Selektive Hydroxylierung von α- und β-Ionon durch *Streptomyces* Stämme und molekulargenetische Arbeiten zur Identifizierung und Isolierung der Ionon-Hydroxylase aus *Streptomyces fradiae* Tü 27

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

Vorgelegt von
Sabine Lutz-Wahl
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid
Mitberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Franz Effenberger

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 1999

Institut für Technische Biochemie
1999

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Überlassung dieses Themas, seine unterstützende wissenschaftliche Betreuung und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben (Institut für Mikrobiologie, Universität Tübingen) möchte ich danken, daß ich an seinem Institut das Streptomyceten-Screening durchführen konnte.

Privatdozent Dr. Peter Fischer (Institut für Organische Chemie und Isotopenforschung, Universität Stuttgart) gilt mein Dank für die Durchführung der GC- und NMR-Messungen.

Dr. Claudia Schmidt-Dannert möchte ich für die Einführung in das genetische Arbeiten danken. Dr. Jutta Schmitt, Leiterin der Genetikgruppe, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen anregenden Diskussionen danken. Insbesondere möchte ich mich bei ihr für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Volker Nödinger danke ich für die Hilfsbereitschaft im Labor und für die Unterstützung bei der DNA-Sequenzierung.

Dr. Stefan Pelzer (Institut für Mikrobiologie, Universität Tübingen) danke ich für die Einführung in das Arbeiten mit Streptomyceten.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danke ich dem BMBF und der BASF AG (Dr. habil. Bernhard Hauer).

Sandra Barth danke ich für den Einsatz in ihrer Studienarbeit.

Allen ITB'lern, besonders der Genetikgruppe, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die gute Arbeitsatmosphäre danken. Insbesondere Ulrike, Petra, Sandra und Gaby möchte ich für die freundschaftliche Begleitung während meiner Arbeit danken.

Meiner Mutter und meinem Vater, der mich leider während der Promotion nicht mehr begleiten konnte, möchte ich dafür danken, daß sie mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Ralph, der mich immer liebevoll und mit großem Verständnis während meines Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt hat.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen VII

A Einleitung 1

1. Ionone und Carotinoide 1
1.1. Ionone 1
1.2. Carotinoide 3
1.2.1. Allgemeines 3
1.2.2. Vorkommen und Funktion der Carotinoide 4
1.2.3. Biosynthese der Carotinoide 5
1.2. Industrielle Aspekte 7

2. Cytochrom P450-Monooxygenasen 10
2.1. Die P450 Superfamilie 10
2.2. Funktionen in biologischen Systemen 11
2.3. Katalysierte Reaktionen 13
2.4. Katalysemechanismus 15
2.5. Struktur und Aufbau von P450-Systemen 17
2.6. Cytochrom P450 in Aktinomyceten 17

3. Zielsetzung 20

B Material und Methoden 21

1. Material 21
1.1. Geräte 21
1.2. Chemikalien, Enzyme und weitere Verbrauchsmaterialien 23
1.3. Mikroorganismen 25
1.3.1. Organismen für molekularbiologische Arbeiten 25
1.3.2. Organismen für das Screening 26
1.4. Plasmide und Vektoren 32

1.5. Primer ... 33
1.6. Verwendete Datenbanken ... 33

2. Medien, Puffer und Lösungen ... 34
2.1. Nährmedien ... 34
2.2. Puffer und andere Lösungen ... 38
2.3. Medienzusätze ... 44

3. Stammhaltung und Kultivierung ... 44
3.1. Stammhaltung und Kultivierung von *E. coli*-Stämmen ... 44
3.1.1. Stammhaltung (Sambrook et al., 1989) ... 44
3.1.2. Kultivierung und Anzuchtbedingungen ... 44
3.2. Stammhaltung und Kultivierung von Streptomyceten-Stämmen ... 45
3.2.1. Stammhaltung ... 45
3.2.2. Kultivierung ... 45

4. Biotransformation von α- und β-Ionon ... 46
4.1. Eingangsscreening mit β-Ionon als Substrat ... 46
4.2. Biotransformation von α- und β-Ionon ... 46
4.3. Aufarbeitung der Kulturüberstände ... 46

5. Untersuchung der Hydroxy-Derivate von α-und β-Ionon ... 47
5.1. Dünnschichtchromatographie ... 47
5.2. Gaschromatographie ... 47
5.3. ^{1}H- und ^{13}C-NMR ... 47

6. Methoden zur Isolierung und Reinigung von DNA ... 48
6.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* ... 48
6.1.1. Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* für Schnelltests ... 48
6.1.2. Isolierung reiner Plasmid-DNA aus *E. coli* (Spin Mini) ... 48
6.1.3. Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* (Midi) ... 49
6.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Streptomyceten ... 49
6.2.1. Mini-Lyse (modifiziert nach (Kieser, 1984)) ... 49

6.2.2. Qiagen-Lyse (Brolle et al., 1997) ... 50
6.3. Gesamt-DNA-Isolierung aus Bakterien ... 51
6.3.1. Isolierung von genomischer DNA aus Bakterien ... 51
6.3.2. Schnellisolierung von genomischer DNA aus Bakterien ... 51
6.3.3. Gesamt-DNA-Isolierung aus Aktinomyceten (modifiziert nach Altenbuchner und Cullum, 1984) ... 52
6.3.4. Gesamt-DNA-Isolierung mit Anionenaustauschersäulen (Genomic-tip, Qiagen) 52
6.3.5. Gesamt-DNA-Isolierung mit Anionaustauschersäulen (QIAamp spin coloumn) 53
6.4. Alkoholfällung ... 53
6.4.1. Ethanolfällung ... 53
6.4.2. Isopropanolfällung ... 53

7. Charakterisierung von DNA-Molekülen ... 54
7.1. Restriktionsspaltung von DNA ... 54
7.2. Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989; Sharp et al., 1973) ... 54
7.3. DNA-Konzentrationsbestimmung ... 55
7.4. DNA-Sequenzierung ... 56
7.4.1. DNA-Sequenzierung mit dem 373A-DNA-Sequencer (Applied Biosystems) ... 57
7.4.2. DNA-Sequenzierung mit dem 377A-DNA-Sequencer (Applied Biosystems) ... 58

8. Klonierungsexperimente ... 60
8.1. Spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Mullis et al., 1986) ... 60
8.2. Isolierung von PCR-Fragmenten aus dem Agarosegel ... 61
8.3. Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ... 61
8.4. Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase ... 62

9. DNA-Transfer in Bakterien ... 62
9.1. Transformation von *E. coli*-Stämmen ... 62
9.1.1. Transformation nach der PEG/DMSO-Methode (Chung et al., 1989) ... 62
9.1.2. Transformation mit Hilfe der Elektroporation ... 63
9.2. Transformation von Streptomyceten-Stämmen ... 65
9.2.1. Protoplasten-Transformation von Streptomyceten (Hopwood, 1985) ... 65

9.2.2. Interkonjugativer Transfer von Plasmid-DNA (Bierman et al., 1992; Mazodier et al., 1989) 66

10. Southern Hybridisierung (Southern, 1975) 67

10.1. Transfer der DNA auf einen Nylon-Filter 67

10.1.1. Transfer aus dem Agarosegel 67

10.1.2. Koloniehybridisierung 68

10.2. Nichtradioaktive Markierung von DNA-Sonden mit DIG-dUTP 68

10.3. Hybridisierung 69

10.4. Immunologischer Nachweis der markierten DNA-Probe 70

11. Long-Distance Genome-Walking (Min und Powell, 1998) 71

12. Erzeugung und Screening einer subgenomischen Genbank 74

12.1. Erzeugung einer subgenomischen Genbank mit vollständig verdauter genomischer DNA 74

12.2. Erzeugung einer subgenomischen Genbank mit partiell verdauter genomischer DNA 75

13. Expression von *soyC* 76

13.1. Verwendete Expressionssysteme 76

13.1.1. Das lambda p_L-Promotor-Expressionssystem 76

13.1.2. Das Strep-tag-Expressionssystem 76

13.1.3. Expressionssystem pJOE2775 77

13.2. Überprüfung der Expression in den verschiedenen Expressionssystemen 77

13.3. Zellaufschluß 77

14. Allgemeine biochemische Methoden 78

14.1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese 78

14.1.2. Herstellung des SDS-Gels und Durchführung der Elektrophorese 78

14.1.2. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen 79

14.2. Proteinbestimmung 79

14.3. Bestimmung der P450-Konzentration 80

C Ergebnisse 81

1. Biotransformation 81

1.1. Screening mit β-Ionon 81

1.2. Hydroxylierung von α-Ionon 84

1.3. Charakterisierung der Struktur von (3*R*,6*R*)- und (3*S*,6*S*)-Hydroxy-α-ionon 87

2. Identifizierung von P450-Genen 89

2.1. Konzept 89

2.2. Ableitung der Primer 90

3. Isolierung des gesamten P450-Gens aus *Streptomyces fradiae* Tü 27 103

3.1. Direktsequenzierung der genomischen DNA 104

3.2. Long-Distance Genome-Walking-PCR (LDGW) 106

3.3. Erzeugung und Screening von subgenomischen Genbanken aus *Streptomyces fradiae* Tü 27 107

3.3.1. Erzeugung einer Genbank nach vollständigem Verdau der genomischen DNA 107

3.3.2. Erzeugung einer Genbank nach Partialverdau der genomischen DNA 109

4. Integrationsmutagenese 110

4.1. Etablierung eines Wirts-Vektor-Systems für *S. fradiae* Tü 27 110

4.1.1. Wachstumsverhalten des Stammes *S. fradiae* Tü 27 in verschiedenen Medien bei unterschiedlichen Temperaturen 110

4.1.2. Resistenzmuster von *S. fradiae* Tü 27 111

4.1.3. Interkonjugativer Transfer von Plasmid-DNA 112

4.1.4. PEG-induzierte Protoplasten-Transformation 113

4.2. Inaktivierung der Gene *P450-27P* und *P450-27Q* 115

4.3. Umsetzungen von α-Ionon mit den Integrationsmutanten 119

5. Expression von P450 (*soyC*) aus *S. griseus* in *E. coli* 121

5.1. Klonierung der Konstrukte 121

5.2. Expression 124

D Diskussion 126

1. Biotransformation von β- und α-Ionon 126

2. Identifizierung der P450-Gene 129

3. Isolierung des gesamten P450-Gens aus *Streptomyces fradiae* 132

4. Integrationsmutagenese 135

4.1. Etablierung eines Wirts-Vektor-Systems 135

4.2. Inaktivierung der Gene *P450-27P* und *P450-27Q* und Umsetzung der Integrationsmutante mit α-Ionon 136

5. Expression von *soyC* aus *Streptomyces griseus* in *E. coli* 137

E Zusammenfassung 138

F Literatur 140

Lebenslauf 154

Abkürzungen

A	Adenin
Amp	Ampicillin
aphI	Aminoglycosid-Phophotransferasegen
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ccc	covalentyl closed circular
Cm	Chloramphenicol
Cys	Cystein
Da	Dalton
DMF	Dimethylforamid
dATP	3’-Deoxyadenosin-5’-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	3'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	3'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxyribonukleinsäure-5'-triphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
dTTP	3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
Gly	Glycin
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	Wellenlänge
lac	Gene für Lactose Verwertung
*lac*Z‘	verkürztes Galactosidasegen (*E. coli*)
LB	Lauria-Bertani-Medium
M	Molar
(M/M)	Masse/Masse
M/V	Masse/Volumen
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter

mg	Milligramm
µ	Mikro
mM	Millimolar
NaAc	Natriumacetat
NADH	β-Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	β-Nucotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ori	origin of replication
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
rhaP	Rhamnose Promotor
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S.	*Streptomyces*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
T	Thymin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Tryptic Soy Broth
tsr	Thiostrepton-Resistenzgen (*S. azureus*)
U	Unit
V	Volt
V/V	Volumen/Volumen
Vol	Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid

A Einleitung

1. Ionone und Carotinoide

1.1. Ionone

Die Ionone und ihre Derivate stellen einen Übergang von acyclischen zu monocyclischen Terpenen her und sind wichtige Zwischenverbindungen im Metabolismus von Terpenen, wie z. B. in der Biosynthese von Carotinoiden und Vitamin A (Abbildung1).

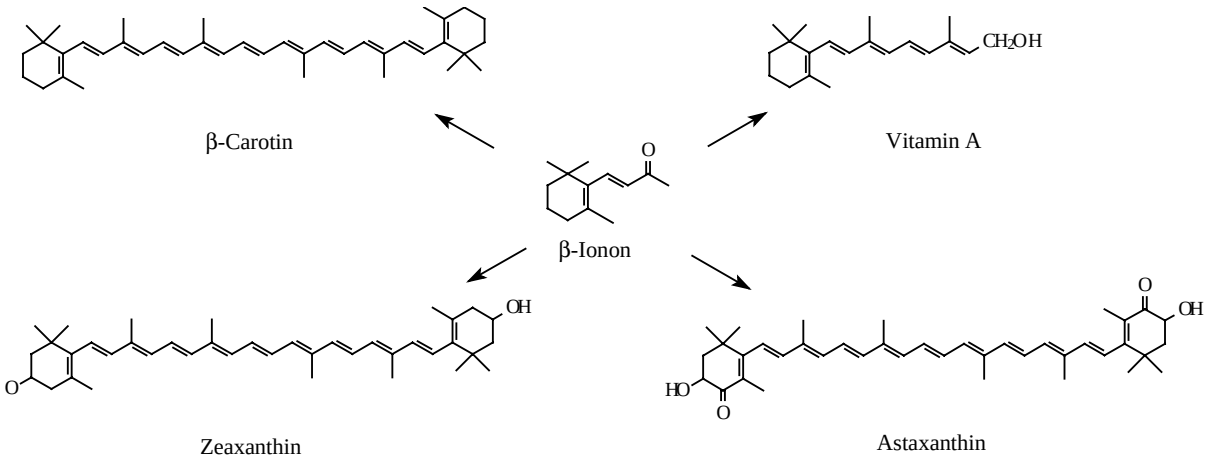


Abbildung 1: Ionon als Baustein von Carotinoiden und Vitamin A

Ionone konnten insbesondere aus Aromastoffen (Enzell et al., 1977; Ohloff, 1978) und etherische Ölen isoliert werden. In *Lawsonia, Brononia* oder Costuswurzeln überwiegt darin mengenmäßig β-Ionon, während im Blütenöl der Veilchen dagegen α-Ionon stärker vertreten ist. Als Duftstoffe spielen diese Verbindungen auch in der Tabak- und der Parfümindustrie eine große Rolle (Krasnobajew, 1984).

Des weiteren könnten sich die Ionon-Derivate, z. B. 3-Hydroxy-β-ionon, als wertvolle Zwischenprodukte in der chemo-enzymatischen Synthese von Carotinoiden, z. B. Zeaxanthin und Astaxanthin herausstellen (Loeber et al., 1971). Chemische Synthesen von Carotinoiden, ausgehend von Oxoisophoron über 3-Hydroxy-β-ionon, sind schon beschrieben. Ein Syntheseweg von Zeaxanthin ist in Abbildung 2 dargestellt.

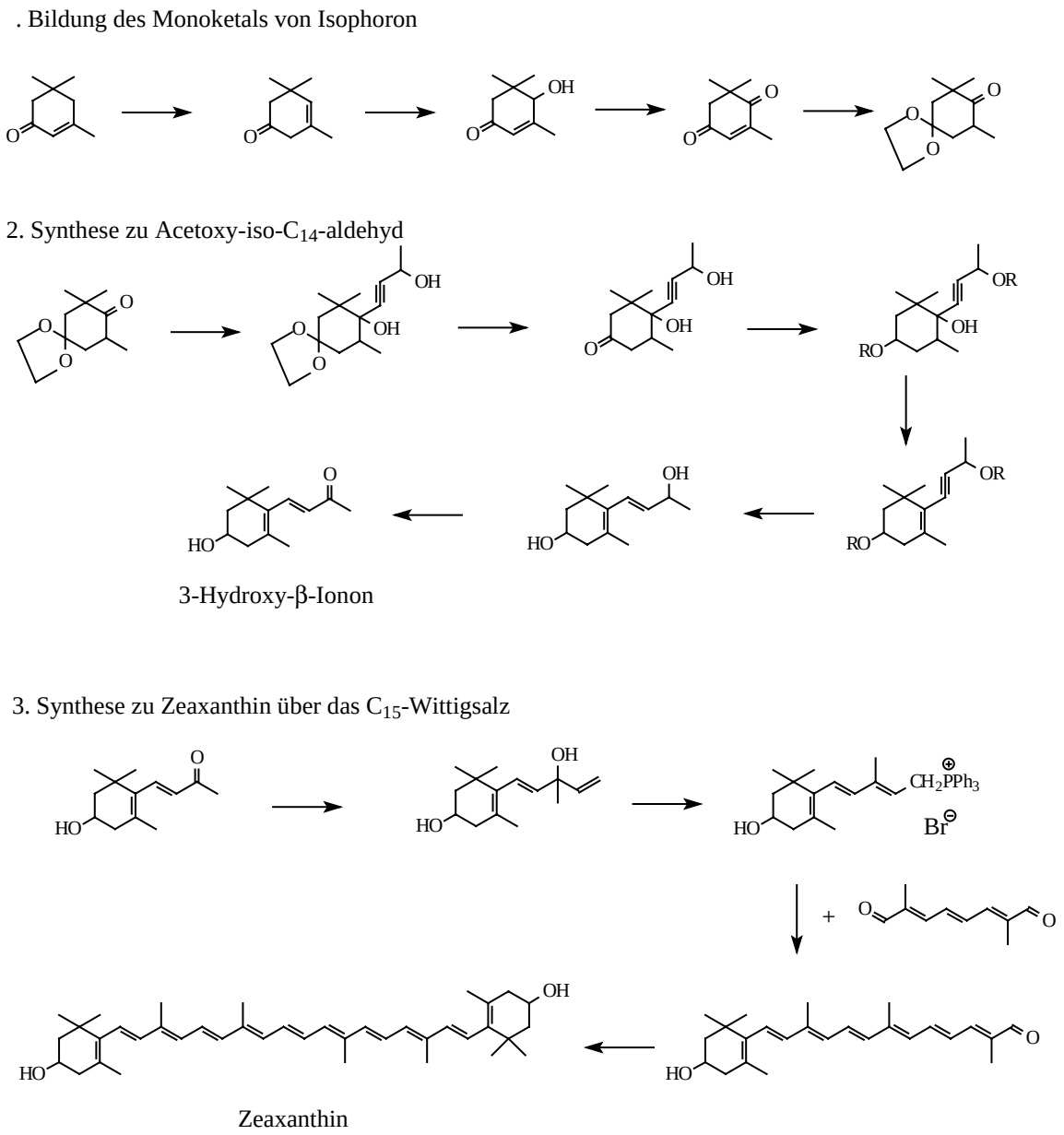


Abbildung 2: Synthese von Zeaxanthin

Die mikrobielle Transformation von α- und/oder β-Ionon zu zahlreichen Hydroxy- und Oxo-derivaten (Abbildung 3) wurde für verschiedene Pilzstämme (Hartman et al., 1988; Larroche et al., 1995; Mikami et al., 1981; Mikami et al., 1978; Yamazaki et al., 1988), hauptsächlich der Gattung *Aspergillus* beschrieben, aber nicht für Bakterienstämme. In den meisten Fällen konnten sowohl α- als auch β-Ionon zu zahlreichen Hydroxy- und Oxo-Derivaten umgesetzt werden, aber nicht regio- und stereoselektiv zu einem Hauptprodukt. Beispielsweise konnte α-Ionon bei der Biotransformation mit den Stämmen *Cunninghamella blakesleeana* ATCC 8688 (Hartman et al., 1988) oder *Aspergillus niger* JTS 191 (Yamazaki et al., 1988) außer zu 3-Hydroxy-α-ionon noch zu vielen anderen Metaboliten umgesetzt werden.

