 min	-	-	1
2	95 °C, 40 sec	55 °C, 40 sec	72 °C, 4 min	25
3	-	-	72 °C, 4 min	1

Die Aufreinigung der Sequenzierungs PCR erfolgt über eine Ethanol-fällung. Das DNA-Pellet wird in 4 µl Formamid: EDTA ( 25 mM, pH 8.0) = 4 : 1 resuspendiert und vor dem Auftragen auf das Sequenzierungsgel 3 Min. bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wird nach Herstellerangaben für 12 h bei 2500 V, 40 mA und 30 W durchgeführt.

### 2.9.27 Lipase-, bzw. Esteraseassay mit 1-Naphthylacetat

Der Assay kann sowohl in Küvetten, als auch in Mikrotiterplatten durchgeführt werden (Beisson et al. 2000). In 96 well Mikrotiterplatten werden die Zellen in 120 µl Medium kultiviert, mit 65 µl Färbelösung A versetzt und 30–60 min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 65 µl Färbelösung B kann unmittelbar durch die Bildung eines roten Azofarbstoffes das Enzym qualitativ nachgewiesen werden.

Färbelösung A	1-Naphthylacetat	20 mg
	Aceton	5 ml
	Tris-HCl (0.1 M, pH 7.5)	ad 50 ml
Färbelösung B	Fast Red TR	50 mg
	Triton X-100	0.1 % (m/v)
	Tris-HCl (0.1 M, pH 7.5)	50 ml

### 2.9.28 Lipase-, bzw. Esteraseassay mit tributyrinhaltigen Agarplatten

Durch die enzymkatalysierte Aufspaltung des Tributyrins entstehen klare Halos auf den Agarplatten (Beisson et al. 2000). Das  $\text{CaCl}_2$  kann als Kofaktor für das Enzym dienen. Zu den jeweiligen Mediumbestandteilen werden 1 % Tributyrin und 1 g/l  $\text{CaCl}_2$  gegeben. Anschließend wird für 10 Min. im Ultraturrax homogenisiert und autoklaviert.

Für einen Assay auf Lipase, bzw. Esteraseaktivität mit *Streptomyces* als Wirtsorganismus, werden R5 Agarplatten mit dem Transformationsansatz nach 20 h Inkubation bei 30 °C mit tributyrin- und  $\text{CaCl}_2$ -haltigem R3 Weichagar und dem entsprechenden Antibiotikum überschichtet. Im Anschluß wird die Platte für 7 d bei 30 °C inkubiert, wobei täglich die Entstehung von Halos kontrolliert wird.

### 2.9.29 Assay auf Amylaseaktivität mit stärkehaltigen Agarplatten

Das Medium für Agarplatten wird mit 1% unlöslicher Stärke versetzt und autoklaviert. Durch die Amylase wird die Stärke abgebaut, so daß klare Halos entstehen.

Alternativ können Agarplatten auch mit 1 % löslicher Stärke versetzt werden. Der Nachweis auf Enzymaktivität erfolgt hierbei durch Zugabe einer 5 %igen Iodlösung. Der tiefblaue Iod-Stärke Komplex wird durch die Amylase zerstört, so daß bei Amylaseaktivität klare Halos zu erkennen sind.

Mit *Streptomyces* als Wirtsorganismus erfolgt der Assay dergestalt, daß R5 Agarplatten mit dem Transformationsansatz nach 20 h Inkubation bei 30 °C mit stärkehaltigem R3 Weichagar und dem entsprechenden Antibiotikum überschichtet werden. Nach 3 d Inkubation bei 30 °C erfolgt die Kontrolle auf die Bildung von Halos.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Konstrukte für die Validierung der Expression

Um Genbanken aus Boden DNA in *Streptomyces* zu exprimieren und ein Screening auf Enzymaktivität im Hochdurchsatz zu ermöglichen, sollten zu Testzwecken verschiedene Konstrukte mit Reportergenen hergestellt werden. Eine Bedingung hierfür war die reproduzierbare und quantifizierbare Expression der transformierten Gene in *Streptomyces*. Zu diesem Zweck wurden die Catechol-2,3-dioxygenase aus *Pseudomonas putida*, EGFP aus *Aequorea victoria*, DsRed aus *Dicosoma species*, die BTL2 Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* und die  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* in Plasmide kloniert, die ebenfalls für die Herstellung der Genbanken verwendet wurden.

Als Plasmide wurden die *E. coli*- *Streptomyces* Shuttlevektoren pGM121, bzw. pGM160 eingesetzt. Die Shuttlevektoren bestehen aus den jeweiligen *E. coli* und *Streptomyces* Genen für die Replikation, Selektion und einem Promotor. Zur Selektion diente Ampicillin in *E. coli* und das Peptidantibiotikum Thiostrepton in *S. lividans*. Um eine bifunktionelle Expression in beiden Organismen zu ermöglichen, wird in den Plasmiden der konstitutive aph-Promotor der Aminoglycosid-Phosphotransferase aus *S. fradiae* verwendet. Die Shuttlevektoren liegen in *E. coli* mit einer hohen Kopienzahl von 200- 400 vor, in *Streptomyces* jedoch nur in etwa 5 Kopien pro Zelle, so daß im Allgemeinen *E. coli* für molekularbiologische Arbeiten verwendet wurde.

Als weiteres, ausschließlich für *Streptomyces* geeignetes Plasmid wurde pIJ702 verwendet. Die Selektion erfolgte ebenfalls mit Thiostrepton, als Reportergen wird die Tyrosinase (MelC Gen) aus *S. antibioticus* verwendet. Durch Insertion des zu exprimierenden Gens in das MelC Gen wird die Bildung von dunkelbraunen bis schwarzen Melaninpigmenten unterbunden, so daß ein Screening auf Klone mit Insert möglich ist.

Im Folgenden wird auf die Funktionsweise der Catechol-2,3-dioxygenase, des EGFP und DsRed, sowie der BTL2 Lipase und  $\alpha$ -Amylase eingegangen. Weiterhin wird die Klonierungsstrategie und gegebenenfalls der Assay auf Enzymaktivität erläutert.

#### 3.1.1 Catechol-2,3-dioxygenase

Bei der Catechol-2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.2) aus *P. species* handelt es sich um ein Enzym aus der Klasse der Xylanasen. Das Enzym katalysiert, wie in Abbildung 7 gezeigt, die oxidative Spaltung des farblosen Catechols in 2,3- Position zu dem gelben 2-

Hydroxymuconsäure-semialdehyd. Der Nachweis kann sowohl visuell als auch mittels Absorption erfolgen, wobei das Absorptionsmaximum bei etwa 395 nm liegt. Im Mikrotiterplattenreader erfolgt die Detektion mit einem 410 nm Filter.

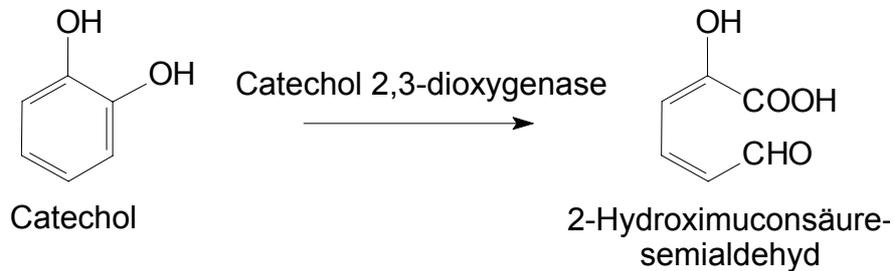


Abbildung 7: Die Catechol-2,3-dioxygenase katalysierte Umsetzung von Catechol zu 2-Hydroxymuconsäure-semialdehyd.

Das Xylanasegen, mit einer Länge von 974 bp, wurde durch PCR mit den Primern *Xyl-NcoI*> und *Xyl-HindIII*< aus dem Plasmid pFIS-Xyl amplifiziert und über *NcoI* und *HindIII* Schnittstellen in pGM160 kloniert. Das dadurch erhaltene Plasmid pEBO1 wurde durch DNA Sequenzierung mit den Primern 160-Seq> und 121/160-Seq< auf die korrekte Orientierung des Inserts getestet.

Nach der Transformation von pEBO1 in *S. lividans* TK64 erfolgte nach 3 d Kultivierung bei 30 °C durch Besprühen mit 1% iger wäßriger Catechollösung direkt auf den Agarplatten der Nachweis der Catechol-2,3-dioxygenase anhand der Gelbfärbung des Mycels.

### 3.1.2 EGFP und DsRed

Die beiden Proteine von Clontech benötigen für ihre Funktion keine Substrate oder Kofaktoren. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen von EGFP (488/ 507 nm) bzw. DsRed (558/ 583 nm) ermöglichen den Einsatz als fluoreszierende Reportergene. Die Anregung der Fluoreszenz kann in beiden Fällen bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einem Argonlaser erfolgen.

EGFP, mit einer Länge von 719 bp, wurde direkt durch einen Restriktionsverdau mit *NcoI* und *StuI* aus dem Plasmid pEGFP erhalten. Die Klonierung in pGM121 über *NcoI* und *StuI* Schnittstellen resultierte in dem Plasmid pEBO2A. Das 677 bp lange DsRed wurde zuerst über eine PCR Reaktion aus dem Plasmid pDsRed mit den Primern *DsRed-NcoI*> und *DsRed-StuI*< amplifiziert und anschließend ebenfalls über über *NcoI* und *StuI* Schnittstellen in pGM121 ligiert. Mit dem hierdurch erhaltenen Plasmid pEBO2B wurde ebenso wie mit

pEBO2A zur Kontrolle auf korrekte Insertion des DsRed bzw. EGFP eine DNA Sequenzierung mit den Primern 121-Seq> und 121/160-Seq< durchgeführt.

Im Fall von pEBO2B konnte nach Transformation in *S. lividans* TK64 sowohl mittels SDS PAGE, als auch durch visuelle Kontrolle der Kolonienfarbe keine Expression nachgewiesen werden. EGFP hingegen wurde aktiv in *S. lividans* TK64-pEBO2A, allerdings nur in geringen Mengen, exprimiert (s. Abb. 8).

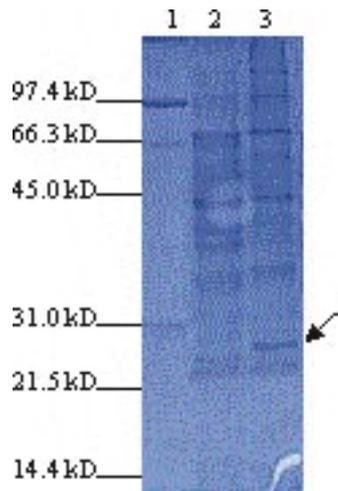


Abbildung 8: SDS PAGE von lmw standard (Spur 1), *S. lividans* TK23-pGM121 (Spur 2) und *S. lividans* TK23-pEBO2A (Spur 3). Die Bande des EGFP (~ 26 kD) ist mit einem Pfeil markiert.

Die Expression des EGFP in *S. lividans* TK64 erfolgte sowohl in dem synthetischen MG, als auch in dem komplexen Soja Malz Medium. Der quantitative Nachweis wurde im Anschluß mittels Fluoreszenzmessung des Zellüberstands im Mikrotiterplattenreader durchgeführt. Hierbei zeigte sich die Bestimmung der Fluoreszenz im synthetischen Medium aufgrund einer zu geringen Expression als schwierig. Zwar konnte im Komplexmedium eine höhere Expression erzielt werden, jedoch wurde durch die in größeren Mengen enthaltenen aromatischen Aminosäuren eine zuverlässige Bestimmung unmöglich.

Im Allgemeinen zeigten die Werte für die Hintergrundmessungen, aus Tabelle 10 ersichtlich, sowohl für die Expression im MG als auch im Soja Malz Medium, eine zu geringe Abweichung von den eigentlichen Fluoreszenzwerten. Aus diesem Grund wurde pEBO2A nicht zur Validierung der Expression verwendet.

Tabelle 10: Hintergrund bei Fluoreszenzmessungen von *S. lividans* TK64-pEBO2A in R5 und MG Medium. Als Hintergrund wurde das Verhältnis der relativen Fluoreszenz von *S. lividans* TK64-pEBO2A und der relativen Fluoreszenz des plasmidfreien Stammes definiert. Die maximale Abweichung von gemessenen Werten ist in Klammern angegeben.

Medium	R5	MG
Hintergrund	1.05 ( $\pm$ 0.10)	1.15 ( $\pm$ 0.10)

### 3.1.3 BTL2 Lipase

Die BTL2 Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* gehört zu den Triacylglycerinester-Hydrolasen (EC 3.1.1.3). Ein Screening auf Lipaseaktivität kann beispielsweise durch die Umsetzung von Tributyrin (Beisson et al. 2000), dargestellt in Abbildung 9, erfolgen. Durch die enzymatische Spaltung des wasserunlöslichen Tributyrins zu den wasserlöslichen Produkten werden auf tributyrinhaltigen Agarplatten klare Halos sichtbar.

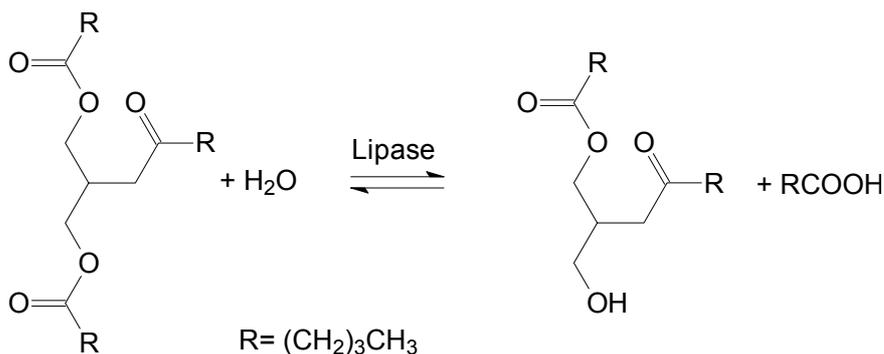


Abbildung 9: Lipasekatalysierte Umsetzung von Tributyrin zu dem entsprechenden Diglycerid und Buttersäure.

Die BTL2 Lipase, mit einer Länge von 1131 bp, wurde nach PCR mit den Primern BTL2-*NcoI*> und BTL2-*Bgl*II< in pGM121 kloniert (siehe Abb. 10). Das hierdurch erhaltene Plasmid pEBO2C wurde mittels DNA Sequenzierung mit den Primern 121-Seq> und 121/160-Seq< auf die korrekte Orientierung des Inserts getestet.

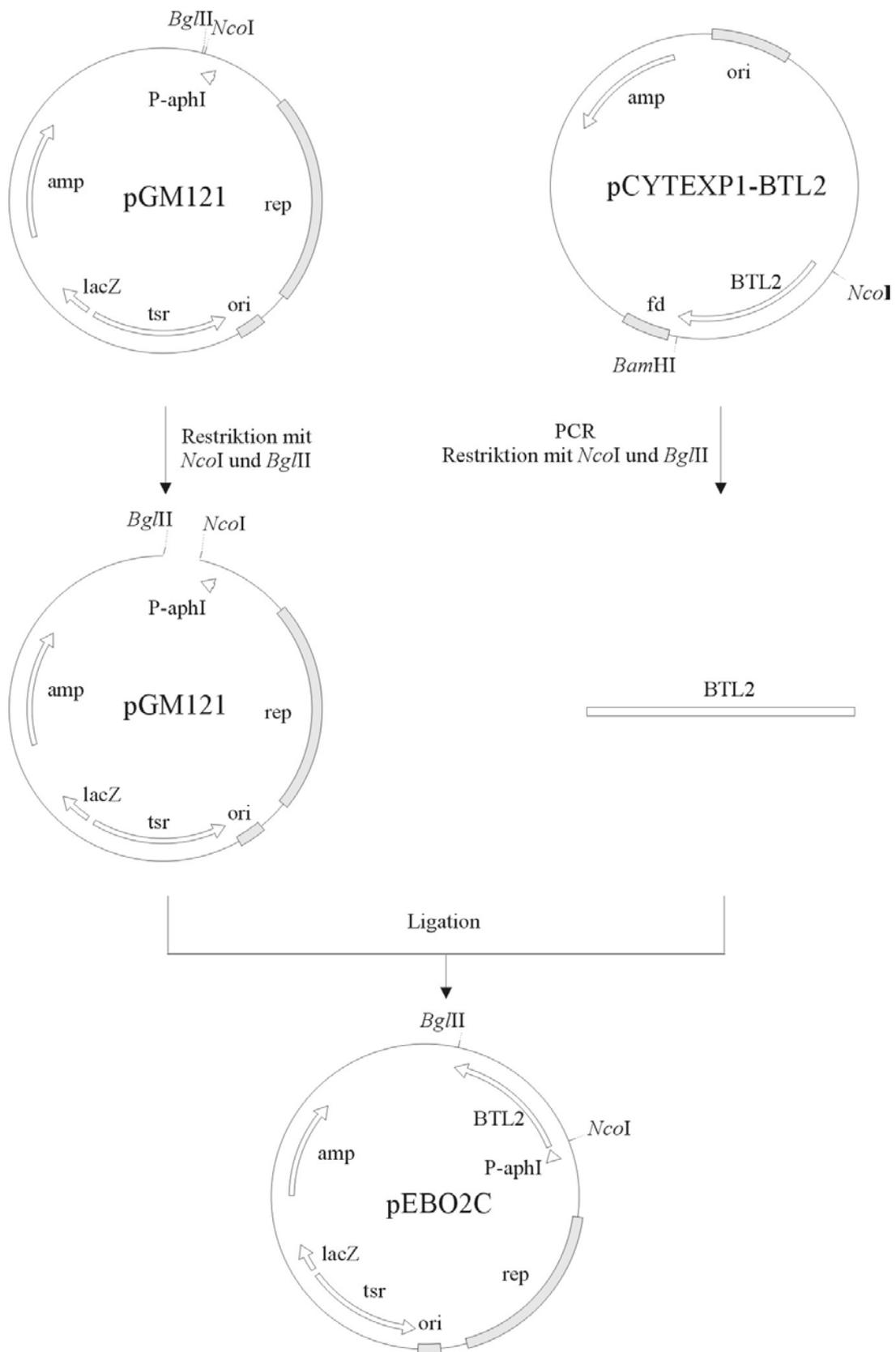


Abbildung 10: Klonierung der BTL2 Lipase in pGM121

Nach Transformation in *S. lividans* TK23 bzw. TK64 wurden nach 1 bis 2 d Wachstum auf tributyrinhaltigem R5 Medium klare Halos erhalten. Die SDS PAGE des Zelllysats von *S. lividans* TK64-pEBO2C zeigte nach der Coomassie-Färbung eine Bande in der erwarteten Größe von 41 kDa (siehe Abb. 11).

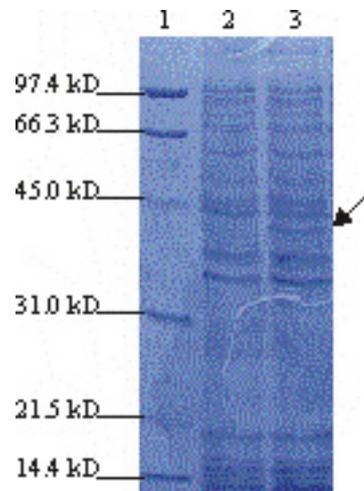


Abbildung 11: SDS PAGE von lmw standard (Spur 1), *S. lividans* TK64-pGM121 (Spur 2) und *S. lividans* TK64-pEBO2C (Spur 3). Exprimierte BTL2 Lipase (~ 41 kD) ist mit einem Pfeil markiert.

### 3.1.4 $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA)

$\alpha$ -Amylasen (EC 3.2.1.1) als Endoamylasen katalysieren durch Wassereinlagerung die zufällige Spaltung der  $\alpha$ -1,4 glycosidischen Bindung von Oligo- (ab dem Trisaccharid aufwärts) und Polysacchariden (Pandey et al. 2000). Durch die Spaltung der Substrate (Amylose, Amylopectin und Glycogen) entstehen Dextrine, die nach längerer Einwirkung durch das Enzym zu Maltose bzw. Isomaltose und verzweigten Polysacchariden abgebaut werden. Der Nachweis von Amylaseaktivität kann beispielsweise durch die Entfärbung des Iod-Stärke Komplexes erfolgen.