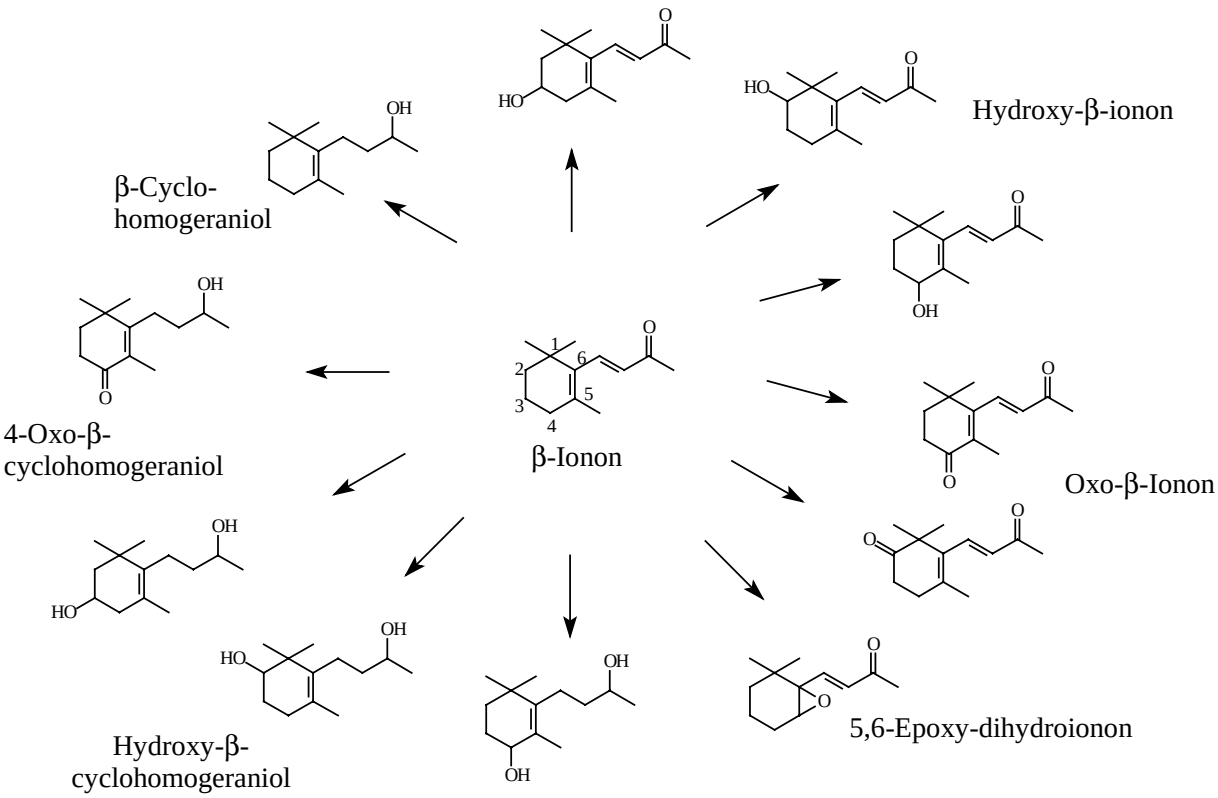


Abbildung 3: Umsetzungsprodukte der mikrobiellen Umsetzung von β-Ionon.

1.2. Carotinoide

1.2.1 Allgemeines

Die Carotinoide, von denen bis heute an die 600 Vertreter gefunden wurden, sind, abgesehen von einigen farblosen Substanzen, gelbe bis rote, fettlösliche Farbstoffe (Pigmente) pflanzlichen Ursprungs. Den Namen verdanken sie dem stark ungesättigten Kohlenwasserstoff Carotin, $C_{40}H_{56}$, der als erster Vertreter dieser Klasse von Wackenroder 1831 aus Karotten isoliert wurde.

Die Carotinoide gehören zu der Klasse der Tetraterpene. Ihr Grundkohlenstoffgerüst besteht aus 40 C-Atomen, die nach der Isoprenregel miteinander verknüpft sind. Dabei unterscheidet man zwischen Verbindungen, die nur aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen bestehen, die Carotine (z. B. α-, β-, γ-Carotin) und Verbindungen, die außerdem Sauerstoffunktionen enthalten, die Xanthophylle (z. B. Zeaxanthin, Astaxanthin).

Die Farbigkeit der Carotinoide ist auf die Anwesenheit mehrerer konjugierter Doppelbindungen zurückzuführen, die hier als Chromophore wirken.

Außer den Polykohlenwasserstoffen kommen in der Natur auch deren Derivate mit Alkohol-, Säure- und Esterfunktionen vor. Eine besondere Eigenschaft der Carotinoide ist ihre Fettlöslichkeit, sie werden daher als Lipochrome bezeichnet.

1.2.2. Vorkommen und Funktion der Carotinoide

Carotinoide treten sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich auf, wobei diese nur in Pflanzen synthetisiert werden. In der autotrophen Pflanze vollzieht sich die Biosynthese der Carotinoide in den Chloro- und Chromoplasten. In allen grünen Geweben beteiligen sich die Carotinoide an der Ausnutzung des Lichts für die Photosynthese. Daneben besitzen die Carotinoide auch eine Schutzwirkung gegen Licht und UV-Strahlung.

Da Tiere Carotinoide nicht *de novo* synthetisieren können, sind sie auf die mit der pflanzlichen Nahrung aufgenommenen Pigmente angewiesen, die sie dann allerdings für ihre Zwecke modifizieren können. Fische, wie z. B. Forelle, Goldfisch oder Lachs, akkumulieren Carotinoide in der Haut, im Eierstock, in der Leber und in anderen Geweben (Torrison et al., 1989). Im Fleisch von frischgefangenen Seeforellen konnten β-Carotin, Astaxanthin und Canthaxanthin nachgewiesen werden (Steven, 1948).

Den Crustaceen, wie Hummer, Krebs, Languste und rote Krabbe verleihen ebenfalls Carotinoide ihr typisches Farbkleid (Goodwin, 1984; Goodwin, 1986). Darunter fällt insbesondere das Astaxanthin, das durch Oxidation der mit der Nahrung aufgenommenen Carotinoide gebildet wird. In Krebsen bildet es durch Kombination mit Proteinen drei blaue Farbstoffe (α-, β- und γ-Crustacyanin) und einen gelben Farbstoff. Beim Erhitzen von Krebsen wird aus den grün erscheinenden Carotenoid-Proteinen das rote Astaxanthin freigesetzt (Belitz und Grosch, 1992). Auch die Farbe der Flamingofedern rührt von Astaxanthin her (Brush, 1990).

Bei Geflügel findet man Lutein (aus grünen Blättern), Zeaxanthin (aus gelbem Mais), Cryptoxanthin und Capsanthin im Eigelb und in der Haut.

Der menschliche und tierische Organismus kann spezielle Carotinoide, z. B. β-Carotin absorbieren und in Vitamin A-Moleküle spalten. Somit dienen Carotinoide auch als Vitamin A-Quelle und werden dementsprechend als Provitamin A bezeichnet.

Des weiteren wird den Carotinoiden auch eine wichtige Rolle in der Vorbeugung gegen Krebs und anderen degenerierenden Krankheiten gesehen. In Studien wurde gezeigt, daß der Konsum von gelbem und grünem Gemüse in Bezug steht mit dem verminderten Auftreten einiger Krebsarten (Hirayama, 1979; Peto et al., 1981). Wissenschaftliche Untersuchungen unterstützen die Theorie, daß die Lebenserwartung abhängig ist von der oxidativen Zerstörung von

DNA, Proteinen und Lipiden (Ames et al., 1993; Sohal et al., 1993; Stadtman, 1992). Natürliche Oxidantien, die Carotinoide eingeschlossen, wirken diesen Prozessen entgegen.

1.2.3. Biosynthese der Carotinoide

Die Biosynthesewege der Carotinoide β-Carotin, Zeaxanthin und Astaxanthin sind in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

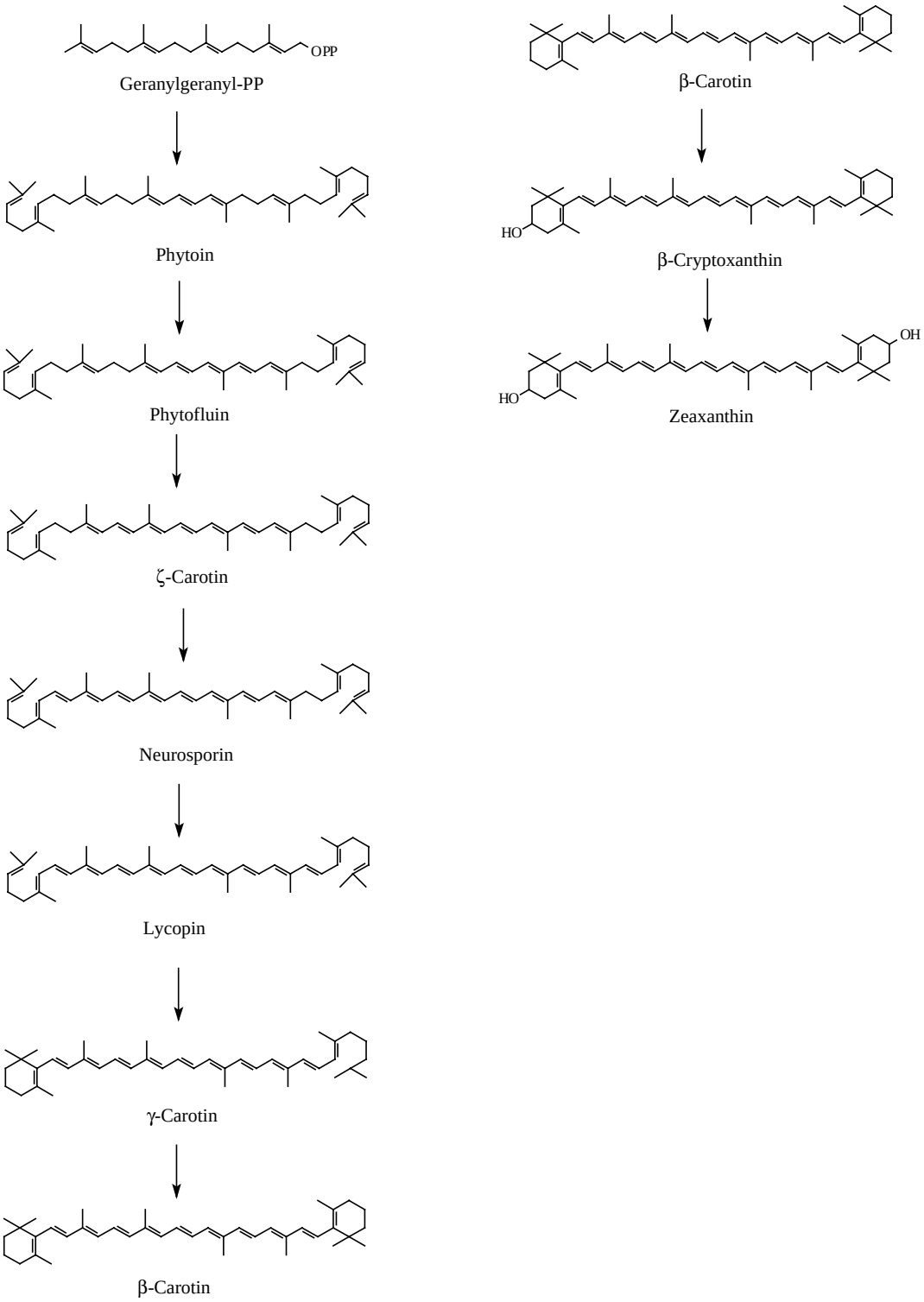


Abbildung 4: Biosynthese von β-Carotin und Zeaxanthin.

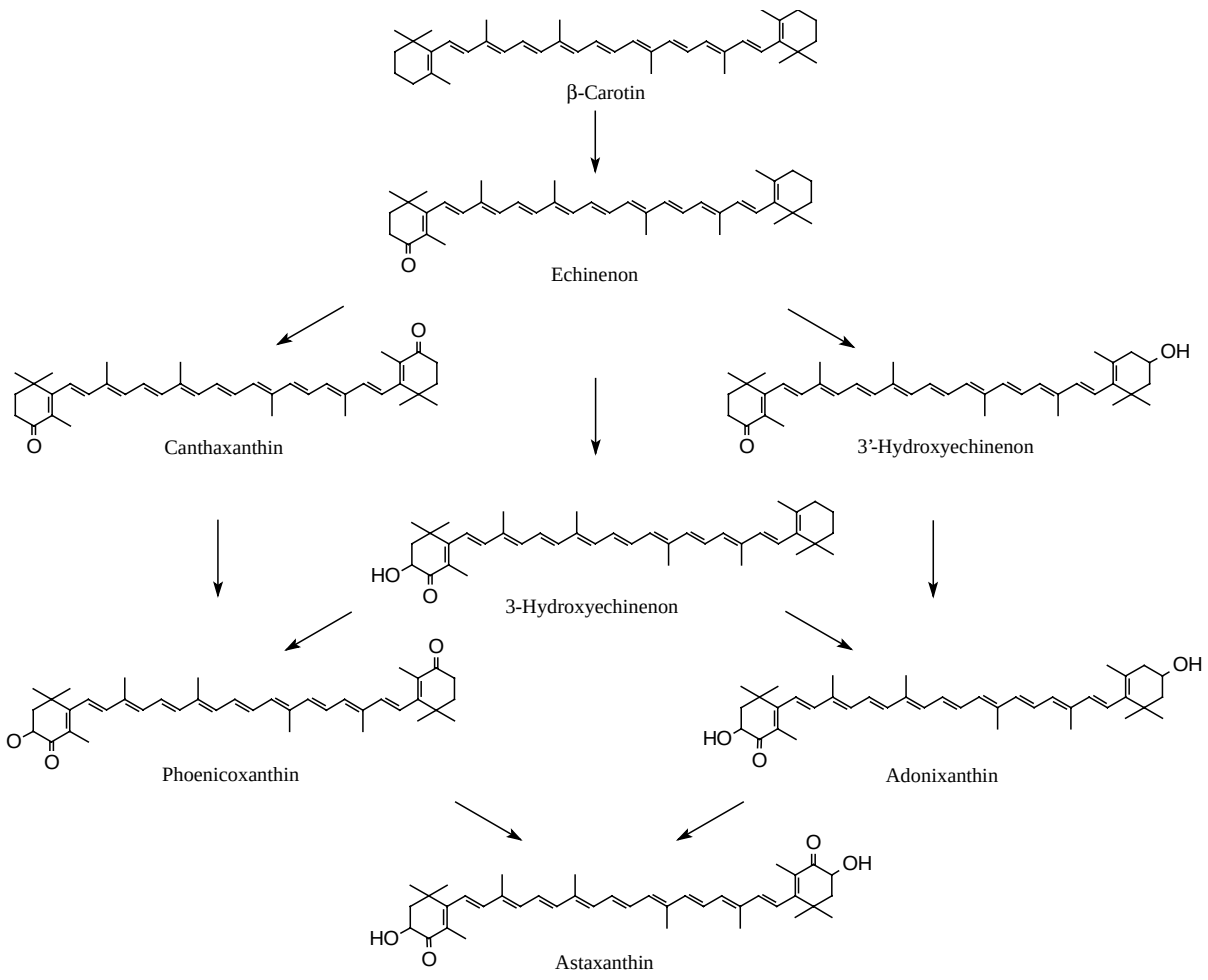


Abbildung 5: Biosynthese von Astaxanthin

Für die Biosynthese der Carotinoide konnten sehr viele Gene, die für die entsprechenden Enzyme kodieren, die an den jeweiligen Syntheseschritten beteiligt sind, isoliert werden. Für die Biosynthese des Zeaxanthins, ausgehend von β-Carotin konnte das Gen *crtZ* aus den Organismen *Erwinia uredova* (Misawa et al., 1990) und *Erwinia herbicola* (Hundle et al., 1994), sowie *crtR* aus dem Cyanobacterium *Synechocystis* sp. (Masamoto et al., 1998), die für β-Carotin-Hydroxylase kodieren, isoliert werden. Das *crtZ* Gen ist auch an der Biosynthese des Astaxanthins beteiligt, denn im Gegensatz zu dem Enzym aus *Synechocystis* sp. katalysiert die β-Carotin-Hydroxylase aus *Erwinia* auch Dioxygenase Reaktionen (Sandmann, 1994).

1.2. Industrielle Aspekte

Die Carotinoide finden Anwendung im Tierfutter, als Lebensmittelfarbstoff, in Pharmazeutika und Kosmetika (Bauernfeind, 1981; Klaui und Bauernfeind, 1981).

Carotinoide haben insbesondere als Nahrungsmittelfarbstoff eine große kommerzielle Bedeutung, da Untersuchungen zeigten, daß der Kauf und Verzehr von Nahrungsmitteln in hohem Maße vom Farbempfinden der Verbraucher beeinflußt wird.

Zuchttiere, wie z. B. der Lachs, können durch das Fehlen ihrer natürlichen Umgebung keine Carotinoide aufnehmen und verlieren so ihre natürliche Farbe. Um nun den Qualitätsansprüchen des Verbrauchers gerecht zu werden, werden dem Lachs die entsprechenden Carotinoid-Konzentrate ins Futter beigemengt und er erhält seine "natürliche Farbe" zurück. Allerdings ist diese Methode der indirekten Färbung von Lebensmitteln langwieriger, umständlicher und kostspieliger als die der direkten Färbung. Dabei werden Carotinoide u. a. zum Färben von Margarine, Eiscreme, Käsezubereitungen, Getränken, Soßen, Fleisch-, Süß- und Teigwaren eingesetzt.

Unveränderte Farbqualität ist auch bei Medikamenten erforderlich, bei denen Farben vor Verwechslung schützen und vor Vergiftung warnen sollen. Die als Färbemittel hauptsächlich eingesetzten Carotinoide sind in den Tabellen 1 - 3 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Carotinoide aus natürlichen Extrakten

Verbindung	Haupt-Carotinoide
Anatto (*Bixa orellano*)	Bixin, Norbixin
Karottenöl	α- Carotin, β-Carotin
Orangenschalen	Luteinester
Palmenöl	Carotine, Lutein
Paprika (*Capsicum annuum*)	Capsanthin, β-Carotin, Cryptoxanthin, Capsorubin
Tomate (Lycopersicon esculentum)	Lycopen, β-Carotin
Saffran (*Crocus sativus*)	Crocin, β-Carotin, Zeaxanthin
Gelber Mais (*Zea mays*)	Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Carotine
Alfalfa Schrot	Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin
Ringelblumenextrakte (*Tagetes erecta*)	Lutein(ester), β-Carotin

Tabelle 2: Fermentativ gewonnene Carotinoide

Organismus	Carotinoide
Phaffia rhodozyma	Astaxanthin, HDCO*, β-Carotin
Blakeslea trispora	β-Carotin
Dunaliella salina	β-Carotin
Hamatococcus sp.	Astaxanthin

*HDCO: 3-Hydroxy-3',4'-didehydro-β,ψ-carotin-4-on

Tabelle 3: Synthetisch hergestellte Carotinoide

Carotinoid	Marktpreis [$/kg][1]
β-Carotin	600
β-Apo-8'-Carotinaldehyd	900
β-Apo-8'-Carotinsäure	900
Canthaxanthin	1300
Citranaxanthin	-
Astaxanthin	2500

[1]bezieht sich auf 1 kg disperses Pulver, das 5-10 % aktives Carotinoid enthält (Stand 1992)

Die meisten Carotinoide, die in der Futter-, Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikindustrie benötigt werden, werden durch chemische Synthese gewonnen. β-Carotin wird z. B seit 1954 kommerziell hergestellt (Pfander, 1992). Die sechs synthetisch hergestellten Carotinoide sind in Tabelle 3 mit ihren Marktpreisen für 1 kg disperses Pulver, welches 5-10 % aktives Carotinoid enthält, aufgeführt. Insgesamt erreichten synthetische Carotinoide 1992 einen Marktwert von über $300 Millionen. In Tabelle 4 ist der geschätzte Weltmarkt für Carotinoide, die synthetisch bzw. aus biologischen Quellen gewonnen werden, dargestellt.

Tabelle 4: Geschätzter Weltmarkt für synthetische und biologische Carotinoide (1992-2000) (Evans et al., 1990)

	1992		1996		2000	
	$ Millionen		$ Millionen		$ Millionen	
	Synthet.	Bio.	Synthet.	Bio.	Synthet.	Bio.
β-Carotin						
Lebensmittel	50	10	75	35	110	60
Ernährung / Kosmetik	45	15	95	45	140	130
Astaxanthin / Canthaxanthin	120	10	210	40	305	150

Zur Zeit werden Carotinoide für industrielle Zwecke fast ausschließlich durch chemische Synthese oder durch Extraktion aus Pflanzen gewonnen. Allerdings kommen diese Carotinoide auch in der Natur in Mikroalgen, Bakterien und Pilzen vor. In den letzten Jahren wurde der mikrobiellen Synthese ein verstärktes Interesse entgegengebracht. Ein Grund hierfür liegt in dem immer weiteren Anstieg der Meerestierzucht. Allein der Anteil an gezüchteten Lachsen und Shrimps ist in den letzten 15 Jahren von 3 - 5 % auf 25 - 30 % angestiegen, wobei das Carotinoid Astaxanthin zur Färbung dieser Zuchttiere eingesetzt wird.

Zeaxanthin wird von Pflanzen, verschiedenen Algen und Cyanobakterien produziert: *Myobacterium, Xanthobacter, Erwinia und Flavobacterium*. Bei *Flavobacterium* können durch verschiedene Fermentationsprozesse 10 – 335 mg/l Kultur Zeaxanthin gewonnen werden (Ninet und Renault, 1979). In einem weiteren Prozeß wurden die Gene für die Zeaxanthin Biosynthese kloniert und in *Saccharomyces* exprimiert.

Astaxanthin wird hauptsächlich aus der Grünalge *Haematococcus pluvialis* und verwandten Spezies, sowie aus der Hefe *Phaffia rhodozyma* und Crustaceenextrakten isoliert. Aus *Phaffia rhodozyma* können 500 µg/g Zellen Carotinoide isoliert werden, wobei der Anteil an Astaxanthin darin 40 - 95 % beträgt. Der Anteil an Astaxanthin ist stark davon abhängig, welcher Stamm zur Kultivierung und welche Fermentationsmethode eingesetzt wurde.

2. Cytochrom P450-Monooxygenasen

Cytochrom P450-Enzyme sind in der Natur weit verbreitet und katalysieren die Oxidation zahlreicher physiologischer und nicht physiologischer Verbindungen. Sie sind in ihrer Struktur und Reaktionsweise untereinander sehr ähnlich und enthalten ein Eisenporphyrin als prosthetische Gruppe. Ein wichtiges Merkmal der P450-Struktur betrifft die Verknüpfung des Häm mit dem Protein. Das Eisen der Häm-Gruppe kann insgesamt sechs Bindungen eingehen. Vier dieser Bindungsstellen sind von den Stickstoffatomen der Pyrrole belegt, die in der Ebene des Häm-Ringes liegen. Die fünfte Bindung besteht zum Thiolat eines Cysteins im Protein und verknüpft das Häm mit dem Protein. Dieser Aufbau ist verantwortlich für die charakteristischen spektralen Eigenschaften von Cytochromen P450 wie beispielsweise die Ausbildung eines Absorptionsmaximums bei 450 nm in Kohlenmonoxid-Differenzspektren, die P450-Systemen ihren Namen gaben.

2.1. Die P450 Superfamilie

Das Cytochrom P450 wurde 1955 von Klingenberg und Williams in Rattenleber-Mikrosomen als Pigment identifiziert (Klingenberg, 1958), das nach Reduktion und Bindung von Kohlenmonoxid ein Absorptionsmaximum des Soret-Peaks bei 450 nm und nicht wie bei anderen Häm-Verbindungen bei ~420 nm, zeigte. Aus diesem Grund wurde es von seinen Entdeckern auch als Cytochrom P450 bezeichnet. "P" steht für Pigment und 450 für das Absorptionsmaximum. Dieses Pigment wurde von Sato und Omura weiter charakterisiert (Omura und Sato, 1961), die auch eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Cytochrom P450 entwickelten (Omura und Sato, 1964).

In den folgenden Jahren wurden durch die Einführung molekularbiologischer Techniken viele verschiedene Formen von Cytochrom P450 isoliert und charakterisiert, ihre Aminosäuresequenzen bestimmt und die Regulationsmechanismen ihrer Gene untersucht. Inzwischen sind über 700 Gensequenzen bekannt. Damit zählt die P450-Superfamilie zu einer der größten und ältesten Genfamilien. 1996 waren auf der zuletzt publizierten Liste (Nelson, 1996) bekannter P450 Gensequenzen 481 P450-Gene in 74 Genfamilien bekannt. Die Systematik und Nomenklatur (Nebert et al., 1987) dieser Sequenzen erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien. In einer Genfamilie sind alle Cytochrome P450 zusammengefaßt, die 40 % oder mehr Sequenzidentität besitzen. Mit mehr als 55 % Identität in der Aminosäuresequenz befinden sich die P450 -Enzyme innerhalb einer Subfamilie. Die Nomenklatur erfolgt so, daß die Gene mit dem Stamm "*CYP*" (Ausnahme Mausgene mit "*Cyp*"), Proteine und mRNA mit dem Wortstamm

"CYP" oder P450 bezeichnet werden. Die Familie oder Subfamilie wird mit nachfolgenden Buchstaben oder Zahlen angegeben, gefolgt von der Nummer des jeweiligen P450. So lautet die Bezeichnung der Hydroxylase von *Streptomyces griseus* für das Gen *CYP*105D1, für mRNA und Protein CYP105D1 oder alternativ $P450_{soy}$.

2.2. Funktionen in biologischen Systemen

Innerhalb der P450-Superfamilie existieren zahlreiche Enzymvarianten, die bei Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen für die Metabolisierung endogener Substanzen wie auch für die Umwandlung xenobiotischer Substanzen sorgen. Die Cytochrome P450 in Eukaryonten befinden sich im allgemeinen in Membranen, während die in Bakterien in der Regel löslich sind. Beim Menschen befinden sie sich vor allem in den Mikrosomen der Leber und zeigen als typische Entgiftungsenzyme (Jakoby und Ziegler, 1990) oft keine allzu große Substratselektivität. Auf diesem Weg werden Fettsäuren, Aminosäuren und Hormone als primär körpereigene Substrate stereospezifisch metabolisiert. So ist die in Abbildung 6 dargestellte Reaktion von Vitamin D_3 zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol ein entscheidender Schritt zur Entstehung der biologisch aktiven Form der D-Vitamine.

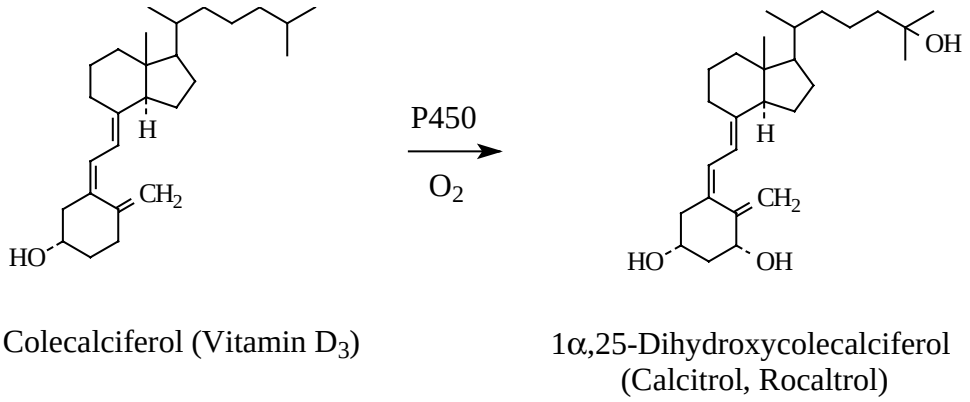
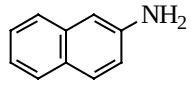


Abbildung 6: Oxidation von Colecalciferol (Vitamin D_3) zu 1,25-Dihydroxycolecalciferol

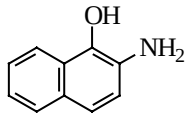
Neben einer wichtigen Rolle bei Biosynthesen und im Stoffwechsel sind Cytochrom P450-Enzyme auch für die Pharmakologie, Medizin und Toxikologie interessant, da viele körperfremde Substrate erst nach Oxygenierung in die eigentlich wirksamen Verbindungen überführt werden. In Tabelle 5 sind einige Beispiele für den oxidativen Metabolismus von Medikamenten durch P450-Monooxygenasen gezeigt. Anschließend sind noch 2 Beispiele für toxikologisch interessante Reaktionen dargestellt.

Tabelle 5: Beispiele für den oxidativen Metabolismus von Medikamenten durch Monooxygenierung des Cytochrom P450 (Mutschler, 1991).

Gesamtreaktion	**Reaktionssequenz**	**Beispiele**
Oxidation Aliphatischer Ketten	$R\text{-}CH_2\text{-}CH_3 \longrightarrow R\text{-}CH(OH)\text{-}CH3$ und $R\text{-}CH_2\text{-}COOH$	Barbiturate
Oxidative N-Desalkylierung	$R^1\text{-}N(H)(CH_2R^2) \longrightarrow R^1\text{-}NH_2 + R^2\text{-}C(=O)H$	Ephedrin, Methamphetamin
Oxidative Desaminierung	$R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 \longrightarrow R\text{-}C(=O)H + NH_3$	Histamin Noradrenalin Mescalin
Oxidative O-Desalkylierung	$R^1\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}C_6H_4\text{-}R^2 \longrightarrow HO\text{-}C_6H_4\text{-}R^2 + R^1\text{-}CHO$	Phenacetin Codein Mescalin
Para-Hydroxylierung von Aromaten	$C_6H_5\text{-}R \longrightarrow HO\text{-}C_6H_4\text{-}R$	Phenobarbital Chlorpromazin
Oxidation Aromatischer Amine	$C_6H_5\text{-}NH_2 \longrightarrow C_6H_5\text{-}NH\text{-}OH$	Anilinderivate
S-Oxidation	$R^1R^2S \longrightarrow R^1R^2S\rightarrow O \longrightarrow R^1R^2S(=O)_2$	Phenothiazine



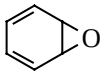
P450 → O_2



β-Naphthylamin

α-Hydroxy-β-aminonaphthalin (cancerogen)

P450 → O_2



Benzol

Epoxybenzol

Abbildung 7: Beispiele für toxikologisch bedeutsame Umsetzungen xenobiotischer Stoffe durch Cytochrom P450.

In Abwesenheit von Seitenketten findet eine Cytochrom P450-katalysierte Epoxidierung von Benzol oder Benzo[a]pyren zu den in der Folge eigentlich erst cancerogen wirkenden Derivaten statt. Cytochrom P450-Enzyme werden auch für die Toxizität von polychlorierten Biphenylen (PCBs) verantwortlich gemacht. Der Grund hierfür besteht möglicherweise darin, daß sie zwar im Zusammenwirken mit einem Rezeptor die Synthese P450-abhängiger Enzyme stimulieren und immunotoxische Reaktionen auslösen, selbst jedoch nicht rasch genug abgebaut werden können (Lenoir und Sandermann, 1993).

2.3. Katalysierte Reaktionen

Cytochrom P450-Enzyme gehören zur Klasse der Monooxygenasen (E.C.1.14.-.-), die Sauerstoffatome auf nicht aktivierte aliphatische oder organische Verbindungen übertragen.

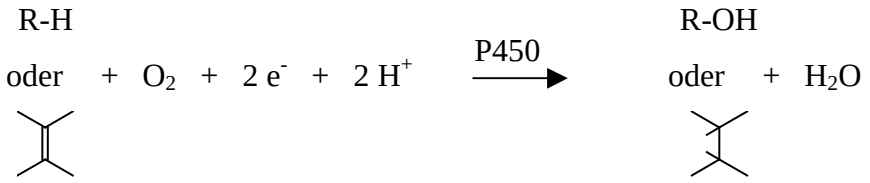


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Reaktionen, die durch Cytochrom P450 katalysiert werden.

Folgende Reaktionen werden von P450-Enzymen ausgeführt: Oxidation von aliphatischen Kohlenwasserstoffen, oxidative Desalkylierung, oxidative Desaminierung und die Oxidation aromatischer Amine. Darüber hinaus können sie auch -C=C- Doppelbindungen epoxidieren.
Für diese Reaktionen benötigen die meisten P450-Systeme Cofaktoren wie NADPH oder NADH als Elektronenquellen und weitere Proteine zur Elektronenübertragung. Cytochrome P450 sind gewöhnlich Multikomplex-Systeme und werden entsprechend der Realisierung des Elektronentransfersystems (Reduktasesystems) in 3 Klassen eingeteilt.
Das Typ-I-System, das im endoplasmatischen Retikulum von eukaryotischen Organismen identifiziert wurde, besteht aus einer NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und dem Cytochrom P450. In diesem sogenannten Zweikomponenten-System werden Elektronen vom NADPH über die Reduktase auf das Cytochrom P450 übertragen. Die Reduktase ist an die Membran gebunden und besteht aus zwei Domänen: einer kleinen hydrophoben Domäne in der N-terminalen Region, die an die Membran und die P450-Komponente bindet, und einer großen hydrophilen Domäne in der C-terminalen Region, die FAD und FMN als prosthetische Gruppen enthält. Das FAD dient dabei als Elektronenakzeptor von NADPH, während das FMN als Elektronendonator fungiert und die Elektronen an das Cytochrom P450 weitergibt (Abbildung 9).

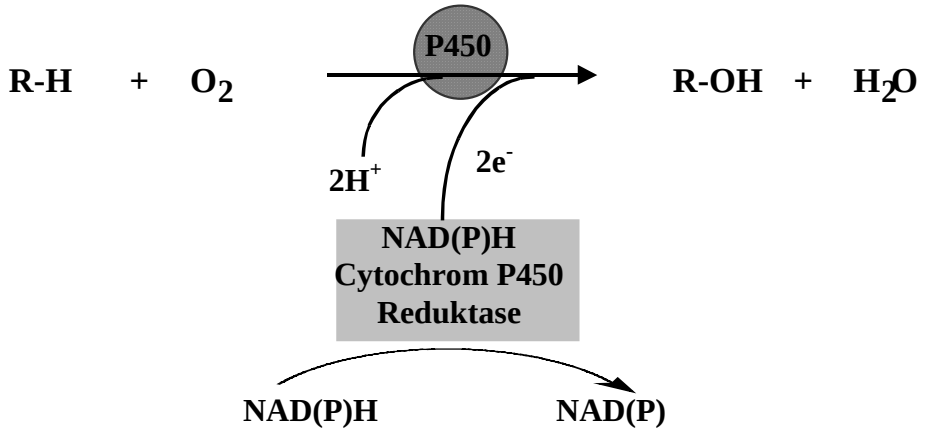


Abbildung 9: Zweikomponenten-System des Elektronentransfers bei P450-Systemen.

Das P450 des Typs II wurde in Mitochondrien aus Säugerzellen und in Bakterien gefunden. Das sogenannte Dreikomponenten-System benötigt für den Elektronentransport zusätzlich zu einer Reduktase, die gewöhnlich FAD als prosthetische Gruppe trägt, ein Eisen-Schwefel-Protein, auch Ferredoxin genannt. Hierbei wird ein Elektron vom NADPH oder NADH über die Reduktase an das Ferredoxin transportiert, das es dann an das Cytochrom P450 überträgt (Abbildung 10).

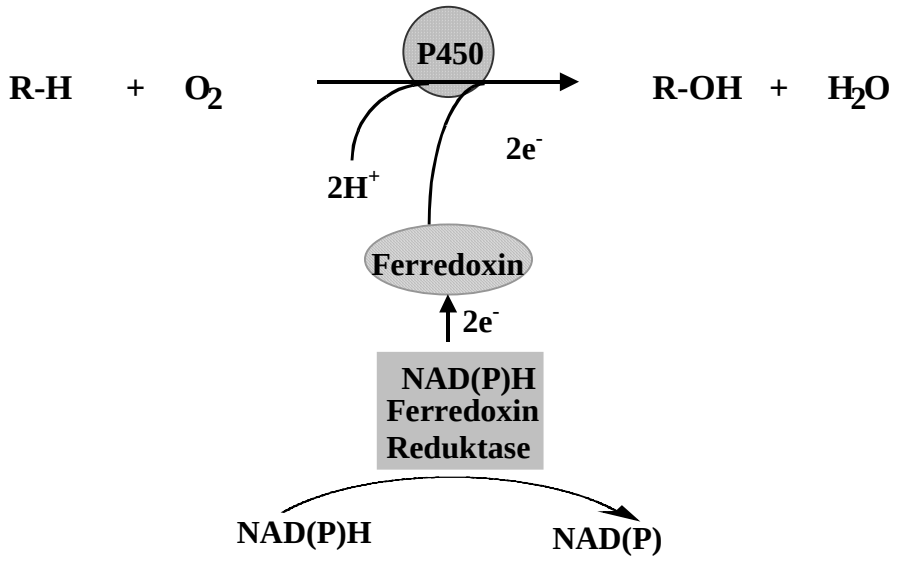


Abbildung 10: Dreikomponenten-System des Elektronentransfers bei P450-Systemen.