Zur Klonierung der BAA in *Streptomyces* wurde das Plasmid pJGSF14 verwendet. Die Selektion in pJGSF14 erfolgt sowohl in *E. coli* als auch *S. lividans* mit Apramycin. Eine bifunktionelle Expression in beiden Organismen ermöglicht der starke SF14 Promotor aus dem *S. ghanaensis* Phagen I19 (Labes et al. 1997). Das mobilisierbare Plasmid ist durch intergenerische Konjugation einfach von *E. coli* auf *S. lividans* übertragbar.

Nach Spaltung von pGBAA-WT (Bessler ) mit *NdeI* und *NotI* und anschließender Agarosegelelektrophorese bzw. Gelextraktion der BAA, erfolgte die Ligation des 1545 bp langen Amylasegens in das entsprechend geschnittene pJGSF14 Plasmid. Hierdurch wurde das Plasmid pEBO3 erhalten. Nach Transformation in *E. coli* ET12567 (pUB307) und dem

Ausplattieren des Ligationsansatzes auf LB Agarmedium mit Apramycin und 1 % unlöslicher Stärke, wurden nach 24 h Inkubation bei 37 °C in einigen Fällen Halos festgestellt. Positive *E. coli* Kolonien wurden gepickt und über Nacht kultiviert. Durch intergenerische Konjugation erfolgte die Transformation in *S. lividans* TK64. Nach weiteren 48 h Inkubation bei 30 °C wurden bei etwa 80 % der Streptomycceten-Kolonien ebenfalls Halos sichtbar. Die SDS PAGE des Zelllysats von *S. lividans* TK64- pEBO3 zeigte nach der Coomassie- Färbung eine Bande in der erwarteten Größe von 58 kDa (siehe Abb. 12).

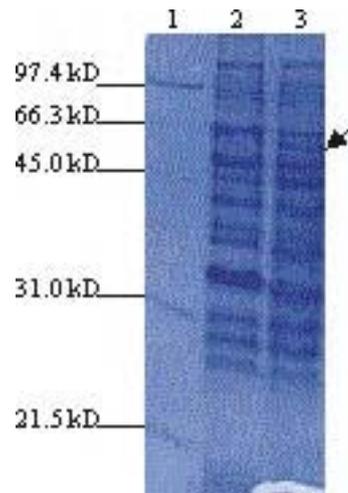


Abbildung 12: SDS PAGE von lmw standard (Spur 1), *S. lividans* TK64-pJGSF14 (Spur 2) und *S. lividans* TK64- pEBO3 (Spur 3). Exprimierte BAA (~ 58 kD) ist mit einem Pfeil markiert.

Somit ist die  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* unter Kontrolle des SF14 Promotors sowohl in *E. coli* als in *S. lividans* exprimierbar.

Durch Kultivierung von *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23 und TK64 auf R5 Agarplatten mit 1 % unlöslicher Stärke konnte weiterhin gezeigt werden, daß obengenannte Stämme auch nach 3 Wochen keine Halos bilden, d. h. keine Amylase exprimieren. Dieser Befund wurde durch eine Homologiesuche mit der BAA und der  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus licheniformis* in der *S. coelicolor* A3(2) Genomdatenbank bestätigt.

### 3.2 Transformation von *Streptomyces*

Die verschiedenen Möglichkeiten zur Transformation von *Streptomyces* (Protoplastentransformation, Elektroporation, direkte Transformation und intergenerische

Konjugation) wurden im Hinblick auf ihre Anwendung für die Erstellung von Genbanken genomischer DNA aus Böden, im Folgenden als Boden DNA bezeichnet, evaluiert.

Von Bedeutung in diesem Zusammenhang ist vor allem die Transformationseffizienz, definiert als Kolonienzahl/  $\mu\text{g}$  DNA (colony forming units/  $\mu\text{g}$  DNA, abgekürzt cfu/  $\mu\text{g}$  DNA), aber auch die Handhabbarkeit der jeweiligen Methode, ihre Reproduzierbarkeit und die Aufbewahrungsdauer von kompetenten Zellen sind von Bedeutung. Alle Methoden erfordern eine Optimierung bezüglich der Wachstumsbedingungen der Stämme. Aufgrund dessen wurden das komplexe Soja-Malz Medium (SM-Medium) und tryptic soja broth (tsb-medium), sowie das halbsynthetische R5- Medium und das synthetische MG-Medium verwendet.

Ein grundsätzliches Problem ist die Feststellung des optimalen Wachstumszustands für die Transformation, da aufgrund der Mycelbildung der meisten Stämme die Messung der optischen Dichte, bzw. der Biofeucht- oder Biotrockenmasse unmöglich ist. Darüberhinaus ist die Mycelgröße in hohem Maße von der Durchlüftung des verwendeten Schüttelkolbens abhängig (Vorhandensein bzw. Anzahl von Schikanen, oder Verwendung von Edelstahlfedern). Um den Wachstumszustand festzustellen, wurde der Myceldurchmesser mit Hilfe des Mikroskops bestimmt. Es erfolgte die Unterteilung in frühe (Myceldurchmesser bis  $0.25 \mu\text{m}$ ), mittlere (Myceldurchmesser zwischen  $0.25$  und  $15 \mu\text{m}$ ) und späte Wachstumsphase (Myceldurchmesser über  $15 \mu\text{m}$ ).

Ein weiteres Problem besteht in der Bereitstellung der zu transformierenden DNA. So wird Fremd-DNA mit einem unterschiedlichen Methylierungsmuster eher von den in manchen Stämmen vorliegenden Restriktionsenzymen gespalten und im Folgenden durch DNase abgebaut. Nicht methylierte DNA für die Transformation ist wesentlich unempfindlicher und kann beispielsweise durch den direkten Einsatz von PCR Produkten erhalten werden. Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung eines *E. coli* *Streptomyces* Shuttlevektors, der in einem methylierungsdefizienten *E. coli* Stamm, zum Beispiel *E. coli* JM110 ( $\text{dam}^-$ ,  $\text{dcm}^-$ ) bzw. ET12567 ( $\text{dam}^-$ ,  $\text{dcm}^-$ ,  $\text{hsd}^-$ ), vermehrt und anschließend aufgereinigt wurde. Darüberhinaus kann auch durch den Einsatz von einzelsträngiger DNA eine höhere Transformationseffizienz erreicht werden. Einzelsträngige DNA kann u. a. durch den Einsatz von Plasmiden mit einem  $\text{fl}$  ori erhalten werden, andere Methoden bedienen sich der Denaturierung von Doppelstrang DNA in alkalischer Umgebung oder durch Hitze.

Allen Methoden zur Transformation ist weiterhin gemein, daß das eingesetzte Plattenmedium, bzw. eine u. U. später erfolgende Überschichtung mit Weichagar eine Auswirkung auf die

Zahl an Transformanden hat. Abbildung 13 zeigt eine Übersicht der im Folgenden optimierten Bedingungen.

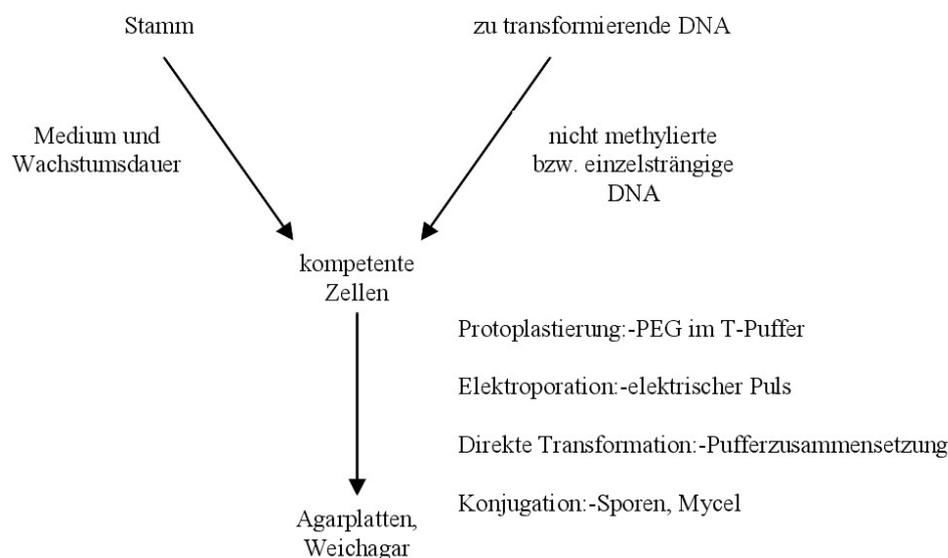


Abbildung 13: Schematische Darstellung der bei den verschiedenen Transformationsmethoden optimierten Bedingungen.

Die Methoden wurden unter Einhaltung der Standardbedingungen bzw. Vorschriften aus Material und Methoden durchgeführt, so daß nach Möglichkeit nur ein Parameter verändert bzw. optimiert wurde. Weiterhin wurden für die Bestimmung der Transformationseffizienz für jedes Experiment die Zahl an Transformanden von 4 bis 6 Platten hinzugezogen und der Durchschnittswert angegeben. Je nach Experiment exprimieren die transformierten Plasmide entweder die Catchol-2,3-dioxygenase (pFIS-Xyl bzw. pEBO1) oder die Tyrosinase (pIJ702).

### 3.2.1 Stammspezifische Restriktion

Die meisten *Streptomyces* bzw. *Actinomyces* Stämme besitzen methylierungsspezifische Restriktionsenzyme und sind dadurch in der Lage, unterschiedlich methylierte Fremd-DNA zu spalten und abzubauen. Als Folge wird die Transformation von Plasmid-DNA entweder vollständig unterbunden oder zumindest die Transformationseffizienz stark vermindert. Um einen geeigneten Expressionswirt zu finden, ist es daher erforderlich, verschiedene Stämme auf den Abbau von Plasmid-DNA zu testen. Wie in Material und Methoden beschrieben, wurden durch Ultraschall aufgeschlossene Zellen der klassischen ‚Arbeitsstämme‘ (*S. lividans*

TK23 bzw. TK64 und *S. coelicolor* A3(2)), der sogenannten ‚Teaching-Strains‘ aus der Deutschen Stammsammlung (*S. albus*, *S. rimosus*, *S. venezuelae*, *S. griseus*), des Actinomyceten *Amycolatopsis mediterranei* und des *SalI* exprimierenden *S. albus* G, mit methylierter pGM160 Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 $\alpha$  inkubiert und mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Anschließend erfolgte die Klassifizierung in nicht (unveränderte Bande des Plasmids im Agarosegel), mäßig (auftreten eines Schmiere) und stark (keine Bande sichtbar) Plasmid DNA abbauende Stämme. Von den untersuchten Stämmen (siehe Tabelle 11) zeigten *S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64 und *S. venezuelae* keine Restriktion von Plasmid DNA, wohingegen die übrigen Stämme die Plasmid DNA abbauen.

Tabelle 11: Degradierung von Plasmid DNA durch stammspezifische Restriktionsenzyme. -: nicht beobachtbar, 0: schwach, +: ausgeprägt.

Stamm	Restriktion
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	0
<i>S. lividans</i> TK23	-
<i>S. lividans</i> TK64	-
<i>S. albus</i>	0
<i>S. griseus</i>	+
<i>S. rimosus</i>	0
<i>A. mediterranei</i>	-
<i>S. venezuelae</i>	0
<i>S. albus</i> G	0

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden *S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64 und *S. venezuelae* im Folgenden auf ihre Transformierbarkeit untersucht. Obwohl bei *S. coelicolor* A3(2) ein geringer Abbau von Plasmid DNA beobachtet wurde, wurde der Stamm aufgrund von Anwendungsmöglichkeiten, die sich aus Informationen aus dem Genomprojekt ergeben, ebenfalls verwendet.

### 3.2.2 Modifikation von Plasmid DNA

Mittels Protoplastentransformation wurde sowohl der Einfluß nicht methylierter, als auch einzelsträngiger DNA ausgetestet (siehe Abbildung 14). Hierzu wurden *S. coelicolor* A3(2)

und *S. lividans* TK23 in glycinhaltigem Yeme Medium bis zum Erreichen der späten, bzw. mittleren log Phase kultiviert. Der Shuttlevektor pGM160 wurde entweder aus *E. coli* DH5 $\alpha$  oder JM110 mittels des Spin-Mini-Plasmid-Präparations-Kits (Qiagen GmbH) isoliert und nach Vorschrift wahlweise im Alkalischen oder mit Hitze denaturiert, wobei festgestellt wurde, daß die Denaturierungsmethode keinen Einfluß auf die Transformationseffizienz besitzt. Im weiteren Verlauf wurden die Protoplasten nach Transformation mit pGM160 auf R5 Platten aufgebracht und 20 h später mit R3 Weichagar und Antibiotikum überschichtet. Nach 3 d Kultivierung bei 30 °C wurde die Transformanzahl bestimmt.

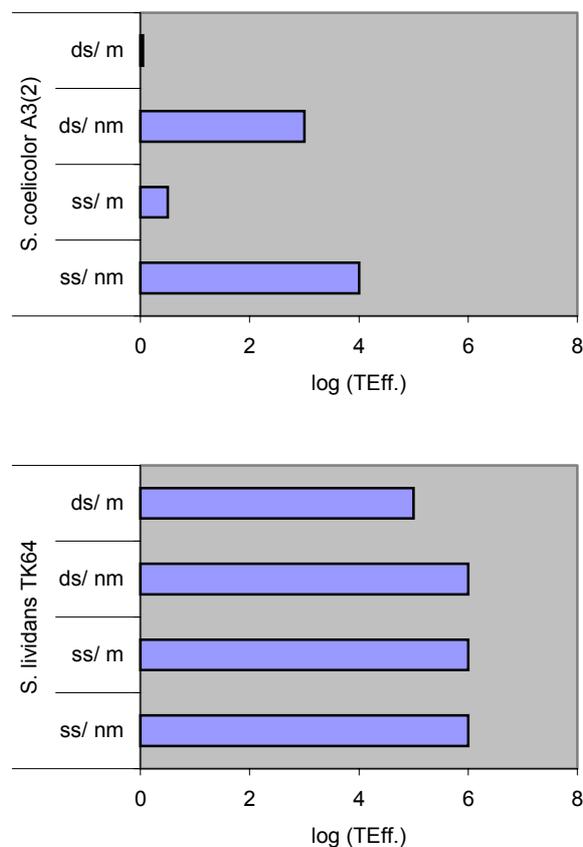


Abbildung 14: Erzielte Transformationseffizienzen (TEff.) mittels Protoplastierung von *S. coelicolor* A3(2) und *S. lividans* TK64 mit verschieden modifizierter pGM160 Plasmid-DNA. Verwendete Abkürzungen hierbei: ds- doppelsträngig, nm- nicht methyliert, m- methyliert, ss-einzelsträngig.

Erwartungsgemäß konnte *S. coelicolor* A3(2) als Stamm mit einer schwachen Restriktion von Plasmid DNA mit methylierter und doppelsträngiger DNA nicht transformiert werden. Insofern führte der Einsatz nicht methylierter und einzelsträngiger DNA zu den besten Ergebnissen. *S. lividans* TK64, der keine Restriktion von Plasmid DNA aufwies, konnte in

allen Fällen mit ähnlichen Transformationseffizienzen transformiert werden. Es wurden im Vergleich zur Transformation von *S. coelicolor* A3(2) um einen Faktor 100 höhere Transformationseffizienzen erzielt.

In allen folgenden Experimenten wurde aufgrund dieser Ergebnisse nicht methylierte und einzelsträngige DNA zur Transformation eingesetzt.

### 3.2.3 Protoplastentransformation

Die Protoplastentransformation ist aufgrund hoher Transformationseffizienzen mit bis zu  $10^7$  cfg/  $\mu\text{g}$  DNA die am häufigsten angewendete Methode.

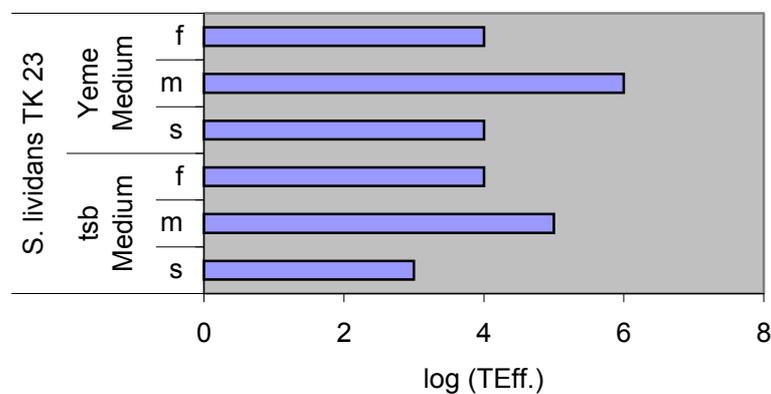
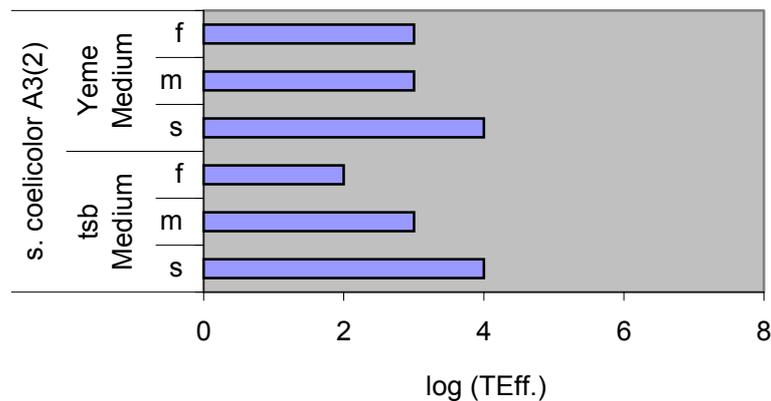
Für die Transformation wurden die Stämme *S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64 und *S. venezuelae* eingesetzt, die keinen Abbau der Plasmid DNA verursachten, weiterhin ebenfalls *S. coelicolor* A3(2).

Die Kultivierung der verschiedenen Stämme fand sowohl in Yeme als auch tsb Medium statt. Nach dem Übergang in die logarithmische Wachstumsphase (log Phase) wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, wobei durch Untersuchung mit dem Mikroskop eine Aufteilung in frühe, mittlere bzw. späte log Phase erfolgt (siehe Abb. 15). Das Mycel wurde nach Vorschrift protoplastiert und gelagert, wobei es sich zeigte, daß ein Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff und die anschließende Lagerung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  einer Lagerung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  vorzuziehen ist. Im Vergleich sinkt die Transformationseffizienz der bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagerten Zellen merklich innerhalb von 8 bis 12 Wochen um ca. 20 bis 25 Prozent.

Zur Transformation wurde pIJ702 Plasmid DNA mit 10 % (V/V) 1 M NaOH alkalisch denaturiert. Nach 10 Min. wurde durch Zugabe der gleichen Menge 1 M HCl neutralisiert und die Plasmid DNA direkt zur Transformation von *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23, bzw. TK64 und *S. venezuelae* eingesetzt. Zusätzlich zu den allgemein modifizierten Parametern ist das verwendete Polyethylenglycol (PEG) im Transformationspuffer von entscheidender Bedeutung. Hauptsächlich dessen Polymerisierungsgrad aber auch Firma und Charge haben einen Einfluß auf die Transformation. Der Transformationspuffer (T-Puffer) wurde bezüglich des verwendeten PEG optimiert. Dazu wurden sowohl PEG 1000 von den Herstellern Fluka, Merck, Roth und ICN als auch PEG 4000 und 6000 von Fluka ausgetestet (siehe Abbildung 16). Die Endkonzentration im T-Puffer betrug 25 % (M/V) PEG 1000. Niedrigere Konzentrationen resultierten in einer geringeren Transformationseffizienz, wohingegen eine höhere Konzentration nach Literaturangaben die Protoplastenfusion begünstigt. Es zeigte sich, daß der Polymerisierungsgrad und Hersteller des PEG die Transformationseffizienz stark

beeinflußten. So wurden mit PEG 1000 von Fluka mit  $10^6$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA die besten Ergebnisse erzielt, wohingegen mit PEG 1000 von ICN eine halb so hohe Transformationseffizienz erreicht wurde. Mit dem PEG 1000 von Merck und Roth wurden ebenso wie mit PEG 4000 von Fluka Transformationseffizienzen von  $10^4$  bis  $10^5$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA erzielt. Mit PEG 6000 von Fluka hingegen war eine Protoplastentransformation nicht möglich.

Das Ausplattieren erfolgte auf R5 bzw. tsb Agarplatten und ebenfalls auf tsb Agarplatten mit Antibiotikum. Nach 16 bis 24 Stunden wurden die Platten ohne Antibiotikum mit antibiotikumhaltigem R3 Weichagar oder Soft Nutrient (SN) Agar überschichtet (siehe Abbildung 17). Hierbei zeigte sich die Kombination von R5 Agarplatten und einer Überschichtung mit R3 Weichagar für alle vier Stämme als am besten geeignet. Durch den Einsatz von tsb Agarplatten zur Transformation wurden bis zu einem Faktor 1000 schlechtere Transformationseffizienzen erzielt. Wobei vor allem durch ein Ausplattieren auf Agarplatten mit Antibiotikum, das heißt ohne Möglichkeit zur Protoplastenregeneration, die schlechtesten Ergebnisse erreicht wurden. Ebenso wurden durch ein Überschichten mit SN Weichagar etwas schlechtere Transformationseffizienzen erzielt.



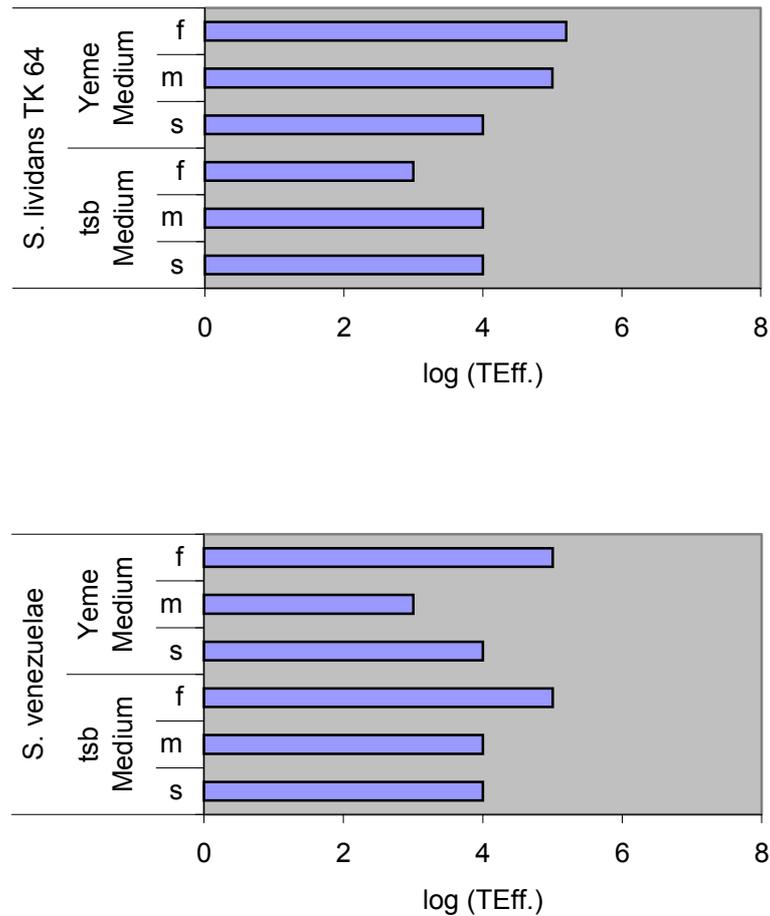


Abbildung 15: Erzielte Transformationseffizienzen (TEff.) mittels Protoplastierung von *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64 und *S. venezuelae* mit pIJ702 Plasmid DNA. Die Optimierung erfolgt auf das Wachstumsmedium (tsb und Yeme, jeweils mit 0.5% Glycin) und auf den Zeitpunkt der Mycelernte (frühe, mittlere und späte log-Phase).

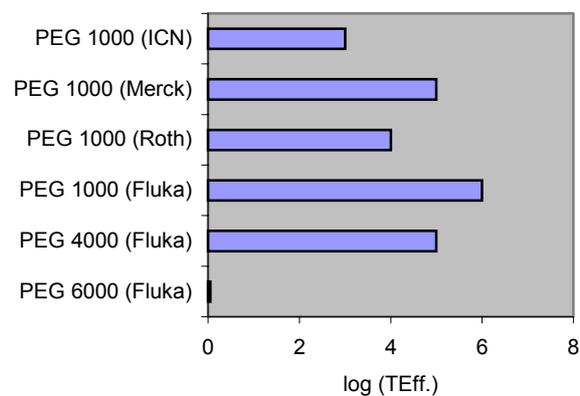
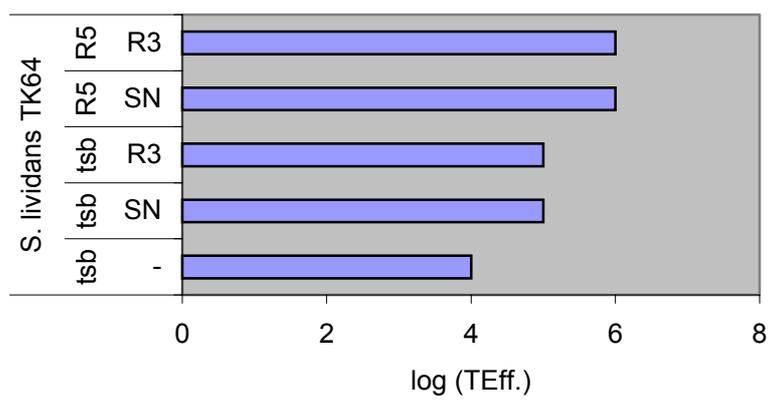
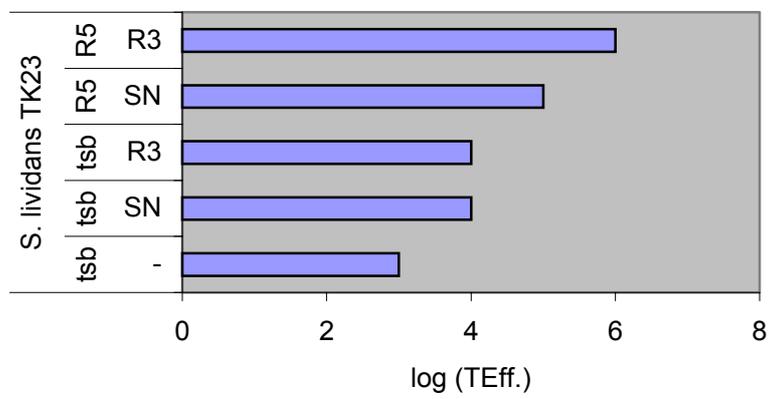
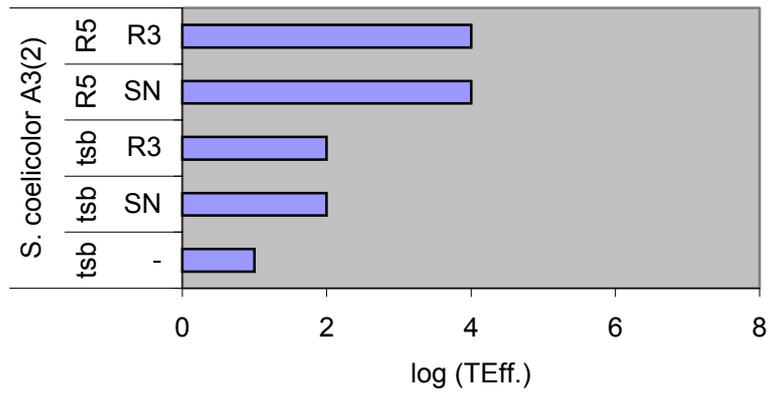


Abbildung 16: Erzielte Transformationseffizienzen (TEff.) mittels Protoplastierung von *S. lividans* TK23 mit pIJ702 Plasmid DNA. Variation des PEG (Hersteller und Polymerisierungsgrad) in Transformationspuffer, jedoch bei einem gleichbleibenden Anteil von 25 % (M/V).



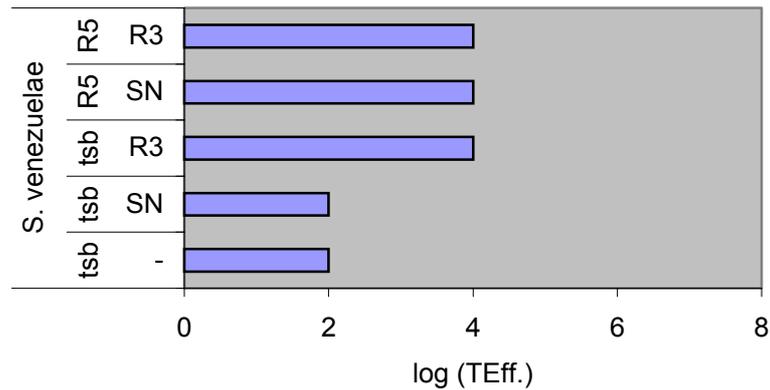


Abbildung 17: Erzielte Transformationseffizienzen (TEff.) mittels Protoplastierung von *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64 und *S. venezuelae* mit pIJ702 Plasmid DNA nach Kombination verschiedener Plattenmedien (R5, bzw. tsb Agar) u. Weichagar (R3, SN).

Die besten Resultate wurden nach Kultivierung von *S. lividans* TK23 oder TK64 in Yeme Medium erhalten. Außerdem zeigte sich die Verwendung von PEG 1000 (Fluka) und das Ausplattieren auf R5 Weichagar mit anschließendem Überschichten mit R3 Weichagar/Antibiotikum als diejenige Lösung mit den höchsten Transformationseffizienzen.

### 3.2.4 Elektroporation

Durch Elektroporation werden im Allgemeinen weniger Transformanden erhalten, jedoch können durch diese Methode verhältnismäßig leicht Stämme transformiert werden, ohne langwierige Protokolle zur Protoplastierung der einzelnen Stämme entwickeln zu müssen.

#### Einfluß des Kultivierungsmediums

Die Kultivierung der Stämme erfolgte bis zum Erreichen der frühen (*S. venezuelae*), mittleren (*S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64), bzw. späten (*S. coelicolor* A3(2)) log-Phase in tsb oder CRM Medium. Das Mycel wurde im Anschluß nach Vorschrift vorbereitet und mit hitzedenaturierter pIJ702 Plasmid DNA transformiert. Als Parameter für die Elektroporation wurden eine Spannung von 2.0 kV und ein Widerstand von 400  $\Omega$  gewählt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen zur Regeneration noch 2 bis 3 h bei 30 °C inkubiert und anschließend auf R5 Platten oder tsb Platten mit Antibiotikum aufgebracht. Nach 20 h wurden die R5 Platten mit R3 Weichagar mit Antibiotikum überschichtet. Nach weiteren 3 d wurde die Anzahl an Transformanden bestimmt (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Erzielte Transformationseffizienzen (TEff.) mittels Elektroporation für *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64 und *S. venezuelae* mit hitzedenaturierter pIJ702 Plasmid DNA. Die Optimierung erfolgt auf Wachstumsmedium (tsb und CRM).

Stamm	<i>S. coelicolor</i> A3(2)		<i>S. lividans</i> TK23		<i>S. lividans</i> TK64		<i>S. venezuelae</i>	
	tsb	CRM	tsb	CRM	tsb	CRM	tsb	CRM
TEff. [cfu/ DNA]    [µg]	-	<10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	-	-

Das CRM Medium zeigte sich für die Elektroporation von *S. coelicolor* A3(2) besser als das tsb Medium geeignet. Kein Einfluß des Mediums wurde bei der Elektroporation von *S. lividans* TK23 bzw. TK64 festgestellt. *S. venezuelae* konnte weder nach Kultivierung in tsb noch CRM Medium elektroporiert werden.

#### Einfluß der Elektroporationsparameter

In einem weiteren Experiment wurden *S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64 und *S. coelicolor* A3(2) in CRM Medium kultiviert und das Mycel nach Vorschrift vorbereitet. Das elektrokompetente Mycel wurde mit hitzedenaturierter pIJ702 Plasmid DNA transformiert, wobei als Parameter Spannung und Widerstand angepaßt wurden (siehe Tabelle 13). Die Zeitkonstante (Zeitdauer des elektrischen Pulses) konnte hierbei als eine Kontrollgröße für eine erfolgreiche Elektroporation benützt werden. Bei Werten unter 2 bis 3 ms (Kurzschluß), bzw. bei Werten über 10 ms erfolgte keine Elektroporation der Zellen. Da das Mycel (v.a. bei den *S. lividans* Stämmen) im Elektroporationspuffer zur Verklumpung neigte und daraus niedrige Transformationseffizienzen resultierten, wurde das Aliquot zur Elektroporation zusätzlich 2 Min. mit Ultraschall behandelt und anschließend für mindestens 10 Min. eisgekühlt.

Nach der Elektroporation wurden die Zellen zur Regeneration noch 2 bis 3 h bei 30 °C inkubiert und anschließend auf R5 Platten oder tsb Platten mit Antibiotikum aufgebracht. Nach 20 h wurden die R5 Platten mit R3 Weichagar mit Antibiotikum überschichtet. Nach 3 Tagen wurde die Anzahl der Transformanden bestimmt.

Tabelle 13: Erreichte Transformationseffizienzen von *S. lividans* TK64, *S. coelicolor* A3(2) und *S. lividans* TK23, kultiviert in CRM Medium, mit hitzedenaturierter pIJ702 Plasmid DNA in Abhängigkeit von Spannung und Widerstand bei der Elektroporation.

Stamm	<i>S. lividans</i> TK64							
Spannung [kV]	1.5	1.75	1.75	2.0	2.0	2.0	2.25	2.25
Widerstand [ $\Omega$ ]	200	400	600	200	400	600	200	400
Zeitkonst. [ms]	4.5	8.4	4.8	4.4	7.8	12.8	8.1	2.8
TEff. [cfu/ $\mu$ g DNA]	-	$<10^1$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	-	$<10^1$	-

Stamm	<i>S. coelicolor</i> A3(2)		<i>S. lividans</i> TK23	
	Spannung [kV]	1.75	2.0	1.75
Widerstand [ $\Omega$ ]	600	400	600	400
Zeitkonst. [ms]	5.2	6.8	4.5	7.3
TEff. [cfu/ $\mu$ g DNA]	$<10^1$	$<10^1$	$10^2$	$<10^1$

Nach der Elektroporation wurden die Zellen auf R5 Agar aufgebracht, gefolgt von einem Überschichten mit R3 Weichagar und Antibiotikum nach 20 h Kultivierung bei 30 °C. Durch die Elektroporation von *S. lividans* TK23 und *S. lividans* TK64 wurden jeweils  $10^2$  cfu/ $\mu$ g DNA erhalten, bei der Elektroporation von *S. coelicolor* A3(2) hingegen 5 cfu/ $\mu$ g DNA.

### 3.2.5 Direkte Transformation

Die direkte Transformation des Mycels wurde als Alternative zur schwierig durchzuführenden Protoplastentransformation einiger *Actinomyces* Stämme, beispielsweise *Nocardia* und *Amycolatopsis*, entwickelt.

*S. lividans* TK23, bzw. *A. mediterranei* wurden in tsb Medium jeweils bis zum Erreichen der mittleren log-Phase kultiviert. Die Transformation wurde nach Vorschrift mit nicht methylierter und alkalisch denaturierter pIJ702 Plasmid DNA durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde mit R2L Weichagar auf S27M Platten aufgebracht und nach 20 h mit R2L Weichagar mit Antibiotikum überschichtet. Bei der Transformation von *A.*

*mediterranei* wurden nach 2 bis 3 Wochen im Durchschnitt 5 Kolonien erhalten, wohingegen die Transformation von *S. lividans* TK23 nicht gelang.

Weiterhin zeigte sich, daß ein Aufbewahren der Transformationsansätze nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff, gefolgt von einer Aufbewahrung bei  $-80\text{ °C}$  nicht möglich ist. Nach einem Auftauen bei  $4\text{ °C}$  konnten die Aliquots nicht transformiert werden.

### 3.2.6 Intergenerische Konjugation

Die intergenerische Konjugation zeichnet sich v.a. durch die Einfachheit der Durchführung aus.

Nach der Transformationsmethode mit DMSO wurde zuerst *E. coli* ET12567-pUB307 mit pJGSF14 kotransformiert. Gemäß der Vorschrift wurden ET12567-pUB307-pJGSF14 mit Mycel von *S. coelicolor* A3(2) bzw. *S. lividans* TK64 durchmischt und auf R5 Platten aufgebracht. Nach 20 h wurde mit R3 Weichagar und den Antibiotika überschichtet.

In einem anderen Protokoll für die intergenerische Konjugation wurde nicht das Mycel des jeweiligen Stammes sondern gereifte Sporen transformiert. In Folge wurde das Gemisch ebenfalls auf R5 Platten aufgebracht und nach 20 h mit R3 Weichagar/ Antibiotikum überschichtet.

Es wurden bei der intergenerischen Konjugation von *S. coelicolor* A3(2) Mycel und Sporen Transformationseffizienzen von  $10^3$  bzw.  $10^2$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA erzielt. Bei entsprechender Transformation von *S. lividans* TK64 wurde mit  $10^5$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA bei Sporen ein 10 fach höherer Wert als bei *S. lividans* TK64 Mycel erzielt.

### 3.3 *E. coli* BL21-CodonPlus als Expressionssystem für GC-reiche DNA

Eine Möglichkeit zur Expression GC reicher DNA in *E. coli* stellen kommerziell erhältliche Stämme dar, die zusätzliche Kopien für in *E. coli* seltene tRNAs besitzen. Dazu wurden BL21-CodonPlus Zellen von Stratagene eingesetzt. Durch zusätzliche Kopien der in *E. coli* seltenen argU und proL tRNA, verantwortlich für die Arginin Codons AGG, bzw. AGA und das Prolin Codon CCC, sollte die Expression von GC reicher DNA erreicht werden. Da es sich bei BL21 außerdem um einen Lon und OmpT defizienten Stamm handelt, kann außerdem eine verminderte Degradierung der exprimierten Proteine erwartet werden. Weiterhin sind BL21-CodonPlus Zellen mit einer Transformationseffizienz von etwa  $10^7$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA nach Herstellerangaben für die Herstellung von Expressionsgenbanken geeignet.

BL21-CodonPlus Zellen wurden mit den Plasmiden pJOE2775-soyC, pCYTEXP1-soyC und pASKIBA-1CA-soyC transformiert. Unter Kontrolle des jeweiligen Promotors steht das soyC Gen aus *S. griseus* ATCC13273 mit einem durchschnittlichen GC Gehalt von 72.3 %. Hierbei handelt es sich um ein Cytochrom P450 Protein mit einem Molekulargewicht von 44 kD. Die Plasmide zeichnen sich v.a. durch unterschiedliche Promotoren aus. So liegt bei pJOE2775 ein Rhamnose induzierbarer Promotor vor, wohingegen eine Induktion des  $\lambda$  Promotors im Plasmid pCYTEXP1 durch Temperaturerhöhung auf 42 °C erfolgt. Der tet-Promotor von pASKIBA-1CA erlaubt eine Induktion mit Anhydrotetracyclin.

Somit wird durch die unterschiedlichen Promotoren einerseits eine unterschiedliche Induktion der Expression ermöglicht. Andererseits erlauben die Promotoren eine unterschiedliche Kultivierungstemperatur nach der Induktion, die in Abhängigkeit von der Thermostabilität des zu exprimierenden Proteins Vorteile bei Ausbeute und Aktivität verschaffen kann.