Von Narhi und Fulco (Narhi, 1987) wurde ein dritter Typ für das Cytochrom $P450_{BM-3}$ in *Bacillus megaterium* ATCC 14581 beschrieben. Hier besteht das Enzym aus zwei Domänen und es handelt sich um ein sogenanntes Einkomponenten-System. Die C-terminale Domäne enthält die Häm- und Substratbindungsstelle. In der Domäne am N-Terminus, die als Reduktase fungiert, befinden sich das FAD und FMN als prosthetische Gruppen und die NADPH-Bindungsstelle (Abbildung 11). Alle Elektronentransporte laufen hier intramolekular ab.

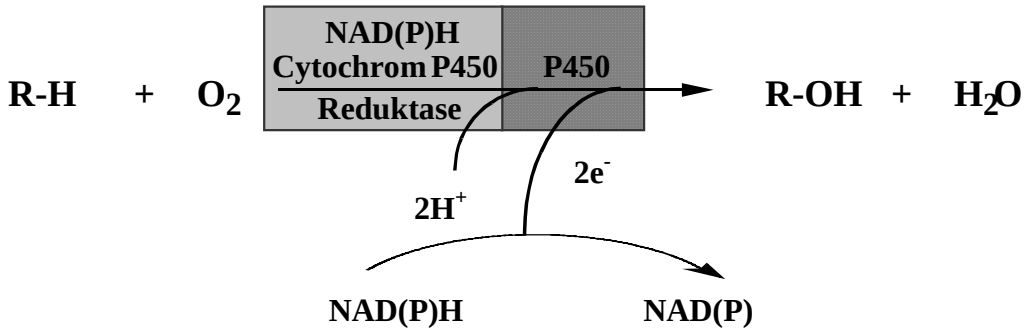


Abbildung 11: Einkomponenten-System des Elektronentransfers bei P450-Systemen.

2.4. Katalysemechanismus

Nachdem zahlreiche P450-Enzyme sequenzanalysiert (Guengerich, 1991) und einige Formen mit und ohne Substrat strukturell (Ravichandran et al., 1993) wie reaktionsmechanistisch cha-

rakterisiert wurden, wird folgender Katalysezyklus (Abbildung 12) abgeleitet (Kaim, 1995; Lippard, 1995).

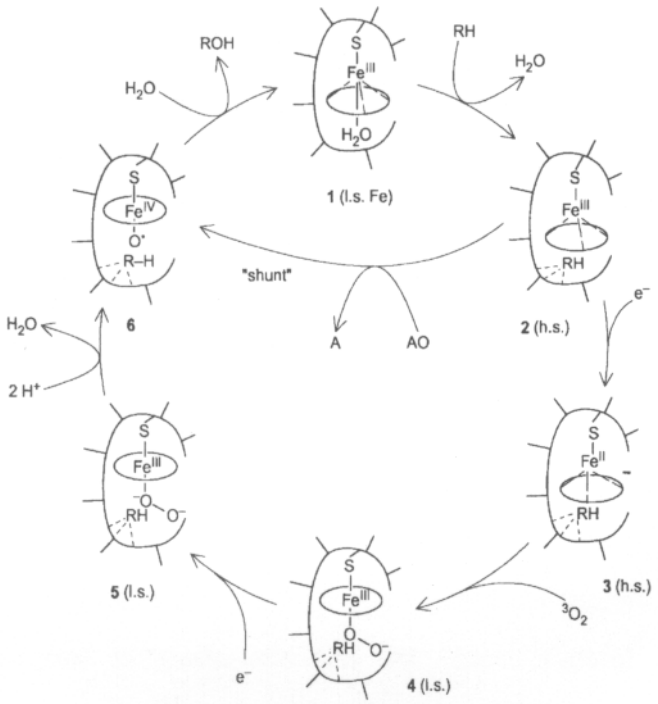


Abbildung 12: Cytochrom-P450 Katalysezyklus.

Im inaktiven substratfreien Zustand liegt eine low-spin Fe(III)-Stufe **1** mit sechsfach koordiniertem Metall (Porphyrin, Cysteinat und Wasser) vor. Der H_2O-Ligand liegt dabei an der Substratbindungsstelle und wird bei Substratbindung verdrängt. Die vorwiegend hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb des Proteins in der Nähe der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Systems bewirken nun einen Übergang zur high-spin Fe(III)-Form **2** mit offener Koordinationsstelle. Durch die weitreichende Änderung der Koordinationszahl, des Spin-Zustands und der Polarität des Fe-Zentrums wird das Redoxpotential des Eisens erhöht, so daß es leichter zum Fe(II)-Zustand (**3**) reduziert wird. Durch diesen Reduktionsschritt wird die Bindung des Sauerstoffs ermöglicht (**4**). Sobald der Sauerstoff gebunden ist (wahrscheinlich ähnlich wie bei Hämoglobin und Myoglobin), wird durch Aufnahme eines zweiten Elektrons ein sehr labiler low-spin Peroxo-Fe(III)-Komplex **5** gebildet. Dieser verliert durch Aufnahme zweier Protonen ein Molekül Wasser, wodurch die O-O-Bindung gespalten wird (Mandon et al., 1989) und ein reaktiver Komplex **6** zurückbleibt, der unter radikalischer Sauerstoffübertragung auf das Substrat zum Produkt und zum Ausgangszustand zerfällt.

Von der Fe(III)-Stufe im Komplex **2** kann durch externe starke Oxidationsmittel, wie z. B. Periodat, in einem "shunt-pathway" der physiologische Reaktionsweg umgangen werden. Hier erreicht man auf direktem Weg die Vorstufe **6**.

2.5. Struktur und Aufbau von P450-Systemen

Obwohl Bakterien und Säuger phylogenetisch weit auseinander liegen, zeigen die Aminosäuresequenzen ihrer Cytochrome P450 in einigen Bereichen hohe Übereinstimmung. Aus diesen Homologien lassen sich spezifische Sequenzmerkmale für alle Cytochrome P450 ableiten.

Im allgemeinen enthalten P450-Enzyme 13 α-Helices und vier bis fünf β-Faltblätter (Peterson, 1998). In sieben Positionen besitzen nahezu alle die gleichen Aminosäuren, wobei sie sich auf drei konservierte Regionen verteilen: Die Helix-K, die aromatische und die Häm-Bindungsregion.

In der am stärksten konservierten Region, der Häm-Bindungsstelle, befindet sich die Aminosäure Cystein, die in allen Cytochromen P450 enthalten ist und als fünfter Ligand an das Häm bindet. Die Helix K enthält ein völlig konserviertes Glu-X-X-Arg-Motiv mit bisher ungeklärter Funktion. Die aromatische Region liegt zwischen der Helix K und der Häm-Bindungsregion, und enthält, wie der Name schon sagt, einen hohen Anteil an konservierten aromatischen Aminosäuren.

2.6. Cytochrom P450 in Aktinomyceten

Viele Spezies innerhalb der Familie der Aktinomyceten besitzen ein oder mehrere lösliche Cytochrom P450-Monooxygenasen, die oft Substrat-induziert sind und für eine Reihe von xenobiotischen Transformationen verantwortlich sind. Besonders in Streptomyceten wurden sehr viele Cytochrome P450 gefunden. Dies ist kaum verwunderlich, da zahlreiche Studien die Möglichkeiten dieser Organismen aufzeigen, neue und oft hoch-selektive chemische Modifikationen durchzuführen (Peczynska-Czoch und Mordarski, 1984). Sie katalysieren z. B. Alkanhydroxylierungen, Pentachlorphenol Dehalogenierungen und Alkoxyphenol O-Dealkylierungen, den Abbau von Herbiziden und Biosyntheseschritte (siehe Tabelle 6). Cytochrome P450 aus *Streptomyces* haben ein relativ weites Substratspektrum. Dies könnte auf ihre Überlebensstrategie in ungünstigen Lebensräumen zurückzuführen sein, wo sie von unterschiedlichen Nahrungsquellen abhängen (O'Keefe und Harder, 1991). In Tabelle 6 sind isolierte Cytochrome P450 in Streptomyceten aufgeführt.

Tabelle 6: Cytochrom P450 in Streptomyceten.

Stamm	Protein Trivialname	Protein system. Name	Gen	Eigenschaft	Referenz
S. griseolus ATCC 11796	$P450_{su1}$ $P450_{su2}$	CYP105A1 CYP105B1	*suaC* *subC*	Hydroxylierung v. Sulfonylharnstoffen u. Phenobarbituraten	(O'Keefe et al., 1988; Omer et al., 1990)
S. sp. SA-COO		CYP105C1	*choP*		(Horii et al., 1990)
S. griseus ATCC 13273	$P450_{soy}$	CYP105D1	*soyC*	7-Ethoxycumarin u. Preocen II Hydroxylase	(Sariaslani und Kunz, 1986; Trower et al., 1992)
S. erythrae *Saccharopolyspora erythrae* CA-1430		CYP107A1	*eryF*	6-Deoxyerythronolid B Hydroxylase und 7-Ethoxycumarin Hydroxylase	(Haydock et al., 1991; Weber et al., 1991; Andersen und Hutchinson, 1992)
S. antibioticus			*oleP*	Oleandomycin Biosynthese	(Rodriguez et al., 1995; Olano et al., 1998)
S. fradiae					(Merson-Davies und Cundliffe, 1994)
S. hygroscopicus NRRL 5491		CYP122A2 CYP107G1	*rapJ*, *rapN*	Rapamycin Biosynthese	(Schwecke et al., 1995)
S. sp. *S. peucetius* ATCC 29050			*doxA*	Daunomycin C-14-Hydroxylase	(Lomovskaya et al., 1999)
S. sp. MA 6858			*fkbD*		(Motamedi et al., 1996)
S. viridifaciens			*vlmH*	Isobutylamin N-Hydroxylase	
S. violaceus *S. venezuelae* ATCC 15439			*picK* *pikC*	Makrolacton-Hydroxylase	(Betlach et al., 1998; Xue et al., 1998; Xue et al., 1998)
S. carbophilus SANK 62585	$P450_{sca-1}$ $P450_{sca-2}$			Compactin Hydroxylase	(Matsuoka et al., 1989; Watanabe et al., 1995)
S. flavovirens SANK 63684				Compactin Hydroxylase	(Manome und Hoshino, 1989)
S. setonii ATCC 39116				Veratrol u. Guaiacol Hydroxylase	(Sutherland, 1986)

Neben der Monooxygenase konnten aus einigen Streptomyceten die für den Elektronentransfer benötigten Komponenten Ferredoxin und NADPH Reduktase isoliert werden. Aus *S. griseolus* konnten 2 Ferredoxine ([3Fe-4S]-Cluster) zu den zugehörigen Monooxygenasen $P450_{su1}$ und $P450_{su2}$ isoliert werden (O'Keefe et al., 1991). Aus dem Stamm *S. erythrae* wurden ein Ferredoxin und eine Reduktase teilweise charakterisiert (Shafifee und Hutchinson, 1988). In *S. griseus* wurde ein 7Fe Ferredoxin ([4Fe-4S]- und [3Fe-4S]-Cluster) sehr genau charakterisiert (Trower et al., 1990; Trower et al., 1990).

3. Zielsetzung

Der Marktanteil der Carotinoide Astaxanthin und Zeaxanthin ist sehr groß, doch die Gewinnung ist noch immer sehr aufwendig und teuer. Aus diesem Grund wäre es wünschenswert, einen chemisch-enzymatischen Syntheseweg für diese Carotinoide zu finden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten α- bzw. β-Ionon durch selektive Hydroxylierung mittels Mikroorganismen zu 3-Hydroxyionon umgesetzt werden, um einen Baustein für solche Synthesen zu liefern.

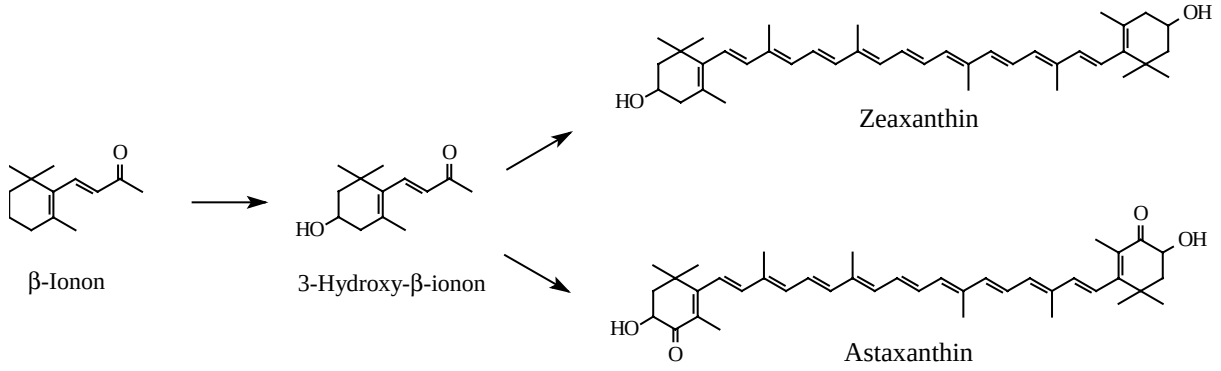


Abbildung 13: Hydroxylierung von β-Ionon zu 3-Hydroxy-β-ionon, als Synthesebaustein für die Carotinoide Zeaxanthin und Astaxanthin.

Für ein Screening sollten vor allem bakterielle Organismen, insbesondere Spezies der Familie *Streptomyces* eingesetzt werden, da diese ein weites Substratspektrum besitzen und mit diesen Stämmen selektivere Umsetzungen als mit Pilzstämmen erwartet werden.

Nach Identifizierung des Stammes, der in der Lage ist, die gewünschte Umsetzung zu 3-Hydroxyionon durchzuführen, sollte anschließend das Gen, das die Hydroxylierungen katalysiert, identifiziert und isoliert werden. Da diese Reaktion vor allem von P450-Hydroxylasen katalysiert wird und in einem Stamm jedoch mehr als ein Cytochrom P450 vorhanden sein kann, sollte zur Identifizierung des richtigen Gens, eine Integrationsmutagenese durchgeführt werden.

B Material und Methoden

1. Material

1.1. Geräte

Agarose-Gelelektrophorese	DNA Sub Cell™, Mini Sub™ DNA Cell, Mini Sub™ Cell GT	BioRad
	Video Copy Processor P66E	Mitsubishi
	BWM 9X Monitor	Javelin Electronics
	UV-Leuchttisch	MWG-Biotech
Brutschränke	WTE	Binder
	UM 500	Memmert
DNA-Sequenzierer	373A DNA Sequencer	Applied Biosystems
	377A DNA Sequencer	Applied Biosystems
	Macintosh Quadra 650	Apple Macintosh
Elektroporation	Easyject Plus	Eurogentec, Belgien
Mikroskop	Axiolab E	Zeiss
Mikrowellengerät	Micro-Chef FM A935	Moulinex
Netzgeräte	Power Pac 3000, Power Pac 300, Model 200/2.0 Power Supply	BioRad
Objektive	Achroplan 10x/0,25, 40x/0,65, 100x/1,0	Zeiss
PAGE	Minigel-Twin G42	Biometra®
	Model 583 Gel Dryer	BioRad
PCR-Geräte	DNA-Thermocycler	Perkin Elmer
	Master Cycler Gradient	Eppendorf
	Robocycler® Gradient 40	Stratagene®
pH-Meter	Digital pH Meter pH525	WTW
Photometer	UV/VIS-Spektrophotometer	Pharmacia Biotech

	(Ultrospec 3000)	
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134	Büchi
SpeedVac	Concentrator 5301	Eppendorf
Inkubatoren	HT-Schüttelinkubator (30°C, 37°C, 39°C)	Infors AG
	Certomat R Schüttelinkubator (42°C)	Braun
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraschallgeräte	Sonifier 250	Branson
	Sonorex Super RK 514 H	Bandelin
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Basic, MCI Research RC 210 D	Sartorius
	Precision Advanced	OHAU®
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417 C	Eppendorf
	Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf
	Universal 30 F	Hettich
	KR 22 i (Rotor: AK 500-11, 155 mm)	Jouan
	G412	Jouan
	Sorvall RC - 5B (Rotor: SA 600)	Du Pont Instruments

1.2. Chemikalien, Enzyme und weitere Verbrauchsmaterialien

ARK Scientific GmbH, Darmstadt	DNA-Primer
Biometra	PAGE-PLUS Lösung
Biomol	IPTG
BIO-RAD Laboratories, Richmond, USA	LMW-Standard für SDS-PAGE
Boehringer Mannheim, Mannheim	Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, DIG Nucleic Acid Labeling and Detection Kit, RNase (DNase-frei), Alkalische Phosphatase (CIP), X-Gal
CLONTECH Laboratories, Palo Alto, USA	KlenTaq LA-Polymerase Mix
DIFCO-Laboratories, Detroit, USA	Malzextrakt, Soytone (Sojabohnenmehl) Trypton, Pepton, Hefe-Stickstoff-Basis
Fisher Scientific International Company	n-Hexan
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz	Agar, Ampicillin (Na-Salz), Bromphenolblau, $CaCl_2$, Coomassie Brilliant Blue, DMF, EDTA, Ethidiumbromid, D-Glucose, Hefe-extrakt, β-Ionon, Kanamycin, Lysozym, $MgSO_4$ (wasserfrei), D-Mannitol, Methanol, NaCl, Natriumdithionit, PEG 6000, Saccharo-se, SDS, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, TEMED, Triton®X-100
Gibco BRL GmbH, Eggenstein	1 kb-Ladder (Standard für Agarosegele), Re-striktionsenzyme, TSB
IBA, Institut für Bioanalytik	Anhydrotetracyclin
INTERACTIVA Biotechnologie, Ulm	DNA-Primer
MBI Fermentas, St. Leon-Rot	Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, alkalische Phosphatase, Taq-Polymerase
Merck, Darmstadt	Eisessig, α-Ionon, DC-Platten (0.2 mm, Silika 60 F_{254}), HPLC Wasser

MWG, Ebersberg	DNA-Primer
New England BioLabs, Beverly, MA USA	Restriktionsenzyme
Perkin Elmer, Weiterstadt	Big Dye^{TM} Terminator Cycle Sequencing Ready Eaction Kit
Pharmacia LKB, Freiburg	Ultrapure dNTP-Set für DNA-Sequenz-Reaktionen
Pierce, USA	BCA-Protein Detection Kit
Qiagen GmbH, Hilden	Genomic-tip 20/G, Midi Plasmid Kit, Spin Mini Plasmid Kit, QIAamp Tissue Kit, QIA-quick Gel Extraction Kit
Riedel-de-Haën	Aceton, Citronensäure, Diethylether, DMSO, Essigsäureethylester, Glycin
Roth GmbH, Karlsruhe	Rotiphorese NF-10x TBE-Puffer, NF-Acryl-amid/Bis-Lsg. 40% (19:1), NF-Harnstoff, Roti-Phenol/Chloroform
Schleicher & Schuell, Dassel	diverse Papierfilter
Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg	Agarose, Lysozym
Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen	Corn Steep Liquor, Nalidixinsäure, Chlor-amphenicol, Ammoniumpersulfat, Dimethyl-formamid
Stratagene	Pfu-Polymerase, Turbo-Pfu-Polymerase
Whatman International Ltd., Maidstone, England	3MM Filterpapier

1.3. Mikroorganismen

1.3.1. Organismen für molekularbiologische Arbeiten

Bis auf den Stamm *S. griseus*, der auch zur Biotransformation eingesetzt wurde, wurden alle in Tabelle 7 aufgeführten Stämme ausschließlich zu Klonierungsarbeiten eingesetzt.