Zellen mit pCYTEXP1-soyC werden nach Induktion weitere 4 h bei 42 °C kultiviert. Zellen mit pASKIBA-1CA-soyC erfordern aufgrund der geringen Thermostabilität des Induktors Anhydrotetracyclin die Temperaturenniedrigung auf 30 °C, gefolgt von einer 24 h dauernden Kultivierung bei 30 °C und Ernte der Zellen. Mit pJOE2775-soyC transformierte Zellen wurden bei gleichbleibenden 37 °C für 24 h kultiviert.

BL21-CodonPlus pJOE2775-soyC, BL21-CodonPlus pCYTEXP1-soyC und BL21-CodonPlus pASKIBA-1CA-soyC wurden bei 37 °C und 220 upm in 100 ml SOC Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~0.7 kultiviert, anschließend erfolgte die Induktion.

Zum Vergleich der Expression wurde *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den verschiedenen Plasmiden transformiert. DH5 $\alpha$  pJOE2775-soyC, DH5 $\alpha$  pCYTEXP1-soyC und DH5 $\alpha$  pASKIBA-1CA-soyC wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte über SDS PAGE und Coomassie Färbung der Proteine im Zelllysate (siehe Abbildung 18). Zusätzlich erfolgte durch die Aufnahme der CO Differenzspektren von jeweils 50 ml Kultur eine Bestimmung des P450 Gehalts der Probe (Omura & Sato 1964). Hierbei zeigten sich sowohl bei der Expression in DH5 $\alpha$  als auch in BL21-CodonPlus Zellen ausschließlich niedrige, nicht quantifizierbare Mengen an P450.

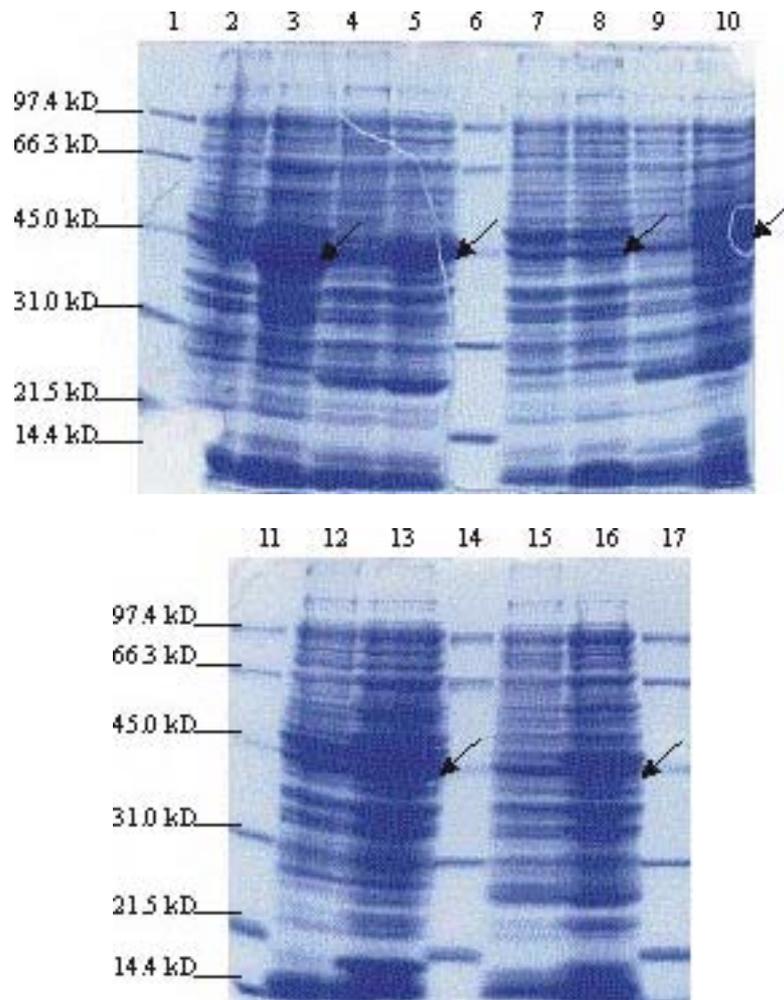


Abbildung 18: SDS PAGE von lmw standard (Spur 1,6, 11, 14, 17); DH5 $\alpha$ - pCYTEXP1-soyC vor Induktion bzw. nach Induktion (Spur 2, 3); BL21-CodonPlus-pCYTEXP1-soyC vor Induktion bzw. nach Induktion (Spur 4, 5); DH5 $\alpha$ -pASKIBA-1CA-soyC vor Induktion bzw. nach Induktion (Spur 7, 8); BL21-CodonPlus-pASKIBA-1CA-soyC vor Induktion bzw. nach Induktion (Spur 9, 10); DH5 $\alpha$ - pJOE2775-soyC vor Induktion bzw. nach Induktion (Spur 12, 13); BL21-CodonPlus-pJOE2775-soyC vor Induktion bzw. nach Induktion (Spur 15, 16). Die Bande des soy C (~ 44 kD) ist mit einem Pfeil markiert.

Nach SDS PAGE ist bei DH5 $\alpha$ -pJOE2775-soyC, DH5 $\alpha$ -pCYTEXP1-soyC und schwach bei BL21-CodonPlus-pCYTEXP1-soyC die zu erwartende Proteinbande bei 44 kD zu erkennen. Bei DH5 $\alpha$ -PASKIBA-1CA-soyC, BL21-CodonPlus-PASKIBA-1CA-soyC und BL21-CodonPlus-pJOE2775-soyC ist keine heterologe Proteinexpression zu erkennen.

### 3.4 Genbanken aus Boden DNA

Die Bodenprobe wurde durch einen kombinierten Aufschluß mit flüssigem Stickstoff und einem weiteren mechanischen Aufschluß mit Glasperlen in einer Retsch-Kugelmühle aufgeschlossen. Nach anschließender Ammoniumacetat Fällung und zweifacher Phenol-Chloroformextraktion wurde aus dem Überstand die DNA mit Ethanol gefällt und durch eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. In Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Bodenprobe und der Zeitdauer des Aufschlusses wurde hierbei genomische DNA einer Größe von 15 bis > 40 kb erhalten, wie durch Agarosegelelektrophorese mit kb extension ladder als Marker gezeigt werden konnte. Die Größe der DNA Bruchstücke zeigte sich dabei stark abhängig von der Aufreinigungsmethode. So führte eine zu starke Beanspruchung durch Scheerkräfte (zu langes Mörsern in fl. Stickstoff, bzw. ein zu langer oder mit zu hoher Amplitude durchgeführter Glasperlenaufschluß) zu unerwünscht starker Degradierung der DNA.

Es zeigte sich, daß, wahrscheinlich durch Verunreinigungen mit Huminstoffen und Schwermetallen verursacht, für den Restriktionsverdau der Boden DNA eine zwei- bis dreifache Menge an Enzym zur Spaltung notwendig war. Die Klonierung dieser verunreinigten DNA zeigte sich als schwierig, bei der Transformation wurden entweder keine oder nur bis zu 20 Kolonien pro Platte erhalten. Aus diesem Grund wurde die Boden DNA mit dem Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System oder über Chroma Spin + TE-1000 Säulen weiter aufgereinigt.

Im Anschluß war es möglich, die genomische DNA entweder einem Partial- oder einem Totalverdau unter Standardbedingungen zu unterwerfen. Der Partialverdau wurde hierbei mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* durchgeführt, wobei sich eine 2 bis 3 minütige Inkubation bei 37 °C als ausreichend erwies. Es folgte die Ligation über die *Bam*HI Schnittstelle in pGM160. Die vollständige Spaltung der genomischen DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Bg*III, *Sac*I, *Dra*III, *Nco*I, und *Xba*I durchgeführt. In allen Fällen wurde nach etwa 16 h Inkubtion bei 37°C ein Schmier von etwa 100 bp bis über 8 kb auf dem Agarosegel erhalten. Mit *Bg*III gespaltene DNA wurde in die *Bg*III Schnittstelle von pIJ702 ligiert, wohingegen der Restriktionsverdau mit *Nco*I oder *Xba*I die Ligation in das entsprechend geschnittene pGM160 Plasmid ermöglichte. Aufgrund der Größe der Vektoren pIJ702 (5.7 kb) und pGM160 (7.8 kb) und einer damit verbundenen verminderten Aufnahmefähigkeit größerer DNA-Fragmente (> 5 kb) in Streptomyceten, erfolgte darüberhinaus der alleinige Einsatz des ‚*Streptomyces*- Anteils‘ des Shuttlevektors pGM160. So ergab die Spaltung mit *Sac*I den

„*Streptomyces*- Anteil“ mit 3.5 kb und den „*E. coli*- Anteil“ mit 4.3 kb. Nach Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion des 3.5 kb Fragments erfolgte die Ligation von genomischer DNA über die *SacI* Schnittstelle. Weiterhin ergab die Religation des „*Streptomyces*- Anteils“ das Plasmid pEBO2'. Bei diesem Plasmid erfolgte über die *DraIII* und *NcoI* Schnittstelle die Insertion von genomischer DNA (siehe Abbildung 19). Insgesamt erwiesen sich *DraIII* und *BglIII* als am Geeignesten für die Spaltung von Boden DNA. Mit diesen beiden Enzymen wurden bei Durchführung von Standardrestriktionsansätzen mit Boden DNA konstant etwa 80 bis 120 Kolonien pro Platte erhalten. Bei Spaltungen, die mit *Sau3A1*, *SacI*, *NcoI* oder *XbaI* durchgeführt wurden, wurden in den meisten Fällen weniger als 60 Kolonien pro Platte erhalten.

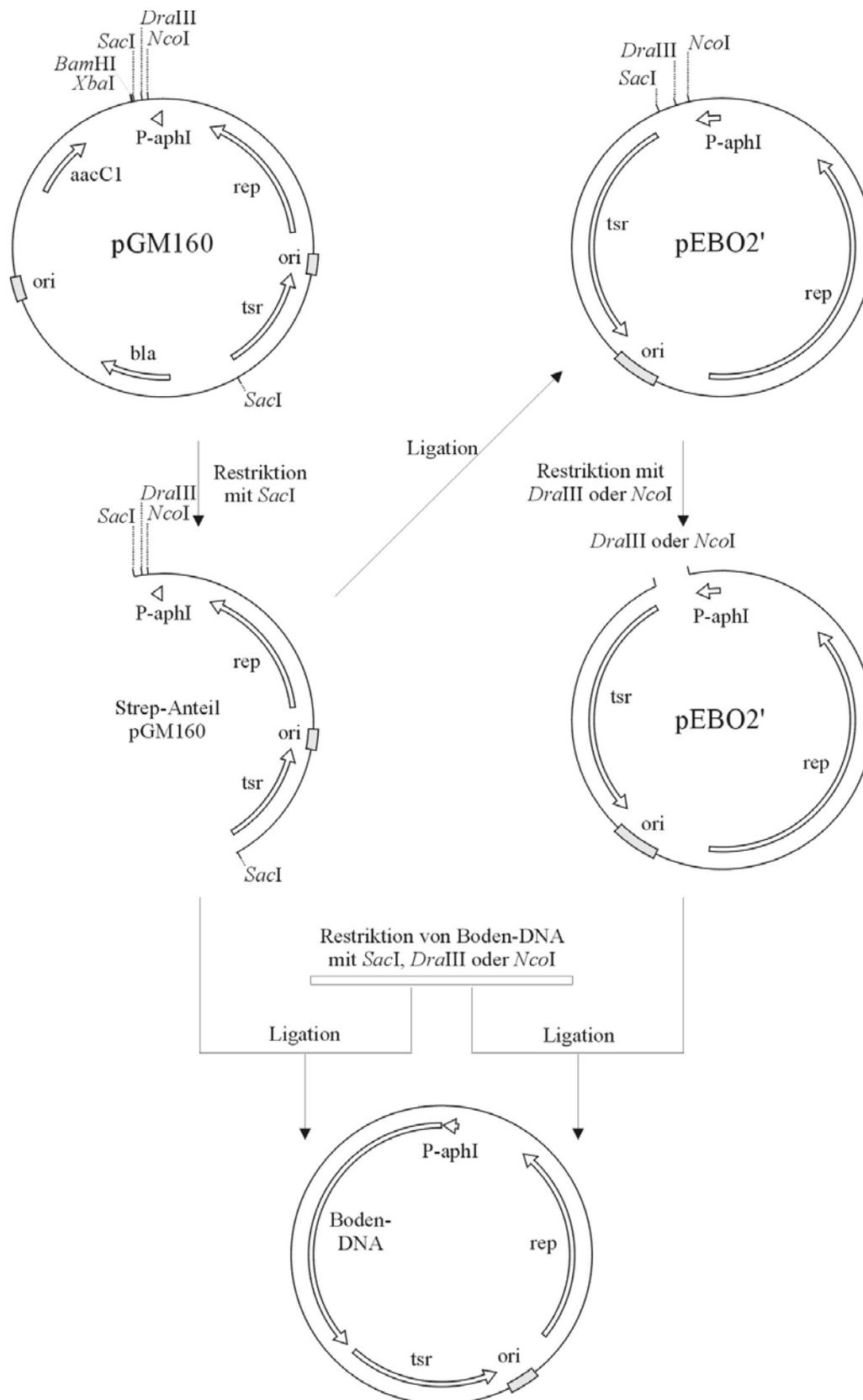


Abbildung 19: Strategie zur Klonierung von Boden-DNA in den ‚*Streptomyces*-Anteil‘ des Shuttlevektors pGM160 über *SacI*, *DraIII* oder *NcoI* Schnittstellen.

Über Protoplastentransformation wurde mit Boden DNA ligierte pGM160 bzw. pIJ702 Plasmid DNA in *S. lividans* TK23 bzw. TK64 eingebracht. Nach etwa 3 d erfolgte durch ein zusätzliches Überschichten der Agarplatten mit einer R5 Weichagar/ Tributyrin Emulsion der Assay auf Lipase bzw. Esteraseaktivität.

Da sowohl das *S. lividans* TK23 als auch TK64 Genom wahrscheinlich für mehrere Lipasen kodieren (ergibt sich aus Vgl. mit dem *S. coelicolor* A3(2) Genomprojekt) bzw. diese auch exprimieren, waren noch weitere Kontrollexperimente notwendig, um sicherzustellen, daß eine vorgefundene Lipaseaktivität nicht von den bereits vorhandenen Lipasen stammte. So wurde aus *S. coelicolor* A3(2) bereits eine Lipase isoliert und exprimiert (Valdez et al. 1999), wobei als bevorzugtes Substrat überwiegend kurzkettig substituierte Triacetyl-glycerinester umgesetzt werden. Allerdings ist die Lipaseaktivität erst nach Überexpression nachweisbar. Weiterhin ergab die Homologiesuche auf Lipasen in *S. coelicolor* A3(2) über 8 mögliche Treffer.

Aus diesem Grund wurde für die Herstellung von Genbanken aus Boden DNA in *Streptomyces* als Kontrolle die BTL2 Lipase verwendet. So erfolgte bei *S. lividans* TK23-pEBO2C bzw. *S. lividans* TK64-pEBO2C innerhalb von 1 bis 2 d die Ausbildung von Halos auf mit Weichagar und Tributyrin überschichteten R5 Platten.

Es zeigte sich, daß die Lipase(n) aus *S. lividans* TK23 und TK64 erst in einem späten Wachstumsstadium exprimiert bzw. sekretiert werden. So bildeten R5 Weichagar/ Tributyrin überschichtete Platten mit pGM121 transformierten *S. lividans* TK23 bzw. TK64 frühestens nach weiteren 5 bis 6 d Inkubation bei 30 °C Halos als Reaktion auf genomisch kodierte Lipasen aus.

Aufgrund dieser Resultate wurde im weiteren angenommen, daß die aktive Expression einer Lipase aus Boden- DNA in pGM160 ebenfalls zur Ausbildung von Halos zu einem früheren Zeitpunkt führen und somit den Nachweis ermöglichen sollte. Insgesamt wurden etwa 18500 Klone auf Lipase- bzw. Esteraseaktivität gescreent, es wurden jedoch keine lipaseaktiven Klone gefunden.

### 3.4.1 Validierung der Herstellung der Genbanken aus Boden DNA

Um die prinzipielle Richtigkeit der Vorgehensweise bei der Herstellung der Genbanken zu verifizieren, wurde an verschiedenen Schritten der Aufreinigungsprozedur ( dunkel unterlegte Felder in Abbildung 20) 10 µg pEBO1 zu jeweils 0.5 g Bodenprobe hinzugegeben und nach Protokoll aufgereinigt. Nach Protoplastentransformation in *S. lividans* TK23 wurde die Expression der Catechol-2,3-dioxygenase nachgewiesen, indem 3 d nach der Transformation eine weitere Überschichtung der Agarplatten mit 2 ml R3 Weichagar/ 0.2 % Catechol erfolgte.

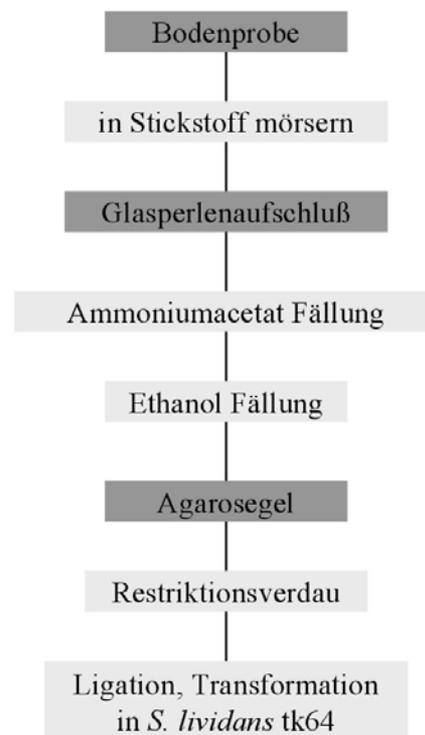


Abbildung 20: Aufreinigungsschema von Boden DNA. Durch dunkel unterlegte Felder werden die Aufreinigungsschritte repräsentiert, bei denen pEBO1 zugegeben wurde.

Durch Dotierung an den Aufreinigungsschritten ‚Glycerenaufschluß‘ bzw. ‚Agarosegel‘ wurden bei 1/100 der Kolonien die Catechol-2,3-dioxygenase nachgewiesen. Die direkte Zugabe des Plasmids zu der Bodenprobe resultierte in 2 positiven von insgesamt 3000 gescreenten Kolonien.

Gleiches wurde mit der BTL2 Lipase durchgeführt. 12 µg pEBO2C wurden zu 0.5 g Bodenprobe hinzugegeben. Nach kompletter Aufreinigung der DNA, partieller Spaltung mit *Sau3AI* (7 Schnittstellen sind innerhalb des BTL2 Gens vorhanden), Ligation und

Transformation in *S. lividans* TK64 zeigte sich 2 d nach dem Ausplattieren auf mit Weichagar und Tributyrin überschichteten R5 Platten das Halo einer lipaseaktiven Kolonie. Insgesamt wurden 2200 Kolonien gescreent.

### 3.5 Expression in Mikrotiterplatten

Ein weiteres Ziel bestand darin Enzymassays nach Expression von Boden DNA in Streptomyceten nicht nur auf Agarplatten, sondern auch in Mikrotiterplatten (MTPs) durchzuführen. Dies ermöglicht ein Hochdurchsatzscreening (high throughput screening, HTP screening) unter Umständen auch auf andere Enzymaktivitäten, für die keine Plattenassays existieren, so beispielsweise Epoxidhydrolasen.

Enzymassays in MTPs erscheinen noch am ehesten geeignet, Umsetzungen in größerem Maßstab durchzuführen. Im Rahmen dessen wurden Versuche zur Anzucht von *Streptomyces* in Standard- MTPs in 24, 64, 96 und 384 well Format unternommen. Ziel war einerseits, trotz der morphologischen Charakteristika, ein reproduzierbares Wachstum zu erreichen, andererseits eine qualitative und nach Möglichkeit quantitativ durchzuführende Enzymexpression zu gewährleisten.

#### 3.5.1 Kultivierung und Expression im 24 und 64 well Format

Die Kultivierung von *S. lividans* TK23, *S. coelicolor* A3(2), *S. albus*, *S. albus* G und mit pIJ702 transformiertem *S. lividans* TK64 in 24 well MTPs erfolgte jeweils in einem Gesamtvolumen von jeweils 800 µl SM, tsb, R5 oder MG Medium. Zusätzlich wurde bei *S. lividans* TK64-pIJ702 zwischen der Expression in 800 µl Medium mit Antibiotikum und 640 µl Medium verglichen, bei dem nach 24 Stunden die Zugabe von 160 µl Medium mit 5 x Antibiotikum erfolgte (siehe Tabelle 14).

Im 64 well Format wurden die Stämme in jeweils 400 µl Volumen der verschiedenen Medien kultiviert. Die Expression der Tyrosinase in *S. lividans* TK64-pIJ702 wurde in 400 µl Medium mit Antibiotikum und 320 µl Medium + 80 µl Medium/ 5x Antibiotikum nach 24 h durchgeführt (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Qualitative Beobachtung der Expression des Melanings in *S. lividans* TK64-pIJ702 nach 72 h (nb- nicht beobachtbar, w- schwach, m- mittel, s- stark) in 24 bzw. 64 well MTPs.

Medium	SM	SM	tsb	tsb	R5	R5	MG	MG
Zugabe von Medium/ 5 x Antibiotikum		+		+		+		+
Expression	w	m	w	w	m	s	s	s

Ein Wachstum von *S. lividans* TK23, *S. coelicolor* A3(2), *S. albus* und *S. albus* G konnte in allen Medien, sowohl in 24 als auch 64 well Platten, innerhalb von 48 h beobachtet werden (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Qualitative Beobachtung des Wachstums von *S. lividans* TK23, *S. coelicolor* A3(2), *S. albus* und *S. albus* G in SM, tsb, R5 und MG Medium nach 72 h (- kein Wachstum, 0 mäßiges Wachstum, + gutes Wachstum)

Stamm	<i>S. lividans</i> TK23				<i>S. coelicolor</i> A3(2)			
Medium	SM	tsb	R5	MG	SM	tsb	R5	MG
Wachstum	+	+	+	0	+	+	+	0

Stamm	<i>S. albus</i>				<i>S. albus</i> G			
Medium	SM	tsb	R5	MG	SM	tsb	R5	MG
Wachstum	+	0	+	0	+	+	+	+

Weiterhin war eine starke Neigung zur Ausbildung von Mycelklumpen festzustellen (siehe Abbildung 21).

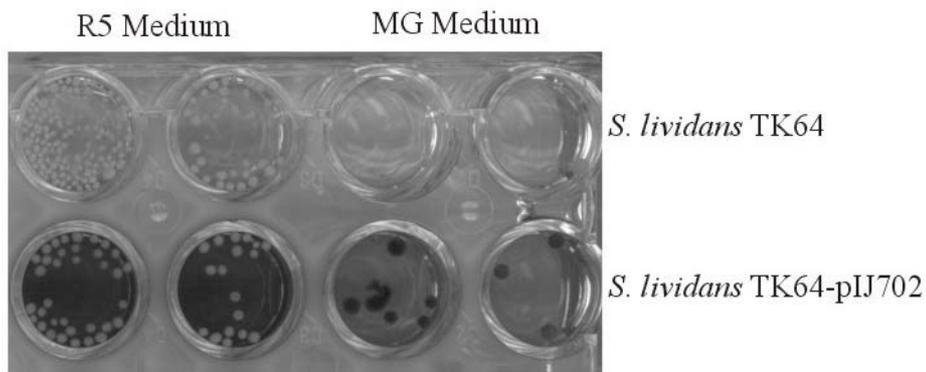


Abbildung 21: Kultivierung von *S. lividans* TK64 und *S. lividans* TK64-pIJ702 in 24 well MTPs mit R5 bzw. MG Medium. In den wells sind die Mycelklumpen zu erkennen. Weiterhin wird in der unteren Zeile die braunschwarze Färbung des Mediums durch die Expression der Tyrosinase sichtbar.

Generell wurde die Expression der Tyrosinase in *S. lividans* TK64-pIJ702 sowohl im 24 als auch im 64 well Format nach 72 h Kultivierung in allen Fällen beobachtet. Eine unterschiedliche Stärke der Expression resultierte allein aus dem verwendeten Medium, eine Abhängigkeit von 24 oder 64 well MTPs zeigte sich nicht. Für nachfolgende Versuche wurde in SM und R5 Medium kultiviert, daß sich als am Geeignesten für die Expression gezeigt hatte.

### 3.5.2 Kultivierung im 96 well Format mit Festmedium

Die Kultivierung von *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23 bzw. TK64 und mit pFis-Xyl transformiertem *S. lividans* TK64 erfolgte in 200 µl Gesamtvolumen. Entweder wurden die Zellen in 150 µl R5 Agar mit Antibiotikum kultiviert, alternativ erfolgte die Kultivierung in 100 µl R5 Agar, wobei nach 24 h 50 µl R3 Weichagar mit 3x Antibiotikum zugegeben wurden. Ein Anwachsen aller Stämme wurde beobachtet.

Bei *S. lividans* TK64-pFis-Xyl erfolgte 72 h nach Kultivierungsbeginn der Enzymassay zum Nachweis der Catechol-2,3-dioxygenase durch die Zugabe von 50 µl R3 Weichagar/ tsr mit einem Gehalt von 0.2 %, 1 %, 5 %, bzw. 10 % (M/V) Catechol als Substrat und Kultivierung bei 37 °C (siehe Abbildung 22). Durch das gebildete 2-Hydroxymuconsäure-semialdehyd erfolgte die Bildung des gelben Reaktionprodukts innerhalb eines Zeitraums von 30 Min. (10

% (M/V) Catechol) bis 36 h (0.2 % (M/V) Catechol) in Abhängigkeit von der eingesetzten Catecholkonzentration.

Durch die oxidierenden Eigenschaften von Catechol wird allerdings ein Farbumschlag des Mediums nach braun verursacht. Dieser Effekt ist abhängig von der zugesetzten Menge an Substrat und kann durch geringere Mengen von Catechol nicht vermieden, jedoch verringert werden. Optimale Mengen an Catechol für den Assay auf Festmedium liegen bei etwa 0.2 % (M/V) des Substrats.

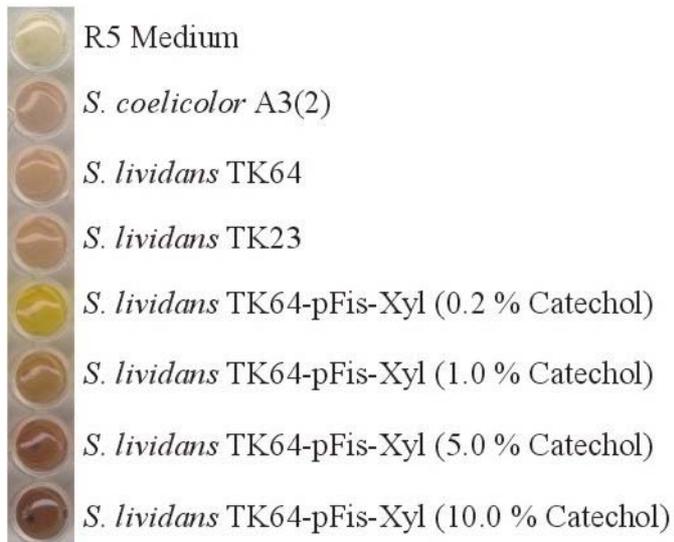


Abbildung 22: In R5 Festmedium kultivierte Stämme (*S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23 und TK64). Bei *S. lividans* TK64-pFis-Xyl erfolgte die Zugabe verschiedener Mengen an Catechol zum Nachweis der Catechol-2,3-dioxygenase.

### 3.5.3 Kultivierung in 96 well Format mit Flüssigmedium

Die Kultivierung von *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK23 bzw TK64, *S. albus*, *S. albus* G und mit pFis-Xyl transformiertem *S. lividans* TK64, bzw. mit pIJ702 transformiertem *S. lividans* TK23 erfolgte in 250 µl Gesamtvolumen. Vorgelegt wurden 200 µl SM, tsb, R5 oder MG Medium mit Antibiotikum oder 160 µl Medium, in das nach 24 h weitere 40 µl Medium mit Antibiotikum gegeben wurden.

Die verschiedenen Stämme wachsen in SM, tsb und R5 Medium zuverlässig an (siehe Tabelle 16). In MG Medium kann hingegen nur ein nicht reproduzierbares Anwachsen festgestellt werden.

Tabelle 16: Qualitative Beobachtung der Expression der Tyrosinase in *S. lividans* TK23-pIJ702 und der Catechol-2,3-dioxygenase in *S. lividans* TK64-pFis-Xyl nach 72 h (nb- nicht beobachtbar, w- schwach, m- mittel, s- stark) in 96 well Platten.

	<i>S. lividans</i> TK23-pIJ702							
Medium	SM	SM	tsb	tsb	R5	R5	MG	MG
Zugabe von Medium/ 5 x Antibiotikum		+		+		+		+
Expression	w	w	w	w	s	s	nb	?

	<i>S. lividans</i> TK64-pFis-Xyl							
Medium	SM	SM	tsb	tsb	R5	R5	MG	MG
Zugabe von Medium/ 5 x Antibiotikum		+		+		+		+
Expression	nb	w	nb	nb	w	m	nb	nb

Für die Expression der Tyrosinase in *S. lividans* TK23-pIJ702 und der Catechol-2,3-dioxygenase in *S. lividans* TK64-pFis-Xyl im Flüssigmedium in 96 well Platten wurde ausschließlich R5 Medium verwendet. Das Anwachsen aller Stämme konnte, ebenso wie die Enzymexpression der transformierten Stämme, beobachtet werden. Um Vergleichswerte für Hintergrundwerte der Absorptionsmessungen zu erhalten, wurden außerdem *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK64, *S. lividans* TK23-pGM121, *S. albus* und *S. albus* G kultiviert. 72 h nach Kultivierungsbeginn erfolgte der Nachweis der Catechol-2,3-dioxygenase durch die Zugabe von 50 µl R5 Medium mit 2.5 % Catechol (0.5 % Endkonz.).

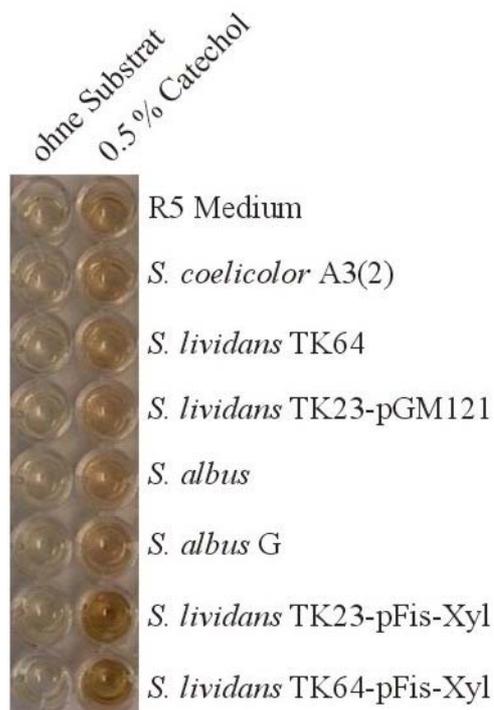


Abbildung 23: Nachweis der Catechol-2,3-dioxygenase in 96 well MTPs

Nur *S. lividans* TK23-pFis-Xyl und *S. lividans* TK64-pFis-Xyl zeigten eine eindeutige Gelbfärbung (siehe Abbildung 23), wohingegen in den übrigen Wells wahrscheinlich die oxidative Zersetzung des Mediums und des Mycels erfolgt. Der Nachweis läßt sich nach Zentrifugation (1000 g, 30 Min., RT) der MTP und ein Überführen des Überstands in eine neue MTP mittels Absorptionsmessung bei 405 nm bestätigen (siehe Abbildung 24).

Insgesamt lagen die exprimierenden Klone mit einer Absorption von etwa 1.5 doppelt so hoch wie der Hintergrund. Allerdings lag, u.a. aufgrund von Mycelresten, noch eine Schwankungsbreite von etwa 10% der Absorptionswerte vor.

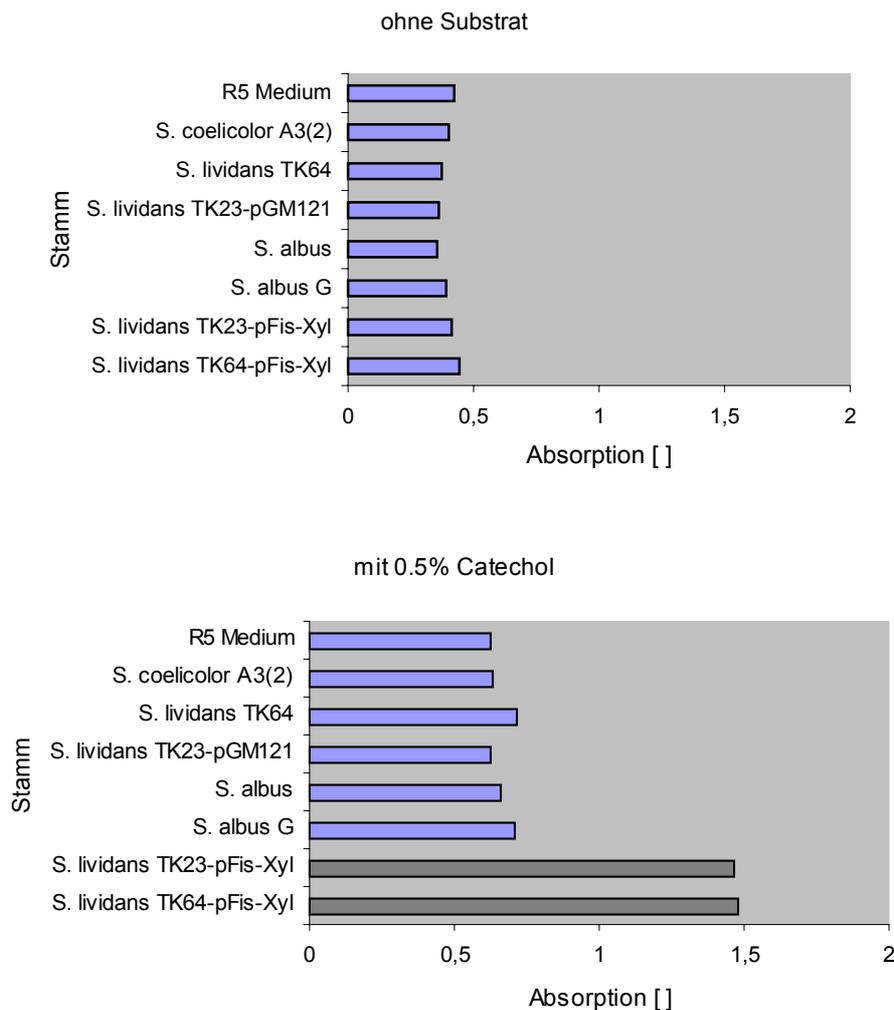


Abbildung 24: Absorptionsmessung der MTPs aus Abb. 23

Nach erfolgtem Assay auf Catechol-2,3-dioxygenase Aktivität wurde das Mycel mit Zahnstochern in 5 ml tsb Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikum) überimpft. Ein Anwachsen aller Kulturen war beobachtbar, außerdem konnte die Plasmid DNA von *S. lividans* TK23-pGM121, *S. lividans* TK23-pFis-Xyl und *S. lividans* TK64-pFis-Xyl mittels Mini-Lyse isoliert und durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Dadurch wurde sichergestellt, daß außer Kultivierung und Enzymassay in 96 well MTPs, auch die anschließende Kultivierung der Stämme und Isolierung der Plasmid DNA möglich waren.

### 3.5.4 Kultivierung und Expression im 384 well Format

Die Kultivierung von *S. lividans* TK64-pFis-Xyl und *S. lividans* TK23-pIJ702 erfolgte in 100 µl Gesamtvolumen. Vorgelegt wurden 100 µl SM, tsb, R5 oder MG Medium mit

Antibiotikum oder 80 µl Medium, in das nach 24 h weitere 20 µl Medium mit 5 x Antibiotikum gegeben wurden.

Ein Anwachsen der Stämme war in MG Medium nicht möglich, wohingegen in SM und tsb Medium ein Anwachsen in ~50 % der Fälle zu beobachten war. In R5 Medium hingegen war ein Anwachsen im Normalfall beobachtbar (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Qualitative Beobachtung der Expression der Tyrosinase in *S. lividans* TK23-pIJ702 und der Catechol-2,3-dioxygenase in *S. lividans* TK64-pFis-Xyl nach 72 h (nb- nicht beobachtbar, w- schwach, m- mittel, s- stark) in 384 well MTPs.

	<i>S. lividans</i> TK23-pIJ702							
Medium	SM	SM	tsb	tsb	R5	R5	MG	MG
Zugabe von Medium/ 5 x Antibiotikum		+		+		+		+
Anwachsen/ Expression	?	nb	?	nb	?	w	nb	nb

	<i>S. lividans</i> TK64-pFis-Xyl							
Medium	SM	SM	tsb	tsb	R5	R5	MG	MG
Zugabe von Medium/ 5 x Antibiotikum		+		+		+		+
Anwachsen/ Expression	?	nb	w	nb	w	m	nb	nb

In den mit pFis-Xyl transformierten *S. lividans* Stämmen erfolgte 72 h nach Kultivierungsbeginn der Nachweis der Catechol-2,3-dioxygenase durch die Zugabe von 20 µl R5 Medium mit 9, 6, 3 bzw. 0.6% (M/V) Catechol (Endkonzentrationen von 1.5, 1.0, 0.5 und 0.1%). *S. lividans* TK23-pFis-Xyl und *S. lividans* TK64-pFis-Xyl zeigten visuell bei niedrigen Catecholkonzentrationen eine eindeutige Gelbfärbung, wohingegen in den übrigen Fällen keine eindeutige Unterscheidungsmöglichkeit zwischen positiver Reaktion und einer Zersetzung des Mediums bzw. dessen Eigenfärbung gegeben war (siehe Abbildung 25).

Der quantitative Nachweis ließ sich nach Zentrifugation (1000 g, 45 Min., RT) der MTP und das Überführen des Überstands in eine neue MTP mittels Absorptionsmessung durchführen. Bei Catecholkonzentrationen von 1.5 bzw. 1 % war aufgrund einer zu starken oxidativen Zersetzung des Mediums kein Nachweis möglich. Erst unter 0.5 % war ein im Vgl. zum Hintergrund zunehmendes Signal der Nachweisreaktion zu bemerken (siehe Abbildung 26). Im Vergleich zum Hintergrund wurde bei der Expression der Catechol 2,3 dioxygenase in *S.*

*S. lividans* TK23-pFis-Xyl, bzw. TK64-pFis-Xyl eine durchschnittlich um den Faktor 1.4 höhere Absorption gemessen. Weiterhin exprimiert *S. lividans* TK64-pFis-Xyl das Enzym in höheren Mengen als *S. lividans* TK23-pFis-Xyl.