Tabelle 7: Mikroorganismen für molekularbiologische Arbeiten

Species	Stamm	Eigenschaften	Referenz
Escherichia coli	DH5α	*Sup E44 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*	(Hanahan, 1983)
Escherichia coli	JM105	*thi-1 rpsL endA sbc BC thi-1 hsdR4 Δ(lac-proAB) [F' traD36 lac^{q}ZΔM15]*	(Yanisch-Perron et al., 1985)
Escherichia coli	JM 109	*e14-(McrA-) recA1 endA1 gy-rA96 thi-1 hsdr17(rκ- mκ+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacl^{q}ZΔM15]*	(Yanisch-Perron et al., 1985)
Escherichia coli	JM110	*LacY dam dcm Δ(lac-proAB) [F' lacl^{q}Z ΔM15]*	(Yanisch-Perron et al., 1985)
Escherichia coli	ET12567	*F- dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR*	(MacNeil et al., 1992)
Escherichia coli	XL1-Blue	*recA1 hsdr17 relA1 lac[F' lacl^{q}ZM15 Tn10(Tet^r)]*	(Bullock et al., 1987)
Streptomyces lividans 66	Tk 23	*spc*-1, plasmid frei	(Hopwood et al., 1983)
Streptomyces griseus	ATCC 13273		

1.3.2. Organismen für das Screening

In Tabelle 8 und 9 sind die Stämme aufgeführt, die für das Screening auf Hydroxylierungsaktivität von α- und β-Ionon eingesetzt wurden.

Tabelle 8a: Bakterienstämme, die für das Screening eingesetzt wurden

Spezies	Stamm	Metabolit	Referenz
S. aureofaciens	Tü 1	Synergistin	ETH 267
S. cinereoruber	Tü 2	Cinerubin	ETH 6143, DSM 40629
S. phaeochromogenes	Tü3	Angolamycin	ETH 6282
S. antibioticus	Tü 4	Angolamycin	ETH 6677, NRRL 2539
S. olivaceus ssp. atratus	Tü 5	Narbomycin	ETH 7346
S. griseus	Tü 6	Chloro-Genestein, Dichloro-G	ETH 7419, DSM 40693
S. olivaceus	Tü 7	Granaticin	NRRL 2716, ETH 7437
S. antibioticus	Tü 8	Rhodomycin	NRRL 2589, ETH 7451, PSAM 291
S. griseoflavus	Tü 9	Carbomycin	ETH 7534, PSAM 91
S. griseus	Tü 10	Nonactin	ETH 7796, DSM 40695, PSAM 197
S. fradiae	Tü11	Streptolin	NRRL 2598, ETH 7907
S. echinatus	Tü 12	Echinomycin	ETH 8331, DSM 400132
S. aureofaciens	Tü 13	Spiramycine	ETH 8703, DSM 40697
S. michiganensis	Tü 14	Actinomycin X	ATCC 14970, ETH 9001
S. griseoflavus	Tü 15	Ferrimycine	NRRL 2717, ETH 9578
S. griseus	Tü 16	Danubomycine	NRRL 2719, ETH 9990
S. griseus	Tü 17	Grisein	ETH 10073
S. griseus	Tü 18	Viomycin	ETH 10112, ATCC 11896
S. griseus	Tü 19	Streptomycin	ETH 4289
S. diastatochromogenes, galileus	Tü 20	Cinerubin	ETH 10908
S. tendae	Tü 21	Carbomycin	DSM 40101, PSAM 92, ETH 11313
S. violaceoruber	Tü 22	Granaticin I und II	ETH 11382, PSAM 203
S. olivaceus	Tü 23	Pikromycin	ETH 6445, DSM 40702
S. aureofaciens	Tü 24	Aureomycin	ETH 13387, PSAM 93
S. griseus	Tü 25	Streptorhodin	ETH 10289
S. antibioticus	Tü 26	Actinomycin X	ETH 10289
S. fradiae	Tü 27	Actinomycin X	ETH 13584
S. violaceus, S. purprascenss	Tü 28	Rhodomycin	PSAM 193
S. fradiae	Tü 29	Neomycin	ETH 9440, NRRL 2599
S. prasinus	Tü 30		ETH 13815
S. lavendulae	Tü 31	Cycloserin	ETH 14322, DSM 40094
S. griseus	Tü 33	Holomycin	ETH 17474, DSM

			40707
S. ramulosus	Tü 34	β-Oxotryptamines	ETH 17653, DSM 40100
S. lavendulae	Tü 35	Megacidin	ETH 18390, DSM 40708
S. diastatochromogenes	Tü 36	Ferrimycin, Cinerubin	ETH 18822
S. griseoflavus	Tü 37	Cristallomycin	ETH 18897
S. violaceoniger	Tü 38	Lankamycin, Lankacidin	ETH 20388, NRRL 2834
S. fradiae	Tü 39	Chloractinomycin, Actinomycin Z	ETH 20675, NRRL 2765
S. griseus	Tü 40	Actinomycin 5	ETH 21035
S. albogriseolus	Tü 41	Chalkomycin	ETH 21066, NRRL 2835
S. hirsutus	Tü 42	Hydrophiles Antibiotikum	ETH 16660
S. lavendulae	Tü 43	Ferrimycin	ETH 21510, NRRL 2856
S. pilosus	Tü 44	Ferrioxamine	ETH 21748, DSM 40714
S. reticuli	Tü 45	Leucomycine	ETH 21772
S. antibioticus	Tü 46	Okandomycin	ETH 22014, DSM 40715
S. lavendulae	Tü 47		
S. aureofaciens	Tü 48	Succinimycin	ETH 22765, NRRL 2858
S. glaucescens	Tü 49	Tetracenomycin, Hydrostreptomycin	ETH 22794
S.	Tü 50		
S. flaveolus ssp. herbiferi	Tü 51	Hydroxystreptomycin	ETH 22958
S. griseoflavus	Tü 52	Acumycin, Makrotetrolid	ETH 23112, DSM 40717
Micomonospora species	Tü 53		ETH 20242, NRRL B-944
S. aureofaciens-22765	Tü 54	Succinimycin	ETH 23269
S. flaveolus	Tü 55	Ferroverdin	ETH 23870
S. exfoliatus	Tü 56	Ferrioxamin	ETH 23310, DSM 40720
S. viridochromogenes	Tü 57	Avilamycin	ETH 23575
S. rimosus	Tü 58	Oxytetracyclin	ETH 23801
S.	Tü 59		
S. tendae	Tü 61	Chloractinomycin, Actinomycin V	ETH 24522
S. parvulus	Tü 64	Dihydrophenylalanin, Manumycin	ETH 25000, DSM 40722
Nocardia sesteroides	Tü 67		ETH 23893, NCTC 6761
S. reticuli	Tü 68	Streptovaricin	ETH 27148
Nocardia brasiliensis	Tü 69	Ferrioxamin E	ETH 27413
Streptosporangium roseum	Tü 74	kein Metabolit	ETH 28349

S. mediterranei, S. spectabilis	Tü 75	Rifomycin	
S.	Tü 81		
S. aureofaciens	Tü 95	Scopamycin	ETH 28832, DSM 40724
S. antibioticus	Tü 99	Chlorothr., Bromothr., Ketomycin	ETH 31305, DSM 40725
S.	Tü 100		
S. flaveolus	Tü 101	Makrotetrolide	ETH 31442
S. viridochromogenes	Tü 102	kein Metabolit	ETH 31637
S.	Tü 103		ETH 31814
S.	Tü 104		ETH 31898
S. collinus	Tü 105	Naphthomycin	ETH 31903, DSM 40726
S.	Tü 106		
S.	Tü 107		ETH 31950
S.	Tü 108		ETH 31959
S. arenae	Tü 109	L-2,5-Dihydrophenylalanin	ETH 31965
S. lavendulae	Tü 110		
S.	Tü 111		
S.	Tü 112		ETH 32002
S. parvulus	Tü 113	Borrelidin (+ Netropsin)	
S.	Tü 114		ETH 32032
S. aureofaciens	Tü 117	Lipomycin α, β	ETH 32055, DSM 40729
S.	Tü 118		ETH 32084
S.	Tü 120		ETH 32344
S. collinus	Tü 121		ETH 31896
S.	Tü 122		ETH 31148
S.	Tü 123		ETH 32440
S.	Tü 124		
Pichia farinosa	Tü 291		
S. echinatus ssp. afghanensis	Tü 303	Aranciamycin	DSM 40730
S.aureofaciens, S. netropsis	Tü 342	Rutamicin B, Ventrucidine A + B	DSM 40731
S.	Tü 345	Cf Anthracyclin	
S. tendae	Tü 353	Naphthomycin B	DSM 40732
S. collinus	Tü 365	Kirromycin (Mocimycin)	DSM 40733
S.	Tü 379	Naphtocyclin	CGP 18319
S. olivaceus	Tü 382		
S.	Tü 388	Cycloserin + Carbomyl-D-Serin	
S. griseoviridis ssp. fragilsis	Tü 430	Azaserin	
S. albus ssp. rimosus	Tü 441	kein Metabolit	
S. arenae	Tü 469	Arenaemycin C, D, E	DSM 40734
S. exfoliatus	Tü 472	Thraustomycin	DSM 40735
S. lavendulae	Tü 492	kein Metabolit	

S. viridochromogenes	Tü 494	Phosphinothricin	ETH 40736
S. arenae	Tü 495	Naphtocyclin α, b, γ	
S. echinatus, arenae	Tü 718	Aranciamycin	
S. albus	Tü 735	Tetracyclin	ATCC 3004
S. griseus	Tü 781		
S. griseus	Tü 781/A	Stenothricin	
S. griseus	Tü 781/B		
S.	Tü 784	Valinomycin	CBS 41168
S.	Tü 844		
S. antibioticus	Tü 895		
S. tendae, S. galbus	Tü 901	Ketomycin	GP 1987/1988
S. tendae	Tü 901/8c	Nikkomycin	
S. tendae	Tü 901/S2566	Nikkomycin	
S. violaceoniger	Tü 905	Elaiophylin (Azalomycin B)	
S. violaceoniger	Tü 929	Magnesiolydigin	
S.	Tü 949		
S.	Tü 989		
S. fradiae	Tü 1023	Venturicidin A	
S. tendae	Tü 1028		
S.	Tü 1058		
S.	Tü 1062	Kirromycin	
Streptoverticillum mobaraense	Tü 1063	Reticulol, Pulvomycin	
S.	Tü 1064		
S. lavendulae	Tü 1067		
S. michiganensis ssp. cavourensis	Tü 1074	Methoxyphenyl-Acetamidpropan	
S. griseus ssp. cretosus	Tü 1098		
S. griseoviridis	Tü 1119	Antifungisches Antibiotikum	
S. cinnamomeus	Tü 1124	Aureothin (Mycolutein)	
S. griseus ssp. cretosus	Tü 1156		
S.	Tü 1179		
S. collinus	Tü 1182		
S.	Tü 1184		
S. exfoliatus ssp. tuftformis	Tü 1250	Nikkomycin X	
S.	Tü 1280		
S. pilosus	Tü 1287		
S. griseoflavus	Tü 1306	Tirandamycin A, B	
S.	Tü 1309		
S.	Tü 1310		
S.	Tü 1328		
S.	Tü 1329		
S.	Tü 1347		
S.	Tü 1358		
S.	Tü 1369	Actinomycin	
S. olivaceus	Tü 1373		
S. arenae (S. echinatus)	Tü 1374	Charteusin	

S. violaceoniger, S. sioyaensis	Tü 1375		
S. griseus ssp. cretosus	Tü 1376		
S. olivaceus	Tü 1379	Imacidin B, C, Prodigiosin	Ciba (Basel)
S.	Tü 1418		
S. exfoliatus	Tü 1424		
S. griseus	Tü 1452		
S. griseus	Tü 1457	Inoferin	
S. aureocirulatus	Tü 1471	Manumycin	TSM 846, Ciba (Basel)
S. violaceoniger	Tü 1606		
S.	Tü 1607		
S. violaceoniger ssp. Xantholiticus	Tü 1612		
S.	Tü 1613	Nocarclamin	
S.	Tü 1615	Nocarclamin	
S.	Tü 1616	Nocarclamin	
S.	Tü 1617		
S.	Tü 1654		
S.	Tü 1657		
S. antibioticus ssp. griseorubiginosus	Tü 1661	Depsichlorine, Peptidlacton	
S. lavendulae	Tü 1668	Ketalin	
S.	Tü 1674	Antimycin	
S. viridochromogenes	Tü 1678/2	Streptazolin	
S.	Tü 1687		
S.	Tü 1714		
S. antibioticus	Tü 1718	Butyrolacton	
S.	Tü 1730		
S.	Tü 1748		
S.	Tü 1753	O-Carbamoyl-Serin	
S.	Tü 1782		
S. violaceoniger platensis	Tü 1792	Streptolydigin	CGP 18465
S.	Tü 1835		
S.	Tü 1887	Danomycin	
S. albaduncus	Tü 1888	Danomycin	
S. collinus	Tü 1892	Ansatrienin A1, A2, A3, B	
S. fradiae ssp. fragilis	Tü 1899		
S. olivaceus	Tü 1907	Bafilomycin	CGP 33520, TMS 290
S. griseus ssp. sulphurus	Tü 1922	Bafilomycin, Bafilanycin-glyc.	
S.	Tü 1925		
S. diastatochromogenes	Tü 1944		
S.	Tü 1960		
S. griseoviridis	Tü 1963		
S. antibioticus ssp. bikiniensis	Tü 1971		
S .galbus, S. naganishii	Tü 1975		
S.	Tü 1984		
S. parvulus	Tü 1989		

S.	Tü 2024		
S. albus ssp. aminophilus	Tü 2031	Bicycloamid, Bacimethrin	
S. diastatochromogenes	Tü 2038	Nikkomycin	
S. galbus ssp. griseosporeus	Tü 2044		
S.	Tü 2074		
S. galbus ssp. griseospreus	Tü 2139		
S. exfoliatus ssp. salmomicidus	Tü 2187	Geldanamycin	
S. venezuelae	Tü 2193		
S.	Tü 2200		
S. macrosporus	DSM 41449		ATCC 51533, IFO 14748, INMI 2892, JCM 6305
S. megasporus	DSM 41476		ATCC 43688, INA M-22, INMI 2869, JCM 6269
S. thermolineatus	DSM 41451		IFO 14750, JCM 6307
S. thermoviolaceus subsp. Thermoviolaceus	DSM 41391		
S. thermoviolaceus subsp. Apingens	DSM 41392		ATCC 19994, CBS 140.67, JCM 4312, NCIMB 10077
S. hygroscopicus	Lu 1537		ATCC 19040
Amycolatopsis mediterranei	DSM 5908	Balhimycin	
B. pallidus	DSM 3670		ATCC 51176, (Scholz et al., 1987)
B. species	DSM 2349	Isocitrat Lyase	
B. species	DSM 2641		IFO 15317
B. species	DSM 5310		
B. species	DSM 6499		
B. stearothermophilus	DSM 297		ATCC 12976, CCM 2183, NCIB 8919
B. thermoglucosidasius	DSM 2542	Exo-Oligo-1,6-glucosidase	(Suzuki et al., 1983)
B. thermoleovorans	DSM 5366		(Zarilla undPerry, 1987)
B. thermocatenulatus	DSM 730		(Golovacheva et al., 1975)
Rhodococcus ruber	Lu 8510		DSM 8316
Ps. fluorescens	Lu 8412		

S.: *Streptomyces*; *B.*: *Bacillus*; *Ps.*: *Pseudomonas*; ATCC: American Type Culture Collection, Maryland, USA; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande; CMI: C. A. B. International Mycological Institute; DSM: Deutsche Stammsammlung, Braunschweig; ETH: Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich; IFO: Institut for Fermentation, Osaka, Japan; Lu: Stammsammlung der BASF AG, Ludwigshafen; NCTC: National Collection of Type Cultures, London, Großbritannien; NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Illinois, USA; Tü: Institut für Biologie II, Universität Tübingen.

Tabelle 8b: Pilzstämme, die für das Screening eingesetzt wurden

Species	Stamm	Metabolit	Referenz
Aspergillus niger	LCP 521		
Aspergillus niger	Lu 931		ATCC 11394, CMI 76837
Inonotus hispidus	Lu 6007		ATCC 28754
Beauveria bassiana	Lu 6343		
Rhizoctania solani	Lu 6370		DSM 852, ATCC 13250, CBS 130.14
Humicola fuscoatra	Lu 7622		

LCP: Musèe National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Cryptogamie, Paris, Frankreich; weitere Abkürzungen siehe Tabelle 8.

1.4. Plasmide und Vektoren

Tabelle 9: Verwendete Plasmide

Vektor	Größe [kb]	Wirt	Merkmale	Referenz
pK18/19	2,69	*E. coli*	aphII, Kan^r, LacZ'	(Pridmore, 1987)
pUC18/19	2,69	*E. coli*	bla, Amp^r, LacZ	(Vieira undMes-sing, 1982)
PCYTEXP1	5,0	*E. coli*	cIts857, Amp^r P_RP_L,	(Belev et al., 1991)
pASKIBA1	3,22			(Schmidt et al., 1996; Schmidt undSkerra, 1994)
pJOE2775	5,124	*E. coli*	bla, Amp^r, rhaP	(Krebsfänger et al., 1998)
pIJ702	5,84	*S. lividans*	Tsr^r, Mel	(Katz et al., 1983)
pGM160	7,7	*S. lividans*	bla, aaaC 1, Tsr^r,	(Muth et al., 1989)

1.5. Primer

Tabelle 10: In der Arbeit eingesetzte Primer

Name	**Sequenz (5‘- ⟶ - 3‘)**
Primer 1 (30 mer)	GAC CCS CCS GAG CAC GGS CGS CTS CGS CGS
Primer 1’ (36 mer)	GCT CTA GAC CCS CCS GAG CAC GGS CGS CTS CGS CGS
Primer 2.1 (30 mer)	CTS CTS GTS GCS GGS CAC GAG ACS ACS GCS
Primer 2.2 (30 mer)	SGC SGT SGT CTC GTG SCC SGC SAC SAG SAG
Primer 3 (27 mer)	SCC SAG GCA CTG GTG SAC SCC GAA SCC
Primer 3’ (34 mer)	GGA ATT CSC CSA GGC ACT GGT GSA CSC CGA ASC C
27P1 (17 mer)	CAC GAC TTC TTC CAG CG
27P2 (17 mer)	GCA ACC CGG ACC AAC TC
27PR (18 mer)	CAG TGC GAA CGC CTC CAC
27PF	GCC AAC GAC ATC GCC AAC
27Q1 (16 mer)	CTC CCG CGA CTT CGT G
27Q2 (16 mer)	GGT GCT GCT GGA CGA C
27QR (18 mer)	CTT GGC CAG CAT GTC GTC
27QF (18 mer)	GTC TCC ATC ACC CTG ATG
27PA (24 mer)	GGT GAC GGC CCC CTT CAC GAT CAG
27PE (24 mer)	CGA AGC CGA AGG CGA CAT GGC GGC
27QA (26 mer)	GCT GAT CCC CAG CTT CGG CGT CAA GC
27QE (24 mer)	GCG GTT CAT CAG GGT GAT GGA GAC
PGW1 (23 mer)	GCT GGA GGA CAT CGA GAT CGA CG
PGW2 (24 mer)	GCC GCC ATG TCG CCT TCG GCT TCG
AP-EcoRI (25 mer)	CGA GGA ATT CGG GGG GGG GGG GGG G
PGW3 (22 mer)	GTG GCG CTG GAA GAA GTC GTG C
PGW4 (24 mer)	GGC GAG CAT CTC CTC GAT CAG GTC
soyC1A (31 mer)	GAG GCG ACC CGA TCA TAT GAC GGA ATC CAC G
soyC1B (30 mer)	CCC TTA AGA TGA CGG AAT CCA CGA CGG ACG
soyC1C ((30 mer)	CCG AAT TCA TGA CGG AAT CCA CGA CGG ACG
soyC2A (31 mer)	CGC GGA TCC TCA CCA GGC CAC GGG CAG GTC G
soyC2B (28 mer)	CGC GGA TCC CCA GGC CAC GGG CAG GTC G
soyC1 (15 mer)	TAC TGG CGG ACC CGC
soyC2 (15 mer)	ATG GAG CGA CAA GGG
soyC3 (17 mer)	ACG AAC TCG AGG AGT AC
soyC4 (15 mer)	AGC CAC CCC GAA CAG
soyC5 (14 mer)	AGA CAC TCG ACT GG

mit S = G/C

1.6. Verwendete Datenbanken

Verwendung	Programm	URL
Protein- und Gensequenzen	Sequence retrival system (Swiss-Prot)	http://expasy.hcuge.ch/srs5/
Multalign	Sequenzalignment	http://www.toulouse.inra.fr. multalin.html

2. Medien, Puffer und Lösungen

2.1. Nährmedien

Alle Angaben beziehen sich auf 1 l H_2O. Für Festmedien wurden, wenn nicht anders angegeben, 16 g Agar zugesetzt.

Cullum-Medium:	Sojabohnenmehl	20.0 g
	D-Mannitol	20.0 g
HA-Medium		
zur Anzucht von Streptomyceten:	Glucose	4.0 g
	Malzextrakt	10.0 g
	Hefeextrakt	4.0 g
	Leitungswasser	ad 1000 ml
		pH 7.0
Medium zur Anzucht von *Bacillus*:	Pepton	5.0 g
	Fleischextrakt	13.0 g
	bzw.	
	Nutrient Broth	13.0 g
		pH 7.3
LB-Medium		
(modifiziert nach Luria-Bertani):	Trypton	10.0 g
(Sambrook et al., 1989)	Hefeextrakt	5.0 g
	NaCl	5.0 g
		pH 7.5
MS-Medium:	Sojabohnenmehl	20.0 g
	Mannitol	20.0 g
	nach Autoklavieren Zugabe von 10 ml $MgCl_2$ (1 M)	
NB-Weichagar:	Nutrient Broth	8.0 g
	Agar	5.0 g

R3-Weichagar:	Saccharose	171.0	g
(Shirahama et al., 1981)	Glucose	10.0	g
	Pepton	4.0	g
	KCl	0.5	g
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	8.1	g
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.2	g
	Agar	8.0	g
	in 860 ml H_2O autoklavieren und folgende sterile Lösungen zusetzen:		
	0.5% K_2HPO_4	40.0	ml
	250 mM TES pH 7.2	100.0	ml
R5-Medium:	Saccharose	103.0	g
	Glucose	10.0	g
	K_2SO_4	0.25	g
	$MgCl_2$	10.12	g
	Casaminoacids	0.1	g
	Hefeextrakt	5.0	g
	TES	5.73	g
	Agar	18.0	g
	Spurenelemente	2.0	ml
		in 900 ml $H_2O_{bidest.}$	
	nach Autoklavieren getrennt zugeben:		
	3,68% $CaCl_2$	80.0	ml
	0.54% KH_2PO_4	10.0	ml
	20.0% L-Prolin	15.0	ml
	1 N NaOH	8.0	ml
S-Medium (modifiziert nach Okanishi):	Pepton	4.0	g
(Okanishi et al., 1974)	Hefeextrakt	4.0	g
	K_2HPO_4	4.0	g
	KH_2PO_4	4.0	g

	Glycin	10.0	g
		in 800 ml $H_2O_{bidest.}$	
	nach Autoklavieren getrennt zugeben:		
	Glucose	10.0	g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	g
		in 200 ml $H_2O_{bidest.}$	
Soc-Medium:	Bacto-Trypton	2.0	%
	Hefeextrakt	0.5	%
	Glucose	20	mM
	NaCl	10	mM
	$MgCl_2$	10	mM
	$MgSO_4$	10	mM
	KCl	2	mM
TSB-Medium:	Tryptic Soy Broth	30.0	g
YEME-Medium:	Saccharose	340.0	g
	Glucose	10.0	g
	Pepton	5.0	g
	Hefeextrakt	3.0	g
	Malzextrakt	3.0	g
	in 973 ml H_2O autoklavieren und folgende sterile Lösungen getrennt zugeben:		
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (2.5 M)	2.0	ml
	Glycerin (20 %)	25.0	ml
Medien für die Biotransformation:			
Medium I:	Nutrient Broth	8.0	g
	Hefeextrakt	10.0	g
	Glucose	5.0	g
		pH 7.0	

Medium II:	$(NH_4)_2SO_4$	5.0	g
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0.5	g
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.05	g
	K_2HPO_4	3.6	g
	KH_2PO_4	1.5	g
	Glucose	2.0	g
	$FeSO_4 \cdot H_2O$	0.2	g
	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	10	mg
	$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	3	mg
	H_3BO_3	30	mg
	$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	20	mg
	$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	1	mg
	$NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$	2	mg
	$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	3	mg
	Titriplex III	0.5	g
		pH 7.0	
Medium III:	Glucose	15.0	g
	Sojabohnenmehl	15.0	g
	Corn steep liquor	5.0	g
	NaCl	5.0	g
	$CaCl_2$	2.0	g
		pH 7.0	
Medium IV:	D-Mannitol	20.0	g
	Sojamehl, vollfett	20.0	g
	Leitungswasser	ad. 1000 ml	
		pH 7.5	

2.2. Puffer und andere Lösungen

Phenol/Chloroform (neutral):	Phenol (pH 8.0) im Verhältnis 1:1 mit Chloroform mischen		
Phenol/Chloroform (sauer):	Aqua-Phenol (pH 5.0) im Verhältnis 1:1 mit Chloroform mischen		
LI-Lösung (Kieser, 1984):	Tris-HCl	25	mM
	EDTA, pH 8.0	25	mM
	Saccharose	300	mM
Lysozymmix:	Tris/HCl, pH 8.0	30	mM
	EDTA	50	mM
	NaCl	50	mM
dNTP-Mix:	dATP (100 mM)	2.5	µl
	dCTP (100 mM)	2.5	µl
	dGTP (100 mM)	2.5	µl
	dTTP /100 mM)	2.5	µl
	$H_2O_{bidest.}$	90.0	µl
modifizierter Protoplastierungspuffer: (Yamamoto et al., 1986)	Saccharose	200.0	g
	K_2SO_4	0.25	g
	$MgCl_2$ (1M)	5.0	ml
	Spurenelemente	2.0	ml
	in 890 ml $H_2O_{bidest.}$ getrennt autoklavieren; dazu:		
	KH_2PO_4 (40 mM)	10.0	ml
	$CaCl_2$ (1M)	0.2	ml
	TES (0.25 M; pH 8.0)	100.0	ml

Spurenelement -Lösung:	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	200	mg
	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	10	mg
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	10	mg
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	10	mg
	$MgCl_2 \cdot 4H_2O$	10	mg
	$ZnCl_2$	40	mg
		in 1 l H_2O	
STE-Puffer:	Saccharose	8	%
	Tris	50	mM
	EDTA	50	mM
		pH 8.0	
TE-Puffer:	Tris	10	mM
	EDTA	1	mM
		pH 8.0	
Transformationspuffer:	Saccharose	2.5	%
(Thompson et al., 1982)	PEG 1000	25.0	%
	K_2SO_4	1.4	mM
	KH_2PO_4	0.4	mM
	Tris-Maleat (pH 8.0)	50.0	mM
	$MgCl_2$	10.0	mM
	$CaCl_2$	10.0	mM
	Spurenelement-Lösung	3.0	ml
	alle Lösungen getrennt autoklavieren		
TSS (Chung et al., 1989):	PEG 6000	10	% (M/V)
	DMSO	5	% (M/V)
	$MgCl_2$	5	% (M/V)
	mit LB-Medium auf 100 ml auffüllen, pH 6.5		

Puffer für die Schnellisolierung von Plasmid-DNA:

Resuspendierungs-Puffer:	Tris/HCl (pH 7.5)	100	mM
	EDTA	10	mM
	RNase I	250	µg/ml
Lyse-Puffer:	NaOH	0.2	M
	SDS	1.0	% (M/V)
Neutralisierungs-Lösung:	Kaliumacetat	29.4	g
	Eisessig	11.5	ml
	H_2O	28.5	ml

Puffer für die Isolierung von Plasmid DNA mit Anionenaustauscher-Säulen (Qiagen)

P1-Puffer (bei 4°C lagern).	Tris/HCl (pH 8.0)	50	mM
	EDTA	10	mM
	RNase A	100	µg/ml
P2-Puffer (Lyse-Puffer):	NaOH	200	mM
	SDS	1	%
N3-Puffer (Neutralisierungs-Puffer):	Kaliumacetat (pH 5.5)	3.0	M
QBT-Puffer (Äquilibrierungs-Puffer):	NaCl	750	mM
	MOPS (pH 7.0)	50	mM
	Isopropanol	15	%
	Triton®X-100	0.15	%
QC-Puffer (Wasch-Puffer):	NaCl	1.0	M
	MOPS (pH 7.0)	50.0	mM
	Isopropanol	15.0	%
QF-Puffer (Elutionspuffer):	NaCl	1.25	M
	Tris/HCl (pH 8.5)	50.0	mM
	Isopropanol	15.0	%

Puffer und Lösungen für die Southern Hybridisierung:

Standardlösungen:

Denaturierungs-Lösung:	NaOH	0.5	M
	NaCl	1.5	M
Denaturierungs-Lösung 2 für Koloniehybridisierung:	NaOH	0.5	M
	NaCl	1.5	M
	SDS	0.1	%
Neutralisierungs-Lösung (pH 8.0):	Tris (pH 8.0)	0.5	M
	NaCl	1.5	M
Neutralisierungs-Lösung 2 (pH 7.5) für Koloniehybridisierung:	Tris (pH 7.5)	1.0	M
	NaCl	1.5	M
20 x SSC:	NaCl	175.32	g
	Na-Citrat	88.0	g
		pH 7.0	
Hybridisierungslösung mit Formamid (100 ml):	Formamid (deionisiert)	50.0	ml
	20 x SSC	25.0	ml
	N-Laurosylsarkosin (35 %)	0.28	ml
	SDS (10 %)	0.2	ml
	10 x Blocking-Reagenz Lösung	20.0	ml
	H_2O	4.5	ml
Puffer 1 (Maleat-Puffer, pH 7.5):	Maleinsäure	11.61	g
	NaCl	8.77	g
Puffer 2 (Blocking-Lösung):	Blocking Reagenz in Puffer 1	1.0	%

Puffer 3 (Detektions-Puffer, pH 9.5):	Tris	12.2	g
	NaCl	5.8	g
	$MgCl_2$	10.1	g
		pH 9.5	

Puffer für die Isolierung genomischer DNA mit Anionenaustausch-Säulen:

Puffer B1 (Lyse-Puffer):	Tris/HCl (pH 8.0)	50	mM
	EDTA (pH 8.0)	50	mM
	Tween®-20	0.5	%
	Triton®X-100	0.5	%
Puffer B2 (Lyse-Puffer):	Guanidin/HCl	3.0	M
	Tween®-20	20.0	%

Puffer und Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese:

1 %-Agarosegel:	Agarose	4.0	g
	TAE 1 x	400	ml
50 x TAE-Puffer:	Tris	242	g/l
	Eisessig	57	ml
	EDTA (0.5 M, pH 8.0)	100	ml
6 x DNA-Auftragspuffer:	Glycerin	30	% (M/V)
	Bromphenolblau	0.2	% (M/V)
	EDTA (pH 7.5)	5	mM

Puffer und Lösungen für SDS-PAGE:

Lower Tris 4 x (200ml):	Tris	36.46	g
	SDS	0.8	g
		pH 8.8	
Upper Tris 4 x (200 ml):	Tris	12.11	g
	SDS	0.8	g
		pH 6.8	

Trenngel (12.5 %):	Acrylamidlösung (30 %)	3.33	ml
	Lower Tris 4 x	2.0	ml
	$H_2O_{bidest.}$	2.67	ml
	TEMED	4.0	µl
	Ammoniumpersulfat (10 %)	40.0	µl
Sammelgel (4 %):	Acrylamidlösung (30 %)	0.52	ml
	Upper Tris 4 x	1.0	ml
	$H_2O_{bidest.}$	2.47	ml
	TEMED	4.0	µl
	Ammoniumpersulfat (10%)	40.0	µl
5 x Laufpuffer:	Tris	15	g/l
	Glycin	72	g/l
	SDS	10	% (M/V)
		pH 8.3	
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)
<u>Coomassie-Färbung</u>:			
Färbelösung:	Coomassie-Brillant Blue R-250	0.1	% (M/V)
	Methanol	30	% (V/V)
	Eisessig	10	% (V/V)
Entfärbelösung:	Methanol	30	% (V/V)
	Eisessig	10	% (V/V)

2.3. Medienzusätze

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Medienzusätze sind in Tabelle 11 zusammengefaßt:

Tabelle 11 : Verwendete Hemmstoffe und andere Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung	gelöst in	Anwendungskon-zentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	$H_2O_{bidest.}$	100 µg/ml
Apramycin	75 mg/ml	$H_2O_{bidest.}$	75 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	25 mg/ml	$H_2O_{bidest.}$	40 µg/ml
Erythromycin	50 mg/ml	DMSO	50 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml	$H_2O_{bidest.}$	50 µg/ml
Thiostrepton (Tsr)	50 mg/ml	DMSO	50 µg/ml
Trimethoprim	50 mg/ml	$CHCl_3$/EtOH (1:1)	50 µg/ml
IPTG	200 mg/ml	$H_2O_{bidest.}$	200 µg/ml
X-Gal	20 mg/ml	DMF	50 µl/Platte
Anhydrotetracyclin (AHT)	2 mg/ml	DMF	0.2-0.6 µg/ml
Rhamnose	20 %	$H_2O_{bidest.}$	0.2 % (M/V)

3. Stammhaltung und Kultivierung

3.1. Stammhaltung und Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

3.1.1. Stammhaltung (Sambrook et al., 1989)

Um Reinkulturen zu erhalten, wurden Verdünnungsausstriche auf LB-Agarplatten mit Zusatz von entsprechenden Antibiotika zur Plasmidselektion hergestellt, die über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend mit Parafilm verschlossen bei 10°C im Kühlraum gelagert wurden. Zur langfristigen Aufbewahrung der Stämme wurden 1,5 ml einer Übernachtkultur abzentrifugiert, das Pellet in einem Gemisch aus 500 µl LB-Medium und 500 µl Glycerin (100%) aufgenommen und bei -80°C gelagert.

3.1.2. Kultivierung und Anzuchtbedingungen

Zur Durchführung von Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab wurden 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum mit einer Einzelkolonie oder 10 µl Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-

DNA bzw. zur Präparation kompetenter Zellen wurden 50 ml LB-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben 1:100 angeimpft und im Schüttler bei 37°C bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert.

3.2. Stammhaltung und Kultivierung von Streptomyceten-Stämmen

3.2.1. Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden die Streptomyceten-Stämme auf HA-Platten bei 28°C kultiviert und nach der Sporulation bei 4°C aufbewahrt. Zur Langzeitkonservierung und um reproduzierbare Sporenmengen für das Animpfen von Flüssigkulturen zur Verfügung zu haben, wurden die auf Cullum-Platten angewachsenen Sporen mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung (3 ml pro Platte) abgeschwemmt. Die Mycelreste wurden durch einen Wattefilter abgetrennt, das Filtrat abzentrifugiert und das Sporenpellet in 500 µl Glycerin (85 %) suspendiert. Gegebenenfalls wurde die Suspension 2 min im Ultraschallbad homogenisiert, bevor sie bei -80°C aufbewahrt wurde.

3.2.2. Kultivierung

Zur Durchführung einer Streptomyceten-Plasmidisolierung im kleineren Maßstab wurde eine homogenisierte Einzelkolonie im Reagenzglas mit S-Medium und entsprechendem Selektionsantibiotikum für 2 - 3 Tage bei 28 - 30 °C inkubiert. Zur Anzucht größerer Mengen Streptomyceten-Kultur wurden 100 ml Selektionsmedium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 2 ml einer homogenisierten Vorkultur beimpft und 2 - 3 Tage bei 28 - 30 °C inkubiert. Ein disperses Wachstum ohne Verklumpen des Mycels wurde durch Verwendung von mit einer Edelstahlfeder (bzw. Schikanen) versehenen Kolben erreicht.

4. Biotransformation von α- und β-Ionon

4.1. Eingangsscreening mit β-Ionon als Substrat

Zu Beginn sollten die Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit hin getestet werden, Ionone zu hydroxylieren. Hierzu wurde β-Ionon als Substrat ausgewählt.