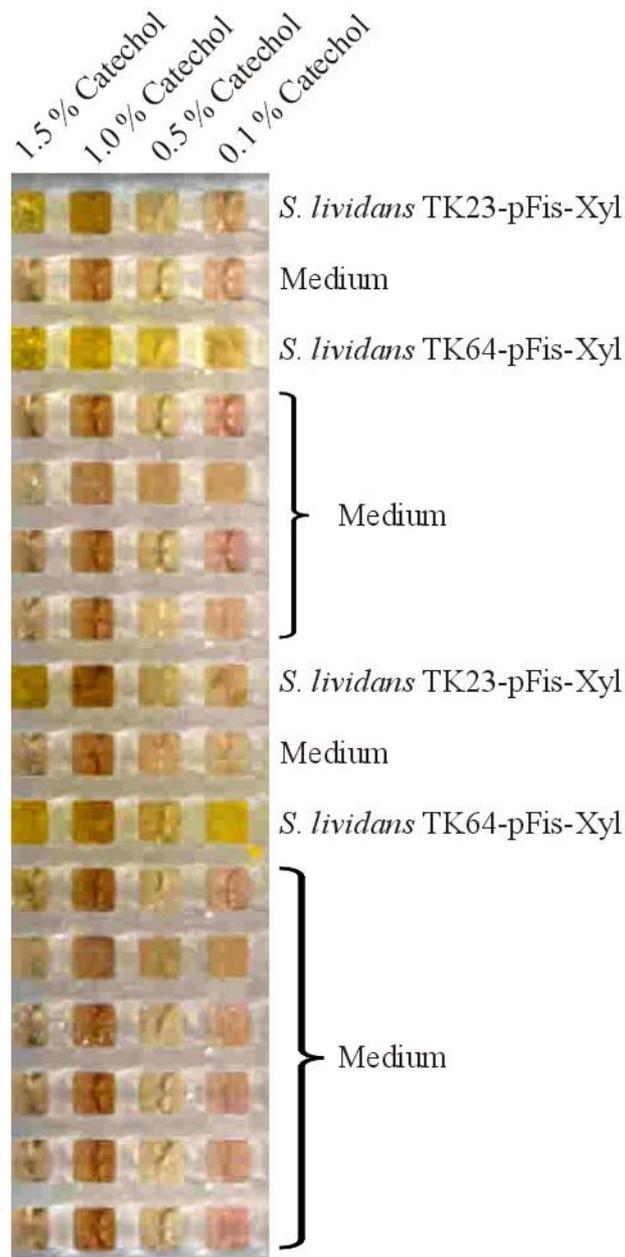
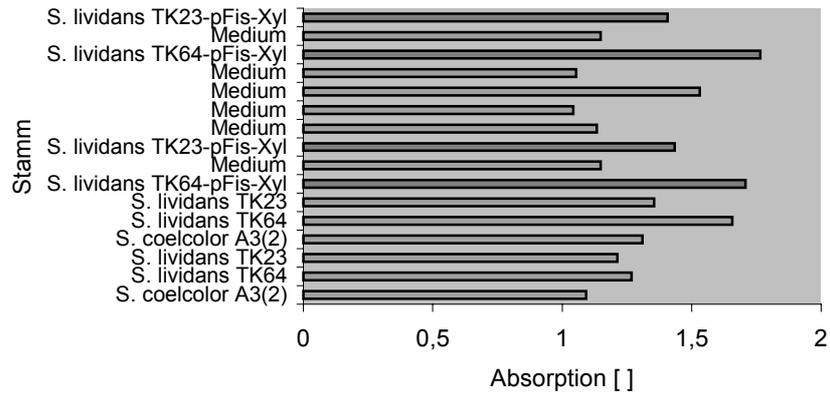
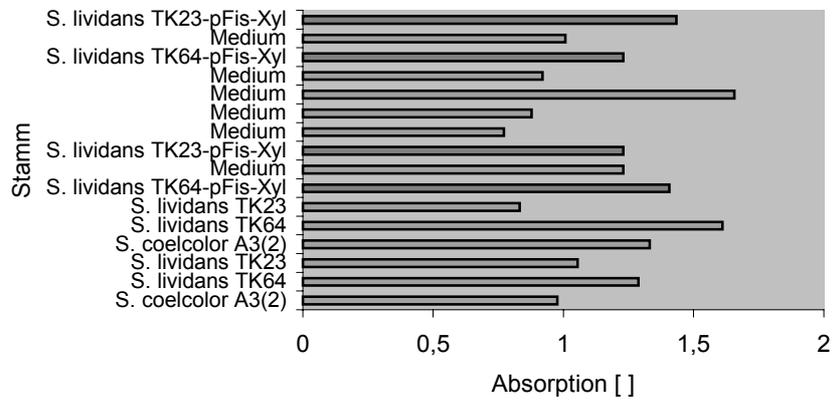


Abbildung 25: Assay mit der Catechol 2,3–dioxygenase im 384 well Format in Abhängigkeit verschiedener Catecholkonzentrationen.

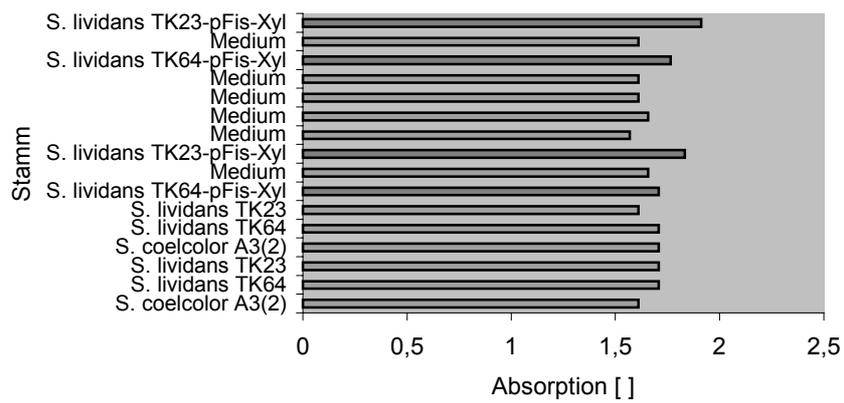
mit 1.5 % Catechol



mit 1 % Catechol



mit 0.5 % Catechol



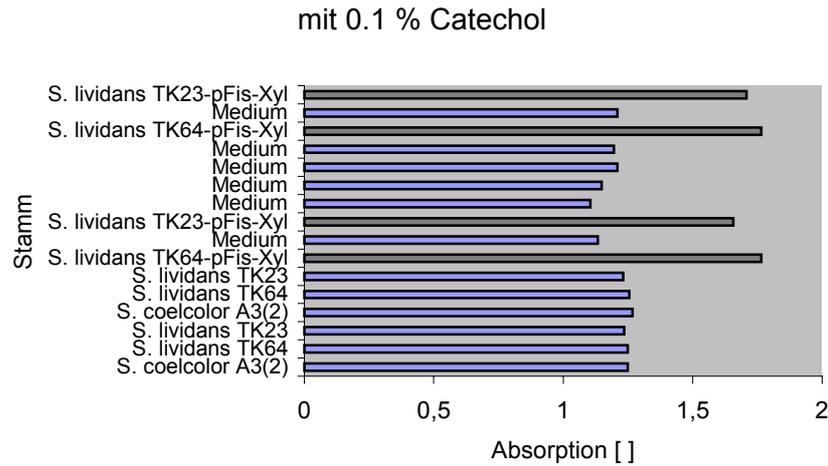


Abbildung 26: Absorptionsmessung der MTP aus Abb. 25

In einem weiteren Versuch wurden 96 wells einer 384 well Platte mit *S. lividans* TK23-pFis-Xyl und *S. lividans* TK64-pFis-Xyl beimpft. Die statistische Auswertung der Meßergebnisse mit 0.1 % Catechol zeigte bei einer Gesamtheit  $N=94$ , mit den Meßwerten  $x_1, x_2, \dots, x_N$  und dem Mittelwert  $\mu=1.63$  eine Standardabweichung  $\sigma=0.05$ . Die Bestimmung der Meßwerte einer Negativkontrolle von nicht transformiertem *S. lividans* TK23 bzw. TK64 ergab eine Standardabweichung  $\sigma=0.10$  bei der Gesamtheit  $N=92$  und dem Mittelwert  $\mu=1.21$ . Daraus ergab sich eine nicht signifikante Abweichung der jeweiligen Meßergebnisse, außerdem konnte ein Anwachsen von über 95 % der Kolonien in den wells festgestellt werden.

## 4 Diskussion

Der Einsatz von *Streptomyces* als Wirt zur Erstellung von Expressionsgenbanken ist gewissen Einschränkungen unterworfen. So sind zwar eine Reihe von Transformationsmethoden (Bibb et al. 2000) bekannt, sie erfordern jedoch durchwegs eine Optimierung auf die jeweilige Problemstellung. In diesem Zusammenhang müssen vor allem stammspezifische Eigenschaften wie die Restriktion von Fremd DNA (Flett et al. 1997) in Betracht gezogen werden. Die Auswahl eines geeigneten Expressionswirts sollte darüberhinaus die Proteaseaktivität (Brawner 1994; Binnie et al. 1997) des Stammes berücksichtigen.

Da sich molekularbiologische Arbeiten mit Streptomyceten überwiegend mit Sekundärmetaboliten, insbesondere Antibiotika, beschäftigen, wird vergleichsweise wenig über den Einsatz von *Streptomyces* als Wirt für eine heterologe Expression berichtet. Streptomyceten sind in diesem Zusammenhang vor allem aufgrund ihrer Fähigkeit zur Proteinsekretion interessant. So wurde über die erfolgreiche heterologe Expression einiger humaner Gene in *Streptomyces* in technisch durchführbarem Maßstab berichtet (Brawner 1994; Binnie et al. 1997). In *Bacillus*, als einem anderen zur Sekretion befähigten Prokaryoten, wurde eine vergleichsweise niedrige Expression erzielt.

Agarplattenassays für den Nachweis von Lipase-, Esterase- und Amylaseaktivität lassen sich auf *Streptomyces* anpassen, jedoch ist der Einsatz von anderen Methoden zum Hochdurchsatzscreening nur in eingeschränktem Umfang möglich. Zellsorter und PhageDisplay kommen nicht zum Einsatz und nur in wenigen Fällen wird die Verwendung von deepwell Mikrotiterplatten (Somers et al. 1987; Hergenrother et al. 1997; Minas et al. 2000) berichtet. Die Frage, inwiefern Streptomyceten für das Screening auf Enzymaktivität geeignet sind, läßt sich nicht beantworten. Im Vergleich scheint *E. coli* zum jetzigen Zeitpunkt der geeignetere Organismus zu sein, vor allem aufgrund der verfügbaren molekularbiologischen Kenntnisse und den weitreichenden genetischen Manipulationsmöglichkeiten. Allerdings kann eine erfolgreiche heterologe Expression von Proteinen aus Organismen mit einer anderen Codon Usage nicht abgeschätzt werden. Aus diesem Grund scheint es sinnvoll neben *E. coli* noch andere Prokaryoten mit einer deutlich abweichenden Codon Usage für die Erstellung von Expressionsgenbanken zu nutzen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Optimierung der Transformationsmethoden von *Streptomyces*, deren Anwendung in Bezug auf die Herstellung von Genbanken aus Boden DNA und der Einsatz von *Streptomyces* in Mikrotiterplatten bis zum 384 well Format

diskutiert. Außerdem wird auf die Eignung verschiedener Konstrukte zur Validierung der jeweiligen Methoden eingegangen.

#### 4.1 Optimierung der Transformation

Für die Auswahl geeigneter Stämme für die Transformation wurden neun Actinomyceten bezüglich ihres Restriktionsverhaltens gegenüber methylierter Plasmid DNA aus *E.coli* DH5 $\alpha$  getestet. Von diesen Stämmen zeigten sich insbesondere *S. lividans* TK23 und TK64 als geeignet, da kein Abbau von Plasmid DNA durch Zellysate dieser Stämme zu beobachten war. Die anderen getesteten Stämme hingegen degradierten die DNA unterschiedlich stark. Aus diesem Grund wurden die beiden *S. lividans* Stämme als Wirtsorganismen verwendet, ein weiterer Vorteil besteht in ihrer, zu anderen Streptomycceten vergleichsweise niedrigen, Proteaseaktivität (Anne & Van Mellaert 1993).

Um im Folgenden die Transformationseffizienzen bestimmen zu können, wurden Konstrukte mit verschiedenen Reporter genen erstellt und bezüglich ihrer Eignung auf eine qualitativ und quantitativ bestimmbare Expression verglichen. EGFP konnte zwar in dem halbsynthetischen R5 Medium exprimiert werden, jedoch zeigte sich die Stärke der Expression als nicht ausreichend, um einen zuverlässigen Nachweis im Fluorimeter durchzuführen. Das beruht auf einer zu starken Eigenfluoreszenz des Mediums durch aromatische Aminosäuren und einem dadurch zu starken Hintergrundrauschen. Im schwächer fluoreszierenden, synthetischen MG Medium konnte EGFP hingegen nicht exprimiert werden. Inzwischen wird in der Literatur von einem geeigneten Reportersystem mit EGFP berichtet (Sun et al. 1999). In das Gen wurden mehrere Punktmutationen eingeführt, um eine Anpassung der Codon Usage an *Streptomyces* und eine damit verbundene höhere Expression, auch im synthetischen Medium, zu erreichen.

DsRed als Alternative konnte nicht exprimiert werden. Es ist anzunehmen, daß die Schwierigkeiten im Wesentlichen auf fünf im Gen vorhandenen TTA Codons beruhen. So wird in *Streptomyces* das Leucin Codon TTA nicht in Genen vorgefunden, die für das vegetative Wachstum verantwortlich sind, sondern ausschließlich in einigen wenigen Genen, die für die Differenzierung notwendig sind (Hopwood 1988; Leskiw et al. 1991). In Folge einer ‚vorzeitigen‘ Verwendung des TTA Codons wird daher wahrscheinlich eine Stoffwechsellkaskade eingeleitet, die zu einem Wechsel von Primär- zu Sekundärmetabolismus führt. Eine mögliche Lösung hierfür besteht wie beim EGFP in der entsprechenden Anpassung der Codon Usage.

Als geeignetes Reportersystem erwiesen sich die Tyrosinase aus *S. antibioticus* und die Catechol 2,3- dioxygenase aus *P. species*. Das Tyrosinasegen liegt bereits mit einer zu *S. lividans* ähnlichen Codon Usage vor. Die Expression der aus *P. species* stammenden Catechol-2,3-dioxygenase in *S. lividans* erforderte ebenfalls keine Änderung der DNA Sequenz. In beiden Fällen liegen keine TTA Codons vor.

Im Weiteren erwies sich der Einsatz modifizierter DNA vor allem bei Stämmen mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen als notwendig. So konnte bei der Protoplastentransformation von *S. coelicolor* A3(2) nur mit nicht methylierter DNA aus *E. coli* JM110 transformiert werden. Eine zusätzliche Optimierung von  $10^3$  auf  $10^4$  cfu/  $\mu$ g DNA wurde durch Denaturierung der Plasmid DNA durch Hitze oder im Alkalischen erreicht.

Bei *S. lividans* TK23 und TK64, die keine Restriktionsenzyme produzieren, führt die Verwendung von einzelsträngiger Plasmid DNA zu geringfügig besseren Ergebnissen. Die gleichen Resultate von  $10^6$  cfu/  $\mu$ g DNA werden auch durch den gleichzeitigen Einsatz einzelsträngiger und nicht methylierter DNA erzielt. Durch Protoplastentransformation wurden damit auch die höchsten Transformationseffizienzen im Vergleich zur Elektroporation, direkten Transformation bzw. intergenerischen Konjugation erreicht.

Durch Elektroporation werden im Vergleich zur Protoplastentransformation bei *S. lividans* TK23 bzw. TK66, sowie *S. coelicolor* A3(2) und *S. venezuelae* schlechtere Transformationseffizienzen von maximal  $10^2$  cfu/  $\mu$ g DNA erhalten. Als mögliche Ursache ist das mycelartige Wachstum anzunehmen. Durch die Behandlung mit Ultraschall vor der Elektroporation kann eine teilweise Auflösung der Mycelstruktur und eine damit verbesserte Transformationseffizienz erreicht werden. Allerdings erschwert die weiterhin bestehende unregelmäßige Symmetrie des Mycels die Elektroporation im Vergleich zu den näherungsweise sphärisch wachsenden Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli* oder *Saccharomyces*. Als unwahrscheinlich ist der Einfluß des Aufbaus der Zellwand in diesem Zusammenhang zu sehen, da durch geringe Mengen an Lysozym bereits im Vorfeld der Elektroporation ein Abbau der Peptidoglycanwand erzielt werden sollte.

Um hohe Transformationseffizienzen zu erzielen erwies sich auch die direkte Transformation des Mycels als ungeeignet. Mit dieser Methode konnten nur wenige Kolonien bei dem Actinomyceten *A. mediterranei* erzielt werden. Bei *S. lividans* TK23 und TK64 wurden keine Kolonien erhalten. Es ist anzunehmen, daß die Unterschiede im Zellwandaufbau zwischen den Actinomyceten in diesem Fall, genauso wie bei der Protoplastentransformation, kein einheitliches Protokoll erlauben. Diese Methode kann nur mit hohem zeitlichen Aufwand durchgeführt werden, außerdem stellen die langen

Inkubationszeiten von über zwei Wochen nach dem Ausplattieren des Transformationsansatzes ein hohes Risiko bezüglich einer Kontamination dar.

Als letzte der getesteten Methoden ist die intergenerische Konjugation zu nennen. Ausgehend von mobilisierbaren Elementen auf Plasmiden und einem entsprechenden *E. coli* Stamm gibt es außer *Streptomyces* noch viele andere Zielorganismen darunter auch Eukaryoten für einen horizontalen oder vertikalen Gentransfer. Eine Eigenschaft, die dieses System aufgrund seiner Vielfältigen Möglichkeiten interessant erscheinen läßt, jedoch Fragen bezüglich der biologischen Sicherheit aufwirft. Mit der intergenerischen Konjugation können gute Ergebnisse bei der Transformation von *S. lividans* TK23 und TK64 von  $10^5$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA erzielt werden. Insgesamt liegen diese Ergebnisse dennoch um einen Faktor 10 niedriger als bei der Protoplastentransformation.

Durch die wesentlich einfachere Durchführung der intergenerischen Konjugation sollten höhere Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden können. Damit wäre die intergenerische Konjugation wahrscheinlich den anderen Methoden vorzuziehen. Weiterhin eröffnete sich damit außerdem eine verhältnismäßig einfache Methode zum Screening in verschiedenen Wirtsorganismen ohne zuvor Plasmide zu isolieren oder eine Umklonierung durchführen zu müssen. Im Rahmen dieser Arbeit war aus Gründen der biologischen Sicherheit die Expression der Boden DNA in diesem System nicht möglich. Daher wurde zur Transformation von *Streptomyces* die Protoplastentransformation verwendet. Abbildung 27 zeigt noch einmal zusammenfassend die mit den verschiedenen Methoden erzielten Transformationseffizienzen.

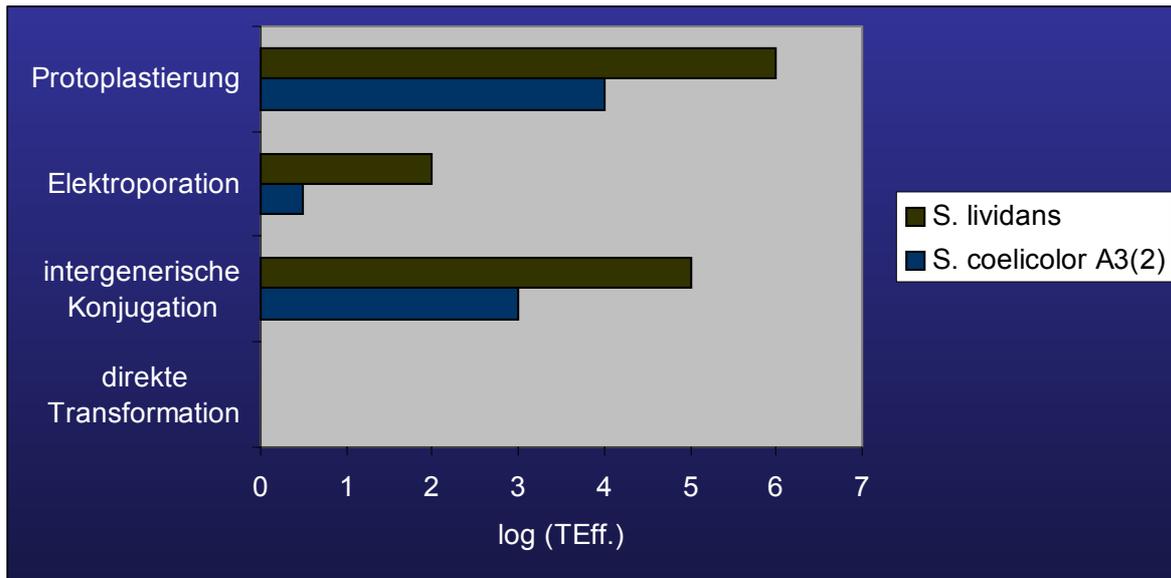


Abbildung 27: Nach Optimierung erzielte Transformationseffizienzen (TEff.) in *S. lividans* TK23, *S. lividans* TK64 und *S. coelicolor* A3(2).