5 ml Medium IV wurden mit dem entsprechendem Organismus angeimpft 24 - 48 h bei 28 - 30°C unter Schütteln (140 rpm) inkubiert. Ein 500 ml Schüttelkolben mit 100 ml Kulturmedium (Medium IV) wurde mit 3 ml der Vorkultur beimpft und bei 30°C weiter inkubiert. Nach 48 h wurde sterilfiltriertes β-Ionon (0.1% [M/V]) zugesetzt. Die Umsetzung wurde nach 5 Tagen abgebrochen. Die Zellen wurden durch Filtrieren abgetrennt und 2 ml des Kulturüberstandes mit n-Hexan/Ethylacetat (2:3) oder Diethylether extrahiert. Die Extrakte wurden durch Dünnschichtchromatographie analysiert (siehe 5.1.). Kontroll-Kultivierungen wurden analog, allerdings ohne Zugabe von β-Ionon durchgeführt. Die Stabilität von β-Ionon in diesem Medium wurde durch Zugabe des Substrats zu diesem Medium unter den Kultivierungsbedingungen getestet.

4.2. Biotransformation von α- und β-Ionon

Die aus dem Eingangsscreening mit β-Ionon als Substrat vorselektierten Stämme wurden in einer weiteren Screening Runde unter den selben Bedingungen eingesetzt. Hierbei wurde täglich eine 1 ml Probe entnommen und unter den gleichen Bedingungen, wie unter 4.1. beschrieben, extrahiert und durch Dünnschicht- und Gaschromatographie auf Umsetzungsprodukte analysiert. Nach 10 - 12 Tagen Kultivierung wurde die Reaktion beendet. Das Zellmycel wurde durch Abfiltrieren abgetrennt und die aufgearbeiteten Überstände einer abschließenden Analyse auf Umsetzungsprodukte unterworfen. Die Umsetzungen mit α-Ionon als Substrat wurden auf die gleiche Weise durchgeführt.

4.3. Aufarbeitung der Kulturüberstände

Der abfiltrierte Kulturüberstand wurden zweimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 50 ml einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde die etherische Lösung im Rotationsverdampfer eingeengt.

5. Untersuchung der Hydroxy-Derivate von α-und β-Ionon

5.1. Dünnschichtchromatographie

Der Verlauf der Umwandlung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Dazu wurde 1 ml einer steril entnommenen Probe mit 500 µl Diethylether versetzt, geschüttelt und 1 min zentrifugiert. Die organische Phase wurde auf eine DC-Platte, Kieselgel 60 F_{254} (Merck), aufgetragen und 6 cm mit n-Hexan/Ethylacetat (3:2) entwickelt. Die Produkt-Punkte wurden zuerst unter UV-Licht (254 nm) detektiert und anschließend mit einem Vanillin-Sprühreagenz (2,5 % (M/V) Vanillin in Ethanol/Schwefelsäure (95:5)) angefärbt. Zur Sichtbarmachung der Flecken wurde die Platte mit einem Heißluftfön 1 min gefönt.

5.2. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie wurde mit einem Carlo-Erba Gaschromatograph MEGA 5300, ausgestattet mit einem Flammenionisations-Detektor, unter den folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Säule (20 m x 0,3 mm Glaskapillare) BONDEX unα-3,8 unβ-3,4-Et-116 (Scherr, 1997) mit einer Filmdicke von 0,2 µm. Als Trägergas wurde H_2 (0,4 bar) und als Lösungsmittel Dichlormethan verwendet. Die Anfangstemperatur war 150°C und wurde mit einem Anstieg von 4°C/min auf 200°C (Endtemperatur) erhöht.

5.3. ^{1}H- und ^{13}C-NMR

Die NMR-Spektren, der in $CDCl_3$ gelösten Proben, wurden mit einem Bruker ARX 500 Spektrometer mit TMS als internen Standard aufgenommen. Die nominale Frequenz für ^{1}H-Spektren betrug 500.13 MHz, die für ^{13}C-Spektren 125.77 MHz.

6. Methoden zur Isolierung und Reinigung von DNA

6.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

6.1.1. Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* für Schnelltests

Mit dieser Methode wurde Plasmid-DNA für Anwendungen isoliert, die weder besonders viel noch besonders reine DNA erforderten (z. B. analytischer Restriktionsverdau). Sie beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Nach vollständiger Lyse der Zellmembran mit Hilfe von SDS wird die entfaltene RNA durch NaOH und RNaseA hydrolysiert, während die chromosomale DNA und die Plasmid-DNA denaturiert werden. Durch Absenken des pH-Wertes renaturiert die Plasmid-DNA, während die chromosomale DNA ein Netzwerk bildet, das zusammen mit den Proteinen ausfällt und abzentrifugiert werden kann. Die Plasmid-DNA kann anschließend durch Isopropanolfällung konzentriert und gereinigt werden.

Durchführung:

1.5 ml einer Übernachtkultur von *E. coli* wurden in einem Eppendorfgefäß 1 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 200 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen. Durch Zugabe von 200 µl Lyse-Puffer wurde die Lösung nach vorsichtigem Schütteln klar. Nach Zugabe des Neutralisationspuffers und anschließendem Invertieren des Eppendorfgefäßes wurden die Proteine und die chromosomale DNA gefällt. Anschließend wurde 5 min bei Raumtemperatur und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 420 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde die Probe 20 min bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals mit 200 µl 70 %igem EtOH gewaschen, zentrifugiert und im Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

6.1.2. Isolierung reiner Plasmid-DNA aus *E. coli* (Spin Mini)

Die Spin-Mini-Plasmidpräparation wurde durchgeführt, um bis zu 20 µg sehr reiner Plasmid-DNA zu gewinnen (z. B. für Sequenzierung, PCR). Sie beruht ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Nach Abtrennung der anderen Zellbestandteile wird die Plasmid-DNA über eine Ionenaustauschersäule gereinigt.

Durchführung:

2 ml einer Übernachtkultur von *E. coli* wurden 1 Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Spin-Mini Plasmidpräparation wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde mit 50 µl TE-Puffer eluiert und direkt weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

6.1.3. Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* (Midi)

Um bis zu 100 µg Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die Midi-Plasmidpräparation eingesetzt. Nach einer alkalischen Lyse erfolgt die Reinigung der DNA über eine Anionenaustauschersäule mit anschließender Isopropanol-Fällung.

Durchführung:

50 ml einer Übernachtkultur wurden 15 min bei 5000 rpm (Hettich) zentrifugiert. Die Midi-Plasmidpräparation wurde mit dem QIAGEN Midi Plasmid Purification Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gereinigte DNA wurde in 250 µl TE-Puffer aufgenommen und direkt weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

6.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Streptomyceten

6.2.1. Mini-Lyse (modifiziert nach (Kieser, 1984))

Die Mini-Lyse dient der relativ schnellen Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus einer Streptomyceten-Kultur, die unter Selektionsdruck in Flüssigkultur kultiviert wurde. Der Abbau der Zellwand erfolgt durch Behandlung mit Lysozym. Die entstehenden Protoplasten werden anschließend durch eine kombinierte Alkali/Detergenz-Behandlung (NaOH/SDS) lysiert. Eine Erhöhung der Temperatur auf 70°C im alkalischen Milieu bewirkt sowohl die Denaturierung der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen als auch den vollständigen Abbau der RNA. Eine anschließende Zugabe von saurem Phenol/Chloroform führt durch Absenken des pH-Wertes zur Renaturierung der ccc-DNA. Die vernetzte chromosomale DNA wird dagegen weitgehend mit den Proteinen ausgefällt. Durch wiederholte Phenolisierung und Alkoholfällung wird die Plasmid-DNA gereinigt und aufkonzentriert. Die auf diese Weise isolierte DNA kann im weiteren durch Restriktionsspaltungen genauer analysiert werden.

Durchführung:

1 ml einer 3 Tage alten Kultur wurde homogenisiert und 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und das Pellet in 500 µl frisch angesetzter L1/Lysozym (2 mg/ml)-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde 45 – 60 min bei 37°C inkubiert und gelegentlich gemischt. Anschließend wurde 250 µl frisch angesetzte 0.3 N NaOH/2 % SDS-Lösung zugegeben, sofort gevortext und 15 min bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 200 µl saures Phenol/Chloroform (pH 5.4) hinzugegeben, sorgfältig gevortext und 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 50 µl saurem Phenol/Chloroform (pH 5.4) versetzt, gemischt und wieder 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde nochmals abgenommen, 1/10 Vol. 3M NaAc und 1 Vol. Isopropanol (-20°C) zugegeben und die DNA mindestens 10 min bei –20°C gefällt. Anschließend wurde 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das DNA-Pellet in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Die DNA-Lösung wurde mit 5 µl 3 M NaAc und 25 µl Phenol/Chloroform (pH 8.0) versetzt, gemischt und 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Zur oberen Phase wurde 2.5 Vol. 98% EtOH (-20°C) zugegeben. Die DNA wurde wieder mindestens 10 min bei –20°C gefällt. Das Pellet wurde 15 min abzentrifugiert und nach Abziehen des Überstandes mit 500 µl 70% EtOH gewaschen. Das DNA-Pellet wurde 10 min bei 60°C getrocknet und in 50 µl TE-Puffer oder H_2O resuspendiert.

6.2.2. Qiagen-Lyse (Brolle et al., 1997)

Mit dieser Methode kann bis zu 50 µg sehr reine Plasmid-DNA eines “low-copy”-Plasmids aus dem Mycel verschiedener Streptomyceten-Stämme isoliert werden. Nach einer alkalischen Lyse erfolgt die Reinigung der DNA über eine Anionenaustauschersäule mit anschließender Isopropanol-Fällung.

Durchführung:

20 ml einer 2-3 Tage alten Kultur wurden bei 4°C und 10.000 rpm (Sorvall, SS-34) für 10 min zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurde das Pellet mit 20 ml 10% Saccharose-Lösung gewaschen und nochmals 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei –70°C eingefroren. Zu dem gefrorenen Pellet wurden 10 ml Puffer 1/RNaseA (100 µg/µl)/Lysozym (4 mg/ml) zugegeben. Die Suspension wurde in ein 15 ml Falcon-Tube überführt und 1 h bei 37°C in einem Rotator bei mittlerer Geschwindigkeit inkubiert. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Zellen in ein 50 ml Falcon-Tube überführt, 10 ml Puffer 2 zugegeben, 4-6

Mal durch Invertieren gemischt und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 10 ml an vorgekühltem Puffer P3 zugegeben, sofort durch Invertieren gemischt und 45 min auf Eis gestellt. Die gefällten Proteine und die chromosomale DNA wurden 30 min bei 15.000 rpm (Sorvall, SS-34) zentrifugiert. Gleichzeitig wurde eine QIAGEN-tip 500-Säule durch Zugabe von 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Der Überstand wurde auf die Säule gegeben und anschließend 2 x mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 15 ml Puffer QF eluiert und mit Isopropanol, wie unter 6.4.2. beschrieben, gefällt. Nach 1 min bei Raumtemperatur wurde die Plasmid-DNA 20 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst.

6.3. Gesamt-DNA-Isolierung aus Bakterien

6.3.1. Isolierung von genomischer DNA aus Bakterien

Bei dieser Methode wird durch eine Lysozymbehandlung die Zellwand abgebaut. Die Zellmembran der so entstandenen Protoplasten wird anschließend durch Detergenzbehandlung zerstört. Die DNA wird durch eine Phenolbehandlung deprotoniert. Nach einer Ethanolfällung liegt die DNA gereinigt vor.

Durchführung:

Die Zellen wurden 2 Tage in HA-Medium bei 30°C kultiviert. 50 ml der Kultur wurde bei 8000 rpm (Sorvall, GSA) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Lysozymmix und einer Spatelspitze Lysozym 30 min bei 30°C unter vorsichtigem Schütteln resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden 2 ml 10 % (M/V) SDS zugegeben und 60 min bei 37°C geschüttelt. Das Lysat wurde im Volumenverhältnis 1:1 mit einer Phenol-Chloroform-Lösung (Roth) versetzt und gevortext. Der Ansatz wurde 30 min bei 5000 rpm (Hettich) abzentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und die Phenolextraktion noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde der Phenolextrakt mit 1/10 Vol 3M NaAc-Lösung pH 4,8 und 0,6 Vol Isopropanol versetzt. Die ausgefallene DNA wurde entweder mit einem Glasstab aufgespult und in ein steriles Gefäß überführt oder 30 min bei 5000 rpm (Hettich) abzentrifugiert. Danach wurde die genomische DNA nochmals mit 70%igem Ethanol gewaschen.

6.3.2. Schnellisolierung von genomischer DNA aus Bakterien

Zur Isolierung kleiner Mengen an Gesamt-DNA wurde 500 µl Zellsuspension, 1 ml Lysozymmix und eine Spatelspitze Lysozym 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl einer 10% (M/V) SDS-Lösung zugegeben und weitere 60 min bei 37°C geschüttelt.

Die Lösung wurde klarer. Danach wurden 500 µl des Lysats zweimal mit Phenol im Volumenverhältnis 1:1 extrahiert. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und mit 70% EtOH gewaschen.

6.3.3. Gesamt-DNA-Isolierung aus Aktinomyceten (modifiziert nach Altenbuchner und Cullum, 1984)

Diese Methode stellt eine Variation zu der unter 3.1 beschriebenen Methode dar.

Die Zellen wurden 2 Tage (im Fall von *S. fradiae* Tü 27 nur über Nacht) in S- oder TSB-Medium und 1% Glycin angezogen. 10 – 20 ml der Kultur wurden 5 min bei 8000 rpm (Sorvall, SS-34) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml LI-Lösung unter Zugabe von 10 mg/ml Lysozym resuspendiert und 30 – 45 min bei 37°C unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Dann wurden 2 ml SDS 5% zugegeben, kurz gevortext und 10 min bei 60°C inkubiert. Nach dem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 2 ml Phenol/Chloroform (pH 8.0) zugegeben. Nach Durchmischung durch auf- und abziehen in der Pipette, wurde die Suspension 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 15 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Röhrchen gekippt. Bei trübem Überstand mußte die Phenolisierung wiederholt werden. Zu dem Überstand wurden 1/10 Vol. 3 M NaAc und 1 Vol. Isopropanol (-20°C) zugegeben und vorsichtig gemischt. Die ausgefallene DNA wurde mit einer Pipettenspitze gefischt und in 70% EtOH gewaschen. Die DNA wurde in 0.5 – 1 ml TE resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

6.3.4. Gesamt-DNA-Isolierung mit Anionenaustauschersäulen (Genomic-tip, Qiagen)

Bei dieser Methode werden zunächst die Zellen wieder durch Lysozymbehandlung lysiert und mit Proteinase K verdaut. Anschließend erfolgt die Reinigung der DNA über eine Anionenaustauschersäule mit anschließender Isopropanol-Fällung.

<u>Durchführung</u>:

Die Zellen wurden 2 Tage in HA-Medium kultiviert. 1 ml der Kultur wurde bei 6.900 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer B1 unter Zusatz von Lysozym (2 mg/ml) und Proteinase K (0.5 mg/ml) resuspendiert und 30 - 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 350 µl Puffer B2 zugegeben und weitere 30 - 60 min bei 50°C inkubiert. Nach Aufschluß und Lyse der Zellen wurde die Lösung auf Genomic-tip 20/G Säulen gegeben und zur weiteren Isolierung und Reinigung entsprechend den Angaben des Herstellers vorgegangen. Das DNA-Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer gelöst.

6.3.5. Gesamt-DNA-Isolierung mit Anionaustauschersäulen (QIAamp spin coloumn)

Das Prinzip entspricht der unter 6.3.4. beschriebenen Methode.

Durchführung:

Die Zellen wurden 2 Tage in YEME- bzw. HA-Medium kultiviert. 1 ml der Kultur wurde bei 8000 rpm abzentrifugiert Die Zellen wurden in 200 µl Puffer B1 unter Zusatz von Lysozym (2 mg/ml) resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 200 µl Puffer AL zugegeben, kurz gevortext, zunächst 30 min bei 70°C und anschließend nochmals 30 min bei 95°C inkubiert. Nach Zugabe von 420 µl 100% EtOH wurde das Lysat weiter über QIAamp Spin Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurde mit 100 µl H_2O eluiert.

6.4. Alkoholfällung

Die Alkoholfällung ist eine einfache Möglichkeit zur Konzentrierung oder Reinigung von DNA. Dabei ist eine Fällung der DNA aus wäßrigen Lösungen mit Hilfe von Ethanol oder Isopropanol üblich. In Anwesenheit von Alkohol und einwertigen Kationen bildet die DNA bei niedrigen Temperaturen ein Präzipitat, das sich durch Zentrifugieren pelletieren läßt.

6.4.1. Ethanolfällung

Zur DNA-Lösung gab man 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 4.8) und 2.5 Vol. eiskalten 98% Ethanol hinzu. Nach kurzem mischen wurde die Lösung 30 min bei -20°C aufbewahrt und anschließend 30 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und nochmals 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde im Vakuum getrocknet und mit geeigneter Menge TE-Puffer oder Wasser resuspendiert.

6.4.2. Isopropanolfällung

Diese Methode zur Konzentrierung wurde angewandt, wenn größere Volumina einer DNA-Lösung gefällt werden sollten.

Durchführung:

Zu einer DNA-Lösung wurden 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 4.8) und 0.7 Vol. eiskalten Isopropanol zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde das Ganze bei -20°C für 30 min aufbewahrt.

Anschließend wurde 30 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde die DNA nochmals mit 70% EtOH gewaschen und 5 min zentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets wurde die DNA in einer geeigneten Menge TE-Puffer oder Wasser resuspendiert.

7. Charakterisierung von DNA-Molekülen

7.1. Restriktionsspaltung von DNA

Die Restriktionsspaltungen wurden nach den für jedes Enzym spezifischen vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Pro Spaltungsansatz wurden 0.1 bis 10 µg DNA mit 1 bis 8 U Restriktionsenzym behandelt. Durch Zugabe der entsprechenden Menge an 10fach konzentriertem Spaltungspuffer wurden die für jedes Enzym optimalen Salzkonzentrationen eingestellt. Ein gleichzeitiger Verdau mit zwei Enzymen war möglich, wenn beide Enzyme im gleichen Puffer optimale Aktivität besaßen. Die Reaktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 10 - 50 µl durchgeführt. Die Inkubationszeit der Spaltungsansätze betrug 1 - 2 h bei der für das jeweilige Enzym empfohlenen optimalen Temperatur. Nach Beendigung der Spaltung erfolgte die Inaktivierung der Restriktionsenzyme durch 10 min Inkubation bei 72°C. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde für weitere Klonierungsexperimente präzipitiert oder im Agarosegel elektrophoretisch analysiert.

7.2. Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989; Sharp et al., 1973)

Die analytische oder präparative Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe (Molekulargewicht) erfolgt durch Elektrophorese in einem Agarosegel auf Grund der negativ geladenen Phosphatreste und kann wie jedes elektrisch geladene Makromolekül elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle im angelegten elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle ist von der Porengröße der Matrix (Agarosekonzentration), sowie der Größe und Konformation der DNA-Moleküle abhängig.