#### 4.2 *E. coli* BL21-CodonPlus

Alternativ zu den schwieriger zu handhabenden Streptomyceten wurden *E. coli* BL21-CodonPlus Zellen für die Expression GC reicher DNA getestet. Durch zusätzliche Kopien der in *E. coli* seltenen argU und proL tRNA sollte laut Herstellerangaben eine bessere Expression von Enzymen aus GC reichen Organismen erzielt werden. Nach Literaturangaben wurde beispielsweise nach Expression der Malat Synthase aus *S. clavuligerus* in *E. coli* BL21-CodonPlus eine 71 fach höhere Aktivität erzielt (Chan & Sim 1998). Mit dem soyC Gen aus *S. griseus* ATCC13273 konnte in keinem der verwendeten Plasmide in *E. coli* BL21-CodonPlus eine bessere Expression als in *E. coli* DH5α erzielt werden. Als Ursache hierfür ist anzuführen, daß eine Limitierung der Expression durch diese Codons wahrscheinlich nicht auftritt. Vielmehr ist anzunehmen, daß in *Streptomyces* selten auftretende Codons wie TTT, ATT, AAA und GAT eine wichtigere Funktion bei einer Limitierung der Expression durch eine unterschiedliche Codon Usage innehaben (siehe Abbildung 5, Einleitung).

#### 4.3 Erstellung von Genbanken aus Boden DNA

Für die Aufreinigung von DNA aus Böden und deren Klonierung und Expression in *Streptomyces* bestanden die Schwierigkeiten hauptsächlich in der Herstellung einer ausreichenden Menge an DNA und deren Verunreinigungen mit Huminstoffen und

Schwermetallen. Da vor allem der Gehalt an Huminstoffen die Spaltung der DNA mit einem Restriktionsenzym in erheblichem Umfang störte, mußte eine zumindest teilweise Entfernung oder Inaktivierung der Huminstoffe stattfinden. Dies wurde einerseits durch die Aufreinigung der DNA mit verschiedenen kommerziellen Kits, andererseits auch durch den Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA) zu dem Spaltungsansatz erreicht. Die Funktion des BSA ist nicht geklärt. Es kann vermutet werden, daß im Überschuß eingesetztes BSA einen Großteil der Huminstoffe „abfängt“ und bindet und somit als Stabilisator für das Restriktionsenzym fungiert.

Eine quantitative Bestimmung der Verunreinigungen war aus zwei Gründen nicht möglich. Zum Einen wurden insgesamt zu geringe Mengen an DNA erhalten, um selbst mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) eine umfassende Analyse zu bewerkstelligen, zum Anderen zeigte sich bereits bei verschiedenen Spaltungsansätzen, daß keine einheitliche Qualität bezüglich der Reinheit der DNA erzielt werden konnte. So erwies sich die aufgereinigte DNA in manchen Fällen als nicht spaltbar, in anderen Fällen konnte nach anschließender Ligation und Transformation bis zu 60 Kolonien pro Agarplatte erzielt werden.

Die Größe der aufgereinigten DNA lag im Bereich von etwa 15 bis 40 kb. Spaltungen der Boden DNA wurden bis zu durchschnittlichen Fragmentgrößen von 5 kb durchgeführt. Eine Aussage zu treffen, wieviele Kolonien gescreent werden müssen, um eine Aktivität nachzuweisen, ist nicht möglich. So stellt sich in diesem Zusammenhang beispielsweise die Frage, ob ein Gen unter Kontrolle des eigenen Promotors oder des Promotors des verwendeten Plasmids exprimiert wird. Die Informationen hierzu sind noch nicht vollständig. So zeigt beispielsweise eine Untersuchung von 139 für *Streptomyces* geeigneten Promotoren, daß etwa 20% davon aufgrund einer ausreichenden Sequenzhomologie in der -10 und/ oder -35 Region ebenfalls für den Einsatz in *E. coli* geeignet sind (Strohl 1992). Somit stellt sich die Frage, ob nicht ebenso Promotoren aus anderen Organismen in *Streptomyces* in einem ähnlich geringen Umfang erkannt werden. Eine weitere hierbei nicht berücksichtigte Größe ist der Einfluß der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA Polymerase (Gourse et al. 2000).

Als schwierig erwies sich die Ligation und Transformation mit ausreichender Effizienz in die, im Vergleich zu *E. coli*, großen Plasmide zur Expression in *Streptomyces*. Aus diesem Grund wurde der *E. coli* Anteil eines *E. coli* *Streptomyces* Shuttlevektors deletiert und der ‚*Streptomyces*-Anteil‘ verwendet. In dieses Konstrukt (pEBO2') wurde im Folgenden auch bevorzugt kloniert, da eine höhere Zahl an Kolonien erhalten wurde.

Zur Spaltung der aufgereinigten DNA wurden mehrere Restriktionsenzyme ausgetestet, von denen sich *Bgl*III und *Dra*III als geeignet erwiesen. Einerseits wurden Spaltungsreaktionen im Vergleich zu mit anderen Restriktionsenzymen (*Sau*3AI, *Sac*I, *Nco*I und *Xba*I) durchgeführten, in geringerem Ausmaß durch die Qualität der Boden DNA beeinflusst, so daß im Allgemeinen höhere Kolonienzahlen nach Ligation und Transformation der Boden DNA erzielt wurden. Andererseits schneidet *Bgl*III bevorzugt GC- arme DNA, so daß GC- reiche DNA in größeren Fragmenten für die Ligation und Transformation vorliegt. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit ein GC-reiches Gen aus der Boden DNA durch das komplett zu klonieren.

#### 4.4 Screening der Genbanken auf Enzymaktivität

Das Screening auf Lipase- und Esteraseaktivität erfolgte durch ein Übersichten der Kolonien mit tributyrinhaltigem Agar, so daß bei einer Expression klare Halos zu beobachten sind. Als möglicherweise problematisch erwiesen sich hierbei die genomisch kodierten Lipasen und Esterasen der verwendeten *Streptomyces* Stämme, deren Nachweis nach fünf bis sechs Tagen erfolgte, zu einem Zeitpunkt in dem das Mycel Lufthyphen ausgebildet hatte und schwach sporulierte. Zum Vergleich wurde die BTL2 Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* unter Kontrolle des *aph* Promotors exprimiert. In diesem Fall wurden bereits nach zwei bis drei Tagen Halos ausgebildet. Daher wurde vermutet, daß die Expression von stammkodierten Lipasen erst in der späten Wachstumsphase erfolgt, so daß ein Screening klonierter Lipasen aus Boden DNA in der frühen bis mittleren Wachstumsphase durchgeführt werden kann. Voraussetzung hierfür ist, daß klonierte Enzyme nicht zu spät exprimiert werden. Diese Bedingung sollte in jedem Fall erfüllt sein, wenn das klonierte Enzym ebenfalls unter Kontrolle des *aph* Promotors steht. Im Fall der Expression unter Kontrolle des eigenen Promotors stellt sich die Frage, ob der Promotor von dem Streptomyceten erkannt wird und ob möglicherweise Wechselwirkungen mit anderen Stoffwechselprodukten auftreten.

Insgesamt wurden unter 18500 gescreenten Kolonien keine Lipase oder Esterase gefunden. Ursache hierfür ist vor allem eine wahrscheinlich zu niedrige Zahl gescreenter Kolonien. In der Literatur existieren Beispiele für Genbanken aus Boden DNA, die in *E. coli* erstellt wurden. In einem Fall wurden drei neue Lipasen in 286000 gescreenten Kolonien gefunden (Henne et al. 2000). In einer anderen Veröffentlichung wurde das Screening mit Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) beschrieben, wobei in insgesamt etwa 100 Mbp nach Expression unter anderem zwei Lipasen und acht Amylasen gefunden wurden (Rondon

et al. 2000), wobei nicht bekannt ist, ob es sich dabei um neue Enzyme handelt. Bislang sind noch keine Veröffentlichungen zu der Erstellung von Genbanken aus Boden DNA in *Streptomyces* bekannt.

Um das Screening mit Boden DNA zu evaluieren, wurde außerdem die Bodenprobe mit plasmidisch vorliegender BTL2 DNA versetzt und einem Partialverdau unterworfen. Aus 2200 gescreenten Kolonien wurde ein positiver Treffer erhalten. Der gleiche Test wurde außerdem mit der Catechol-2,3-dioxygenase durchgeführt. Hier wurden zwei positive unter 3000 gescreenten Kolonien erhalten. Dies zeigt, daß es prinzipiell möglich ist DNA in der Bodenprobe durch ein Screening wiederzufinden, obwohl bei Verwendung des Plasmids mit BTL2 DNA das Restriktionsenzym mehrfach innerhalb des Gens schneiden kann. Allerdings wurden mit 10 bzw. 12 µg Plasmid DNA verhältnismäßig hohe Mengen an DNA zugegeben (etwa  $10^{13}$  Kopien auf 0.5 g Bodenprobe) und in beiden Fällen mußten mehrere Tausend Kolonien gescreent werden, um einen Treffer zu erzielen. Es kann angenommen werden, daß die Restriktion der Boden DNA bzw. deren Abbau durch DNasen unter Umständen eine wesentliche Rolle spielt, da in Boden DNA weitaus weniger Kopien eines bestimmten Gens vorliegen. Somit müssen wesentlich höhere Klonzahlen gescreent werden, um einen Treffer zu erzielen.

Weiterhin wurden Versuche zur Etablierung von Amylase Assays mit *Streptomyces* unternommen. Von Vorteil ist, daß die für das Screening verwendeten Stämme keine Amylaseaktivität auf Plattenassays zeigen. Dieser Befund konnte mit Daten aus dem *S. coelicolor* A3(2) Genomprojekt bestätigt werden. Um die Screeningmethode auszutesten, wurde die  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) in *Streptomyces* kloniert und exprimiert. Damit liegt ein Plattenassay vor, der auch das Screening nach neuen  $\alpha$ -Amylasen aus Bodenproben ermöglicht.

#### 4.5 Wachstum von *Streptomyces* in Mikrotiterplatten

Bei der Anzucht von *Streptomyces* in Mikrotiterplatten im 24er und 64er Format wurden innerhalb eines „well wenige Mycelkumpen mit einem vergleichsweise großen Durchmesser von einem bis zwei Millimetern erhalten. Daher gestaltete sich einerseits die Zentrifugation des Mycels als unmöglich, erst durch den Einsatz von Filterplatten konnte eine Trennung von Mycel und Überstand erreicht werden. Andererseits wurde die Durchführung von Enzymassays erschwert, da aufgrund der geringen Zelloberfläche weniger Proteine pro Zeiteinheit in das Medium sekretiert werden.

Aus Gründen der Morphologie von *Streptomyces*, die ein Wachstum auf einer festen Matrix im Vergleich zu Flüssigkulturen begünstigt, wurde für das Wachstum im 96er Format ein Festmedium ausgewählt. Die Auswertung der Assays auf Catechol-2,3-dioxygenaseaktivität zeigte sich als reproduzierbar. Sowohl der Hintergrund der Messungen, als auch Fehlfärbungen durch oxidative Zersetzung des Mediums durch das Substrat waren visuell bestimmbar. Erforderlich war nur die jeweilige Bestimmung der optimalen Substratmenge (Catechol) für das Volumen, in dem die Nachweisreaktion durchgeführt wurde. Problematisch ist die quantitative Durchführung des Assays auf Festmedium. Mit einer CCD Kamera unter gleichen Bedingungen aufgenommene Bilder hoher Auflösung, sollten jedoch durch Bestimmung des jeweiligen Gelbanteils eines „well“ quantitative Resultate liefern. Eine Abgleichung unterschiedlicher Platten könnte durch eine Kalibrierung auf Blindproben und Positivkontrollen erfolgen. Somit wären Farbassays auf Festmedien quantitativ durchführbar.

Bei der Anzucht von Streptomycceten im 96er Format in Flüssigmedium zeigten sich erstmalig nicht Medien für die Kultivierung geeignet. So war das Anwachsen der Stämme im synthetischen MG Medium nicht möglich und auf dem komplexen tsb Medium und SojaMalz Medium wurde ein nicht gleichmäßiges Anwachsen der Zellen festgestellt. Das halbsynthetische R5 Medium bot interessanterweise optimale Bedingungen für die Kultivierung. Weiterhin wurde festgestellt, daß eine Kultivierung mit Antibiotika zur Selektion am Besten durch getrennte Zugabe, frühestens 24 Stunden nach Kultivierungsbeginn, erfolgte. Daraus lassen sich Stressbedingungen der Zellen in den ersten Stunden der Kultivierung und Adaption an die Umgebung ableiten. Weiterhin ließ sich vier Tage nach Kultivierungsbeginn im 96er Format eine höhere Zellmasse pro Volumeneinheit feststellen als im 64er und 24er Format. Ursache hierfür ist unter Umständen die größere Innenfläche eines „wells“, die bessere Kultivierungsbedingungen für die Streptomycceten bietet. Aufgrund der Ausbildung von Mycel mit geringerem Durchmesser im 96er Format sind zur Abtrennung von Mycel und Überstand zwar immer noch Filtrationsplatten vorzuziehen, alternativ ist jedoch auch eine Zentrifugation von 45 Minuten möglich. Es zeigte sich, daß der Nachweis auf Catechol 2,3- dioxygenase Aktivität visuell eindeutig durchführbar war, außerdem war die quantitative Bestimmung möglich. Etwa zweifach höhere Absorptionswerte der positiven Werte gegenüber den negativen und Absorptionswerte mit nur geringen Schwankungen der positiven bzw. der negativen Werte, resultierten in einem quantitativ durchführbaren Assay.

Aufgrund der Resultate in 96er Mikrotiterplatten wurde darüberhinaus noch die Kulivierung im 384er Format durchgeführt. Hier zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit von der Wahl des Mediums. In den verwendeten komplexen Medien war ein Anwachsen der Streptomyceten nur noch in etwa 50 Prozent der Fälle zu beobachten. Mit dem halbsynthetischen R5 Medium gelang die Kultivierung in über 95 Prozent der Fälle. Eine Erklärung hierfür bietet der Einsatz von R5 Agarplatten für die Regeneration von Protoplasten bei der Protoplastentransformation. Das R5 Medium bietet den Zellen einen optimalen pH und optimale Salzkonzentrationen zur Regeneration. Daher kann man annehmen, daß durch die mechanischen Belastungen, die für Streptomyceten bei einer Kultivierung in Mikrotiterplatten entstehen, ähnliche Streßbedingungen für das Mycel vorliegen, wie bei der Protoplastentransformation. In diesem Zusammenhang wurde auch das Ablegen der Wildtypzellen in der Mikrotiterplatte mit einem Pickroboter getestet. Für die Qualität des Beimpfens eines „well“ zeigte sich der Roboter geeigneter als eine manuelle Durchführung. Es scheint, daß an der Metallnadel des Roboters definiertere Mengen an Mycel haften, als auf der rauhen Oberfläche von Zahnstochern. Die unregelmäßige Wachstumsform der Kolonien erwies sich beim „Picken“ der Kolonien mit dem Pickroboter als hinderlich. Die Bilderkennungssoftware benötigt für die Identifizierung eine runde Form und einen bestimmten Durchmesser der Kolonie. Dadurch soll gewährleistet werden, daß bereits zusammengewachsene Kolonien nicht mehr gepickt werden. Als bester Zeitpunkt für das „Picken“ einzelner Streptomycetenkolonien erwies sich das „Durchwachsen“ durch die Weichagarschicht bei der Protoplastentransformation. Hierbei haben die Kolonien noch am ehesten eine symmetrische, runde Form. Allerdings wurden auch hier maximal die Hälfte der Kolonien erkannt.

Der Assay auf die Catechol-2,3-dioxygenase ließ sich im 384er Format visuell nicht mehr eindeutig durchführen, da die Oxidation des Mediums durch das Catechol zu einer starken Fehlfärbung führte. Im Vergleich zur Kultivierung im 96er Format wurde eine größere Abhängigkeit von der optimalen Substratkonzentration festgestellt. Ein eindeutiger Nachweis konnte mittels Absorptionsmessungen geführt werden. Bei niedrigen Catecholkonzentrationen wurde eine ausreichend hohe Differenz zwischen positiven und negativen Werten festgestellt. Die Standardabweichung positiver Werte betrug fünf Prozent, diejenige der negativen Werte zehn Prozent. Somit ließ sich der Assay auch im 384er Format mit hoher Genauigkeit quantitativ durchführen.

Bei den Messungen der Catechol-2,3-dioxygenase wurde außerdem eine unterschiedlich starke Expression in Abhängigkeit des verwendeten Stammes festgestellt. Ein Vergleich der

Absorptionswerte aus 96 und 384 „well“ Mikrotiterplatten in Abbildung 29 zeigt, daß *S. lividans* TK64 in der Lage ist, in Abhängigkeit von der Mikrotiterplatte und des Mediums, zwischen zehn und vierzig Prozent mehr Enzyms zu exprimieren als *S. lividans* TK23.

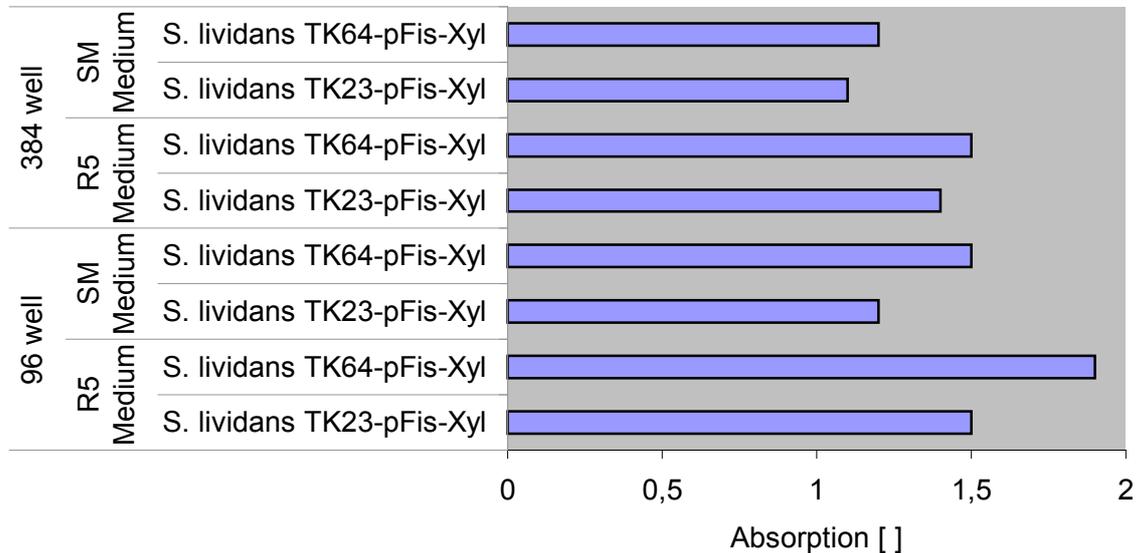


Abbildung 28: Hintergrund der Absorptionsmessungen im 96 und 384 well Format. Der Hintergrund wird definiert als Quotient der Absorption des Stammes mit Plasmid und die Absorption des plasmidfreien Stammes.

Es kann angenommen werden, daß ebenso andere farbstoffabhängige Assaysysteme in *Streptomyces* in ähnlicher Genauigkeit quantitativ durchgeführt werden können. Somit ist die Übertragung von Standard- Mikrotiterplattenassays auf *Streptomyces*, die Durchführung betreffend, prinzipiell möglich.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Genbanken aus Boden DNA in *Streptomyces* erstellt und auf Enzymaktivität gescreent werden. In diesem Zusammenhang wurden anfänglich mehrere Reportergene in *Streptomyces* exprimiert und verschiedene Methoden zur Transformation von *Streptomyces* im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit und Effizienz getestet und optimiert. Als geeignetste Transformationsmethode erwies sich die Protoplastentransformation. Mit dieser Methode konnten Transformationseffizienzen von  $10^6$  cfu/  $\mu\text{g}$  DNA in *Streptomyces lividans* erzielt werden und damit ausreichende Werte für die Herstellung von Genbanken erhalten werden. Nach Aufreinigung genomischer DNA aus Böden wurde eine mehr als 18500 Klone umfassende Genbank in *Streptomyces lividans* erstellt und auf Lipase- bzw. Esteraseaktivität getestet. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Gene für die Catechol-2,3-dioxygenase und die BTL2- Lipase, die in verschiedenen Schritten der Aufreinigungsprozedur von Boden-DNA eingebracht wurden, in einem anschließenden Screening aufgefunden werden können. Durch das Wiederfinden dieser Gene wurde die Durchführbarkeit dieser Methoden demonstriert. So konnte die Catechol-2,3-dioxygenase in einem von 2200 gescreenten Kolonien und die BTL2- Lipase in zwei von 3000 gescreenten Kolonien nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde auf den Einsatz von Streptomyceten in verschiedenen Assaysystemen hingearbeitet, die eine Verwendung von Mikrotiterplatten zum Hochdurchsatz Screening erfordern. Es konnte gezeigt werden, daß Mikrotiterplatten im 96er und 384er Format, sowohl bei Verwendung des halbsynthetischen R5 Mediums für die Kultivierung von *Streptomyces*, als auch für die qualitative und quantitative Durchführung von Farbassays im Kulturüberstand geeignet sind.

## 6 Literatur

- Aharonowitz, Y. and Friedrich, C. G. (1980). "Alanine dehydrogenase of the beta-lactam antibiotic producer *Streptomyces clavuligerus*." Arch Microbiol **125**(1-2): 137-42.
- Ahmad, S., Selvapandiyan, A. and Bhatnagar, R. K. (1999). "A protein-based phylogenetic tree for gram-positive bacteria derived from hrcA, a unique heat-shock regulatory gene." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 4**: 1387-94.
- Aidoo, D. A., Barrett, K. and Vining, L. C. (1990). "Plasmid transformation of *Streptomyces venezuelae*: modified procedures used to introduce the gene(s) for p-aminobenzoate synthase." J Gen Microbiol **136**(Pt 4): 657-62.
- Altenbuchner, J. "persönliche Mitteilung." Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart.
- Alvarez, M. A., Chater, K. F. and Rodicio, M. R. (1993). "Complex transcription of an operon encoding the Sall restriction- modification system of *Streptomyces albus* G." Mol Microbiol **8**(2): 243-52.
- Anne, J. and Van Mellaert, L. (1993). "*Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production." FEMS Microbiol Lett **114**(2): 121-8.
- Ano, T. and Shoda, M. (1992). "Ultra-rapid transformation of *Escherichia coli* by an alkali cation." Biosci Biotechnol Biochem **56**(9): 1505.
- Arai, K. (2001). "[Assay in high throughput screening]." Nippon Yakurigaku Zasshi **118**(2): 81-8.
- Baltz, R. H. (1998). "Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*." Trends Microbiol **6**(2): 76-83.

- Basgaran, V., Hardisson, C. and Brana, A. F. (1989). "Isolation and characterization of nitrogen-deregulated mutants of *Streptomyces clavuligerus*." J Gen Microbiol **135**(Pt 9): 2475-82.
- Behrmann, I., Hillemann, D., Puhler, A., Strauch, E. and Wohlleben, W. (1990). "Overexpression of a *Streptomyces viridochromogenes* gene (glnII) encoding a glutamine synthetase similar to those of eucaryotes confers resistance against the antibiotic phosphinothricyl-alanyl-alanine." J Bacteriol **172**(9): 5326-34.
- Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C. and Verger, R. (2000). "Methods for lipase detection and assay: a critical review." Eur. J. Lipid Sci. Technol.: 133-153.
- Beppu, T. and Horinouchi, S. (1991). "Molecular mechanisms of the A-factor-dependent control of secondary metabolism in *Streptomyces*." Planta Med **57**(7): S44-7.
- Bessler, C. "persönliche Mitteilung." Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart.
- Bibb, M. (1996). "1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Microbiology **142**(Pt 6): 1335-44.
- Bibb, M. J., Findlay, P. R. and Johnson, M. W. (1984). "The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein- coding sequences." Gene **30**(1-3): 157-66.
- Bibb, M. J., Molle, V. and Buttner, M. J. (2000). "sigma(BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *streptomyces coelicolor* A3(2) [In Process Citation]." J Bacteriol **182**(16): 4606-16.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E. T., Rao, R. N. and Schoner, B. E. (1992). "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces spp.*" Gene **116**(1): 43-9.
- Binnie, C., Cossar, J. D. and Stewart, D. I. (1997). "Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*." Trends Biotechnol **15**(8): 315-20.

- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Brawner, M. E. (1994). "Advances in heterologous gene expression by *Streptomyces*." Current opinion in biotechnology **5**(5): 475-481.
- Bull, A. T., Goodfellow, M. and Slater, J. H. (1992). "Biodiversity as a source of innovation in biotechnology." Annu. Rev. Microbiol. **46**: 219- 252.
- Chan, M. and Sim, T.-S. (1998). "Malate synthase from *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585: cloning, molecular characterization and its control by acetate." Microbiology **144**: 3229-3237.
- Chatterjee, D. (1997). "The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action." Curr Opin Chem Biol **1**(4): 579-88.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. and Miller, R. H. (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-5.
- Cochrane, V. W. (1996). "Physiology of actinomycetes." Ann. Rev. Microbiol **15**: 1-26.
- Cortes, J., Liras, P., Castro, J. M. and Martin, J. F. (1986). "Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* is exerted on the formation of alpha-aminoadipyl-cysteinyl- valine and deacetoxycephalosporin C synthase." J Gen Microbiol **132**(Pt 7): 1805-14.
- Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P. and Simonet, P. (2001). "Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation." Environmental Microbiology **3**(7): 431-439.

- Coutinho, H. L., De Oliveira, V. M., Manfio, G. P. and Rosado, A. S. (1999). "Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations." An Acad Bras Cienc **71**(3): 491-503.
- Cruz, H., Perez, C., Wellington, E., Castro, C. and Servin-Gonzalez, L. (1994). "Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family." Gene **144**(1): 141-2.
- Davis, N. K. and Chater, K. F. (1992). "The *Streptomyces coelicolor* whiB gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation." Mol Gen Genet **232**(3): 351-8.
- Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T. and Streit, W. R. (2001). "Direct Cloning from Enrichment Cultures, a Reliable Strategy for Isoation of Complete Operons and Genes from Microbial Consortia." Appl Environ Microbiol **67**(1): 89-99.
- Flett, F., Mersinias, V. and Smith, C. P. (1997). "High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes." FEMS Microbiol Lett **155**(2): 223-9.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. and Jurtshuk, P., Jr. (1992). "How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity." Int J Syst Bacteriol **42**(1): 166-70.
- Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F. and Kluepfel, D. (1995). "Production and secretion of proteins by streptomycetes." Crit Rev Biotechnol **15**(1): 13-39.
- Goodfellow, M. (1989). "Suprageneric classification of actinomycetes." Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; Williams and Wilkins, Baltimore **4**: 2333-2339.
- Goodfellow, M., Mordarski, M. and Williams, S. T. (1984). "The Biology of the Actinomycetes." Academic Press, London.

- Götz, J. "persönliche Mitteilung." Fakultät für Biologie, Lehrstuhl Mikrobiologie/Biotechnologie; Universität Tübingen.
- Gourse, R. L., Ross, W. and Gaal, T. (2000). "UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promotor recognition." Molecular Microbiology **37**(4): 687- 695.
- Gusek, T. W. and Kinsella, J. E. (1992). "Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning." Crit Rev Microbiol **18**(4): 247-60.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R. A. and Gottschalk, G. (1999). "Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4- hydroxybutyrate." Appl Environ Microbiol **65**(9): 3901-7.
- Henne, A., Schmitz, R. A., Bomeke, M., Gottschalk, G. and Daniel, R. (2000). "Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **66**(7): 3113-6.
- Hergenrother, P. J., Haas, M. K. and Martin, S. F. (1997). "Chromogenic assay for phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus*: application to the evaluation of substrate analogs." Lipids **32**(7): 783-8.
- Hood, D. W., Heidstra, R., Swoboda, U. K. and Hodgson, D. A. (1992). "Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism--a review." Gene **115**(1-2): 5-12.
- Hopwood, D. A. (1988). "The Leeuwenhoek lecture, 1987. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production." Proc R Soc Lond B Biol Sci **235**(1279): 121-38.

- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F. and Kieser, T. (1987). "Plasmid and phage vectors for gene cloning and analysis in *Streptomyces*." Methods Enzymol **153**: 116-66.
- Hopwood, D. A., Kieser, T., Wright, H. M. and Bibb, M. J. (1983). "Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66." J Gen Microbiol **129**(Pt 7): 2257-69.
- Horinouchi, S. and Beppu, T. (1992). "Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*: A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system." Gene **115**(1-2): 167-72.
- Hutchinson, C. R., Decker, H., Madduri, K., Otten, S. L. and Tang, L. (1993). "Genetic control of polyketide biosynthesis in the genus *Streptomyces*." Antonie Van Leeuwenhoek **64**(2): 165-76.
- Isogai, T., Takahashi, H. and Saito, H. (1981). "Polyethylenglycol-induced transformation of *Streptomyces* Protoplasts by chromosomal DNA." J Gen Appl Microbiol **27**: 431-433.
- Katz, E., Thompson, C. J. and Hopwood, D. A. (1983). "Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*." J Gen Microbiol **129**(Pt 9): 2703-14.
- Kelemen, G. H., Brian, P., Flardh, K., Chamberlin, L., Chater, K. F. and Buttner, M. J. (1998). "Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)." J Bacteriol **180**(9): 2515-21.
- Kelemen, G. H., Brown, G. L., Kormanec, J., Potuckova, L., Chater, K. F. and Buttner, M. J. (1996). "The positions of the sigma-factor genes, *whiG* and *sigF*, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Mol Microbiol **21**(3): 593-603.
- Kinashi, H., Shimaji-Murayama, M. and Hanafusa, T. (1992). "Integration of SCP1, a giant linear plasmid, into the *Streptomyces coelicolor* chromosome." Gene **115**(1-2): 35-41.

- King, A. A. and Chater, K. F. (1986). "The expression of the *Escherichia coli* lacZ gene in *Streptomyces*." J Gen Microbiol **132**(Pt 6): 1739-52.
- Kutchma, A. J., Roberts, M. A., Knaebel, D. B. and Crawford, D. L. (1998). "Small-scale isolation of genomic DNA from *Streptomyces* mycelia or spores." Biotechniques **24**(3): 452-6.
- Labes, G., Bibb, M. and Wohlleben, W. (1997). "Isolation and characterization of a strong promoter element from the *Streptomyces ghanaensis* phage I19 using the gentamicin resistance gene (aacC1) of Tn 1696 as reporter." Microbiology **143**(Pt 5): 1503-12.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Lammertyn, E., Van Mellaert, L., Bijnens, A. P., Joris, B. and Anne, J. (1996). "Codon adjustment to maximise heterologous gene expression in *Streptomyces lividans* can lead to decreased mRNA stability and protein yield." Mol Gen Genet **250**(2): 223-9.
- Lechevalier, M. P., Prauser, H., Labeda, D. P. and Ruan, J.-S. (1986). "Two New Genera of Nocardiaform Actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov." Int. J. of Systematic Bacteriol. **Jan.**: 29-37.
- Leskiw, B. K., Bibb, M. J. and Chater, K. F. (1991). "The use of a rare codon specifically during development?" Mol Microbiol **5**(12): 2861-7.
- Leskiw, B. K., Mah, R., Lawlor, E. J. and Chater, K. F. (1993). "Accumulation of bldA-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Bacteriol **175**(7): 1995-2005.
- Lutz- Wahl, S. (1999). "Dissertation." Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart.

- Madon, J. and Hutter, R. (1991). "Transformation system for *Amycolatopsis* (*Nocardia*) *mediterranei*: direct transformation of mycelium with plasmid DNA." J Bacteriol **173**(20): 6325-31.
- Martin, J. F. (1992). "Clusters of genes for the biosynthesis of antibiotics: regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals." J Ind Microbiol **9**(2): 73-90.
- Mehling, A., Wehmeier, U. F. and Piepersberg, W. (1995). "Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR." Microbiology **141**(Pt 9): 2139-47.
- Minas, W., Bailey, J. E. and Duetz, W. (2000). "Streptomycetes in micro-cultures: growth, production of secondary metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format." Antonie Van Leeuwenhoek **78**(3-4): 297-305.
- Missiakas, D. and Raina, S. (1998). "The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation." Mol Microbiol **28**(6): 1059-66.
- Molle, V., Palframan, W. J., Findlay, K. C. and Buttner, M. J. (2000). "WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Bacteriol **182**(5): 1286-95.
- Moreau, A., Duez, C. and Dusart, J. (1994). "Improvement of GC-rich template amplification by inverse PCR [published erratum appears in Biotechniques 1994 Oct;17(4):684]." Biotechniques **17**(2): 232-4.
- Morosoli, R., Shareck, F. and Kluepfel, D. (1997). "Protein secretion in streptomycetes." FEMS Microbiol Lett **146**(2): 167-74.
- Motamedi, H., Shafiee, A. and Cai, S. J. (1995). "Integrative vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces spp.*" Gene **160**(1): 25-31.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51**(Pt 1): 263-73.
- Muth, G. "persönliche Mitteilung." Fakultät für Biologie, Lehrstuhl Mikrobiologie/Biotechnologie; Universität Tübingen.
- Muth, G., Nußbaumer, B., Wohlleben, W. and Pühler, A. (1989). "A vector system with temperature -sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes." Mol Gen Genet **219**: 341-348.
- Olsen, G. J. and Woese, C. R. (1993). "Ribosomal RNA: a key to phylogeny." Faseb J **7**(1): 113-23.
- Omura, T. and Sato, R. J. (1964). "The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes." J.Biol.Chem. **239**: 2370-2378.
- Ovreas, L., Jensen, S., Daae, F. L. and Torsvik, V. (1998). "Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches." Appl Environ Microbiol **64**(7): 2739-42.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D. and Mohan, R. (2000). "Advances in microbial Amylases." Biotechnol. Appl. Biochem. **31**: 135-152.
- Pelletier, I., Pfeifer, O., Altenbuchner, J. and van Pee, K. H. (1994). "Cloning of a second non-haem bromoperoxidase gene from *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762: sequence analysis, expression in *Streptomyces lividans* and enzyme purification." Microbiology **140**(Pt 3): 509-16.
- Petit, J. F. (1978). "[Chemical structure of mycobacterial cell wall]." Ann Microbiol (Paris) **129**(1): 39-48.

- Pigac, J. and Schrepf, H. (1994). "A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other Streptomyces by electroporation." Applied and Environmental Microbiology **61**(1): 352-356.
- Porteous, L. A., Armstrong, J. L., Seidler, R. J. and Watrud, L. S. (1994). "An effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis." Curr Microbiol **29**(5): 301-7.
- Pridmore, R. D. (1987). "New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker." Gene **56**(2-3): 309-12.
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. and Hopwood, D. A. (1996). "A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome." Mol Microbiol **21**(1): 77-96.
- Rogers, H. J. (1974). "Peptidoglycans (mucopolysaccharides): structure, function, and variations." Ann N Y Acad Sci **235**(0): 29-51.
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J. and Goodman, R. M. (2000). "Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms [In Process Citation]." Appl Environ Microbiol **66**(6): 2541-7.
- Rudd, B. A. and Hopwood, D. A. (1979). "Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Gen Microbiol **114**(1): 35-43.
- Sabater, B., Sebastian, J. and Asensio, C. (1972). "Identification and properties of an inducible mannokinase from *Streptomyces violaceoruber*." Biochim Biophys Acta **284**(2): 406-13.

- Salas, J. A., Quiros, L. M. and Hardisson, C. (1984). "Pathways of glucose catabolism during germination of *streptomyces* spores." FEMS Microbiol. Lett. **25**: 229-233.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (NY: Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor).".
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Santosa, D. A. (2001). "Rapid extraction and purification of environmental DNA for molecular cloning applications and molecular diversity studies." Mol Biotechnol **17**(1): 59-64.
- Sathyamoorthy, M., Stemke, D. and Speedie, M. K. (1996). "Native and heterologous protein secretion by *Streptomyces lividans*." Appl Microbiol Biotechnol **46**(4): 347-52.
- Servin-Gonzalez, L., Castro, C., Perez, C., Rubio, M. and Valdez, F. (1997). "bldA-dependent expression of the *Streptomyces exfoliatus* M11 lipase gene (lipA) is mediated by the product of a contiguous gene, lipR, encoding a putative transcriptional activator." J Bacteriol **179**(24): 7816-26.
- Somers, P. J., Yao, R. C., Doolin, L. E., McGowan, M. J., Fukuda, D. S. and Mynderse, J. S. (1987). "Method for the detection and quantitation of chitinase inhibitors in fermentation broths; isolation and insect life cycle effect of A82516." J Antibiot (Tokyo) **40**(12): 1751-6.
- Streicher, S. L. and Tyler, B. (1981). "Regulation of glutamine synthetase activity by adenylation in the Gram-positive bacterium *Streptomyces cattleya*." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(1): 229-33.
- Strohl, W. R. (1992). "Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters." Nucleic Acids Res **20**(5): 961-74.

- Sun, J., Kelemen, G. H., Fernandez-Abalos, J. M. and Bibb, M. J. (1999). "Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Microbiology **145**(Pt 9): 2221-7.
- Takano, E., White, J., Thompson, C. J. and Bibb, M. J. (1995). "Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces spp.*" Gene **166**(1): 133-7.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. and Daae, F. L. (1990 a). "High diversity in DNA of soil bacteria." Appl Environ Microbiol **56**(3): 782-7.
- Torsvik, V., Salte, K., Sorheim, R. and Goksoyr, J. (1990 b). "Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria." Appl Environ Microbiol **56**(3): 776-81.
- Valdez, F., Gonzalez-Ceron, G., Kieser, H. M. and Servin-Gonzalez, L. (1999). "The *Streptomyces coelicolor* A3(2) lipAR operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator." Microbiology **145**: 2365- 2374.
- Varadaraj, K. and Skinner, D. M. (1994). "Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases." Gene **140**(1): 1-5.
- Watson, R. J. and Blackwell, B. (2000). "Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction [In Process Citation]." Can J Microbiol **46**(7): 633-42.
- Wolcke, J. and Ullmann, D. (2001). "Miniaturized HTS technologies - uHTS." Drug Discov Today **6**(12): 637-646.
- Wright, F. and Bibb, M. J. (1992). "Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome." Gene **113**(1): 55-65.

Yanisch-Perron, C., Vieria, J. and Messin, J. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**: 103-119.

Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. (1996). "DNA recovery from soils of diverse composition." Appl Environ Microbiol **62**(2): 316-22.

## 7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Stuttgart, den 27. Januar 2002

## 8 Lebenslauf

Name/ Geburtsname:	Bonacker
Vorname:	Eckart
Wohnort:	Esslingen a. N., Hertfelderstr. 2
Geburtsdatum/ Ort:	11. Januar 1972 in Esslingen a. N.
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

### Ausbildung:

10/1998- 01/2002	Doktorarbeit am Institut Für Technische Biochemie, Universität Stuttgart unter Leitung von Prof. Dr. R. D. Schmid
10/1991- 08/1998	Chemiestudium an der Universität Stuttgart mit Abschluß als Diplom Chemiker
1982- 1991	Allgemeine Hochschulreife, Schelztor-Gymnasium Esslingen
1978- 1982	Grundschule Esslingen-Sulzgries