Um die aufgetrennten DNA-Banden sichtbar zu machen, wird den Agarosegelen Ethidiumbromid zugegeben, welches in die DNA interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Hierbei ist zu beachten, daß das positiv geladene Ethidiumbromid entgegengesetzt zur DNA in Richtung der Kathode wandert, und dadurch kleinere DNA-Moleküle bei gleicher Konzentration ein schwächeres Signal geben. Vor dem Auftragen der DNA-Proben werden

sie mit Bromphenolblau-Auftragsmix versetzt (50 % Glycerin, 0.1% Bromphenolblau). Das Glycerin erhöht die Dichte der DNA-Lösung und läßt die Proben in die Taschen absinken. Der Farbstoff dient als Indikator und zeigt die zurückgelegte Laufstrecke im elektrischen Feld an. Die Größe von linear doppelsträngigen Molekülen wurde durch Vergleich mit einem internen Längenstandard bestimmt.

Durchführung:

Die Agarose wurde durch Aufkochen im Mikrowellengerät in 1x TAE-Puffer gelöst und bei 80°C aufbewahrt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde 1 %ige (> 800 bp) oder 2 %ige (< 800 bp) Agarose-Lösung verwendet.

Die auf ca. 60°C abgekühlte Agarose-Lösung wurde mit 0.01% (V/V) Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer mit eingesetztem Probentaschenkamm gegossen. Das nach ~ 15 min auspolymerisierte Gel wurde mit der Gelkammer in die Elektrophoresekammer eingesetzt, mit 1x TAE-Puffer überschichtet und mit den DNA-Proben (1 Vol. DNA-Lösung + 5 Vol. Auftragspuffer) beladen. Als Größenstandard wurde 1 kb-Ladder verwendet (McDonnell et al., 1977). Die Elektrophorese erfolgte bei 1 %igen Gelen bei 120 V und bei 2 %igen Gelen zur Vermeidung von zu hohen Temperaturen bei 100 V für 20 bis 45 min. Zur Detektion wurden die DNA-Banden im Gel auf einem UV-Leuchttisch zur Fluoreszenz angeregt und photographisch dokumentiert.

7.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration konnte durch Messung der Absorption einer verdünnten Probe bei 260 nm gegen das Lösungsmittel als Referenz bestimmt werden. Bei Verwendung einer Schichtdicke von 10 mm ergibt sich daraus näherungsweise die Konzentration an DNA nach:

doppelsträngige DNA-Moleküle: $c_{dsDNA} = OD_{260nm} \cdot 50\ \mu g/ml$

einzelsträngige DNA-Moleküle: $c_{ssDNA} = OD_{260nm} \cdot 33\ \mu g/ml$

Durch den Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm kann eine Aussage über die Zusammensetzung und Qualität der isolierten DNA getroffen werden. Für eine reine DNA-Probe gilt:

$$OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1.8$$

7.4. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA gibt es viele Methoden. Generell kann man drei unterschiedliche Methoden anwenden. Eine Methode basiert auf chemischen Reaktionen nach Maxam und Gilbert (Maxam und Gilbert, 1980). Diese Technik wird auch als "Chemische DNA-Sequenzierung" oder "Hydrazin-Dimethylsulfat-Methode" bezeichnet.

Die beiden anderen Methoden sind enzymatische Methoden. Die klassische Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977), die auch als "Enzymatische DNA-Sequenzierung", "Didesoxy-Sequenzierung" oder "Kettenabbruch-Verfahren" bezeichnet wird, beruht auf der enzymatischen Synthese einer komplementären Kopie des zu sequenzierenden, einzelsträngigen Matrizenstranges (Maier und Lehrach, 1997). Hierbei werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der Amplifikation mittels spezifischer Terminatoren (2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphate, ddNTPs), die zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden zum Reaktionsansatz gegeben werden, erzeugt. Da die ddNTPs an ihrer 3'-Position keine OH-Gruppe besitzen, kann ein entstehendes DNA-Fragment nach dem statistischen Einbau dieses Terminators nicht mehr durch Ausbildung weiterer Phosphodiester-Bindungen zum nächsten anzuhängenden 2'-Desoxyribonukleotid verlängert werden, und es kommt zum Kettenabbruch. In der Praxis werden 4 separate Reaktionen, jede mit einem anderen ddNTP als Terminator angesetzt und anschließend nebeneinander in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese der im Originalprotokoll durch radioaktiv markierte dNTPs sichtbar gemachten, neu synthetisierten Fragmente, kann vom Film des Gels (Autoradiographie) direkt die DNA-Sequenz abgelesen werden. Bei der automatischen DNA-Sequenzierung mit dem 373A- bzw. 377A-DNA-Sequencer von Applied Biosystems werden die 4 dNTPs mit 4 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die durch 2 Argonlaser mit Emissionsbanden von 488 und 514 nm angeregt und zusammen in einer Spur des Gels aufgetragen werden (Freeman et al., 1990; Prober et al., 1987). Diese Vierfarbentechnik erhöht sowohl den Durchsatz pro Gel als auch die Geschwindigkeit der Datenerfassung, die bereits während des Gellaufs durch einen angeschlossenen Rechner erfolgt.

Die modernste Methode bedient sich der AmpliTaq®-Polymerase,FS und wird als "Cycle Sequencing" bezeichnet. Diese Methode erlaubt die zur PCR (Mullis et al., 1986) analoge zyklische Sequenzierung, bei der die enzymatische Sequenzierung mit einem Primer über mehrere Zyklen durchgeführt werden, was geringere Mengen Ausgangs-DNA erfordert, die Automatisierung vereinfacht und die Sequenzierung doppelsträngiger DNA ermöglicht. Die AmpliTaq®-Polymerase,FS ist ein hitzestabiles Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, wobei FS für Fluoreszenz-Sequenzierung steht. Es handelt sich bei dieser Form um eine Dop-

pelmutante der Wildtyp AmpliTaq®-Polymerase. Durch eine Mutation (G46D) verliert das Enzym seine 5'-3'-Nuklease-Aktivität. Die zweite Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms (F667Y) führt zu einer Veränderung seiner Akzeptanz gegenüber Didesoxynukleotiden. Diese können damit leichter eingebaut werden.

7.4.1. DNA-Sequenzierung mit dem 373A-DNA-Sequencer (Applied Biosystems)

Gießen des Polyacrylamid-Gels:

Um die exakte Erfassung der Fluoreszenzsignale während des Gellaufs zu gewährleisten, wurden die Glasplatten vor dem Gießen des Gels gründlich mit einem Detergenz (Alkanox) gewaschen und mit dest. Wasser gespült. Danach wurden sie mit Isopropanol (p.a.) nachbehandelt und mit einem fusselfreien Zellstofftuch (Kimwipe) trockengerieben. Anschließend wurden die Abstandhalter plaziert und die Glasplatten zusammengesetzt.

6 %iges Polyacrylamidgel:

Harnstoff	30 g
40 %ige Acrylamidlösung (19:1)	9.0 ml
10 x TBE-Puffer	6.0 ml
$H_2O_{bidest.}$	23.5 ml

Der Harnstoff wurde durch Rühren und Erwärmen (nicht über 50°C) gelöst und anschließend durch einen 0.2 µm Filter filtriert. Die Lösung wurde in ein Becherglas überführt, 24 µl TEMED und 180 µl Ammoniumpersulfatlösung (10 %) zugegeben, vermischt und anschließend sofort zwischen die durch Spacer getrennten Glasplatten gegossen, der "Vorkamm" eingesetzt und die Platten mit Klammern während der zweistündigen Polymerisationszeit abgedichtet. Anschließend wurden die Klammern entfernt, der "Vorkamm" durch einen "Haifischkamm" ersetzt und das Gel in den Sequenzierer (373-DNA-Sequencer) eingebaut. Auf die Überprüfung des Basisdetektionssignals folgte ein einstündiger Vorlauf.

Sequenzierungsreaktion:

Mit dem Dye Terminator Cycle Sequencing Kit mit AmpliTaq® DNA Polymerase wurde folgender Reaktionsansatz für die Sequenzierung verwendet:

Tabelle 12: Zusammensetzung der Sequenzierungsreaktion

Komponente	Volumen pro Reaktion	Konzentration bzw. Menge
Terminator Ready Reaction Mix	4 – 8 µl	1 x
Primer	4 µl	4 pmol
DNA	4 µl	33-500 ng
H_2O	ad 20 µl	

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (Perkin Elmer/Eppendorf) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 13: PCR-Programm für die Sequenzierung

Programmschritt (Wiederholung)	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95°C, 7 min		
2 (25 x)	95°C, 40 sec	55°C, 30 sec	60°C, 4 min
3			60°C, 4 min

Probenaufarbeitung:

Die DNA wurde wie unter 6.4.1. mit Ethanol gefällt. Anschließend wurde das Pellet in 4 µl Formamid/25 mM EDTA (4:1) aufgenommen.

Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert, rasch auf Eis abgekühlt und nach kurzem Zentrifugieren in die Taschen des in das Sequenziergerät eingebauten Polyacrylamidgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Programmparametern (2500 V, 40 mA, 30 W) für 12 h. Die bereits vom Rechner erfaßten und prozessierten Sequenzdaten wurden anschließend mittels geeigneter Software ausgewertet.

7.4.2. DNA-Sequenzierung mit dem 377A-DNA-Sequencer (Applied Biosystems)

Gießen des Polyacrylamidgels:

Waschen und Vorbereitung der Glasplatten verläuft auf die gleiche Weise wie unter 7.4.1. beschrieben.

Hier wurde ein 5.25 %iges PAGE-PLUS Gel eingesetzt mit dem eine Leseweite von 800 Basen erreicht werden sollte.

Ansatz (50 ml):

Harnstoff	18.0	g
40 %ige PAGE-PLUS Lösung	6.6	ml
10 x TBE-Puffer	5.0	ml
$H_2O_{bidest.}$	ad. 50 ml	

Sequenzierungsreaktion:

Mit dem Dye Terminator Cycle Sequencing Kit mit AmpliTaq®-Polymerase,FS wurde folgender Reaktionsansatz für die Sequenzierung verwendet:

Tabelle 14: Zusammensetzung der Sequenzierungsreaktion

Komponente	Volumen pro Reaktion	Konzentration bzw. Menge
Terminator Ready Reaction Mix	4 – 8 µl	1 x
Primer	4 µl	4 pmol
DMSO	1 µl	5 %
DNA	7 µl	33-500 ng
H_2O	ad 20 µl	

Bei Verwendung von problematischen Templates, wie Streptomyceten-DNA, wurde die DNA vor Pipettieren des Ansatzes 5 min bei 90°C denaturiert.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (Eppendorf) unter den selben Bedingungen wie unter 7.4.1. durchgeführt.

Probenaufarbeitung:

Zunächst wurde der PCR-Ansatz mit H_2O auf 100 µl aufgefüllt. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3 M Na-Acetat und 250 µl 100% EtOH gefällt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe 30 min bei 16°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und nochmals 10 min zentrifugiert. Die DNA wurde im Eppendorf Concentrator getrocknet und anschließend in 4 µl Formamid/25 mM EDTA (4:1) aufgenommen.

Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 7.4.1. beschrieben.

8. Klonierungsexperimente

8.1. Spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Mullis et al., 1986)

Die PCR, entwickelt 1985 von K. Mullis, dient zur spezifischen Amplifikation einer Ausgangs-DNA (Template). Dabei wird ein Zyklus von 3 Reaktionsschritten bis zu 40 mal wiederholt. Der erste Reaktionsschritt eines jeden Zyklus ist die *Denaturierung* des Template-DNA-Doppelstranges bei ca. 95°C. Dabei entstehen DNA-Einzelstränge, an die sich im 2. Reaktionsschritt, dem *Annealing* bei 45°C - 65°C (abhängig von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer/Template-Kombination), jeweils ein Primer anlagert. Im 3. Schritt - der *Extension* - werden durch Verlängerung der Primer am 3'-Ende mittels thermostabiler Polymerasen bei 72°C zwei neue Stränge synthetisiert, die bei den folgenden Zyklen wieder als Template zur Verfügung stehen. Das gewünschte DNA-Fragment wird letztendlich fast exponentiell vermehrt, weshalb eine sehr geringe Template-Menge ausreichend ist.

Durchführung:

Als Ausgangs-DNA wurde entweder genomische DNA oder eine Spin-Mini-Plasmidpräparation eingesetzt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 pmol/µl in TE-Puffer gelöst. Die vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer wurden benutzt. Zwei allgemeine Reaktionsansätze sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Tabelle 15: Zusammensetzung einer typischen PCR-Reaktion

Komponente	Volumen pro Reaktion (genom. DNA)	Volumen pro Reaktion (Plasmid-DNA)	Konzentration bzw. Menge
10 x-Polymerase-Puffer	5 µl	5 µl	1 x
Q-Lösung	10 µl	-	
dNTP-Mix (je 2.5 mM)	4 µl	4 µl	0.2 mM
$MgCl_2$ (25 mM)	2 µl	4 µl	2 mM
Primer 1	0.5 µl	0.5 µl	50 pmol
Primer 2	0.5 µl	0.5 µl	50 pmol
Ausgangs-DNA	1 - 2 µl	1 - 2 µl	ca. 100 ng
DNA-Polymerase	0.5 µl	0.5 µl	1 - 2 U
H_2O	ad 50 µl	ad 50 µl	

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Stratagene bzw. Eppendorf) mit folgendem Temperaturprogramm:

Tabelle 16: Typisches PCR-Programm

Programmschritt (Wiederholung)	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95°C, 7 min		
2 (30 x)	95°C, 1,5 min	55°C, 1 min	72°C, 1,5 min
3			72°C, 7 min

8.2. Isolierung von PCR-Fragmenten aus dem Agarosegel

Um die DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zu isolieren, wurde nach der PCR oder dem Restriktionsverdau eine Gelelektrophorese durchgeführt. Nach dem Elektrophoreselauf wurde auf einem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell das Agarosestück aus dem Gel geschnitten, welches das gewünschte DNA-Fragment enthält. Hierbei mußte schnell gearbeitet werden, da UV-Licht auf DNA als Mutagen wirkt. Das ausgeschnittene Gelstück konnte nun bei -20°C aufbewahrt oder sofort mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit weiterverarbeitet werden. Diese Methode beruht auf der spezifischen Bindung von DNA an einer Silicagel-Matrix. Die Durchführung der DNA-Extraktion aus dem ausgeschnittenen Agarosestück erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

8.3. Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-OH und dem 5'-Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA-Moleküle.

Durchführung:

Zur Ligation wurde in einem Eppendorfgefäß Vektor und Insert-Fragmente, die man zuvor aus einem Agarosegel eluiert hatte, im geeigneten Verhältnis gemischt. Hierbei wurde beachtet, daß die Insert-DNA im Vergleich zur Vektor-DNA etwa im 3 - 5 fachen Überschuß vorlag. Man gab 2 µl Ligase-Puffer (10 x) und 0.5 µl T4-DNA-Ligase zu und füllte auf ein maximales Volumen von 20 µl mit sterilem Wasser auf. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtem-

peratur und anschließend eine Stunde bei 16°C inkubiert. Gute Ergebnisse wurden auch erzielt, wenn der Ansatz nochmals über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

8.4. Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Eine Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase (CIP = Calf Intestinal Mucosa Phosphatase) wurde dann durchgeführt, wenn eine Religation eines gespaltenen Vektors ohne Insertaufnahme verhindert werden sollte.

Hierzu wurde nach Beendigung der Spaltung 1 µl alkalische Phosphatase direkt zu diesem Ansatz gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz 15 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und das gewünschte Fragment über eine Gelextraktion aufgereinigt.

9. DNA-Transfer in Bakterien

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme freier, löslicher DNA aus dem Medium durch ein Rezipienten Bakterium. Weder *E. coli* noch Aktinomyceten besitzen ein natürliches Transformationssystem, das sie zur aktiven Aufnahme freier DNA befähigt. Aus diesem Grund ist bei diesen Bakterien nur eine passive Aufnahme der DNA nach entsprechender Vorbehandlung der Zellen möglich.

9.1. Transformation von *E. coli*-Stämmen

9.1.1. Transformation nach der PEG/DMSO-Methode (Chung et al., 1989)

Herstellung kompetenter Zellen:

500 µl einer Übernachtkultur von *E. coli* DH5α wurden in 50 ml LB-Medium überimpft und 2 - 4 h bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte OD_{578} = 0.4 - 0.7 inkubiert. Die Zellen wurden bei 3000 rpm (Hettich) 10 min bei 4°C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls bei 4°C durchgeführt. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml eiskaltem TSS resuspendiert. Je 200 µl der Zellen wurden entweder nach 20 min Inkubation auf Eis direkt zur Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C aufbewahrt.

Transformation kompetenter Zellen:

Zu je 200 µl der kompetenten Zellen wurden 10 µl Ligationsansatz oder 1 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA pipettiert, kurz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 30 - 45 sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Zur Regeneration der Zellen wurden 0,8 ml LB- bzw. SOC-Medium zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 7500 rpm für 2 min abzentrifugiert und im Rücklauf resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

9.1.2. Transformation mit Hilfe der Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Bakterien-Membran durch Anlegen eines elektrischen Feldes kurzfristig permeabilisiert, d. h. die Potentialdifferenz verursacht eine Desorganisation von Membrankomponenten, was zur Entstehung von "Poren" in der Membran führt, die eine Aufnahme von freier DNA ins Zellinnere ermöglichen. Bei der Durchführung der Elektroporation (Einpulstechnik) sind folgende Punkte zu beachten:

Da die Zelle während des Impulses direkten Kontakt mit dem umgebenden Medium hat, und somit ein Stoffaustausch möglich ist, soll die Zelle für die Dauer der Anlegung des elektrischen Feldes von isotonischem Medium umgeben sein. Gleichzeitig muß die Leitfähigkeit des Mediums sehr niedrig sein, da die Zellen bei der Elektroporation sehr hohen Feldstärken ausgesetzt werden (ca. 10 kV/cm). Hohe Leitfähigkeit des Mediums kann in der Elektroporationsküvette zur Lichtbogenbildung oder zur Explosion führen. Die eingesetzte DNA sollte daher einen hohen Reinheitsgrad aufweisen und möglichst ionenfrei sein. Um eine hohe Mortalitätsrate zu vermeiden, sollten die Zellen unmittelbar nach der Elektroporation schnell in neues Medium überführt werden. Im Vergleich zur PEG/DMSO-Methode ist die Elektroporation erheblich effizienter (bis zu Faktor 100). Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die Transformationseffizienz nicht von der Größe des eingesetzten Plasmids abhängt.

Präparation von kompetenten Elektroporations-Zellen:

2 ml einer Übernachtkultur wurden in 500 ml LB-Medium überimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{578} von 0.5 - 0.7 inkubiert. Die Zellen wurden bei 4°C 15 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach Abschütten des Überstandes wurde das Bakterienpellet zunächst in 5 ml eiskaltem Millipore Wasser vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde dann in 500 ml eiskaltem Millipore Wasser aufgenommen und 15 min bei 6000 rpm (Sorvall, SLA-3000) und 4°C zentrifugiert. Der Über-

stand wurde vorsichtig abgegossen und das nun sehr lose Pellet im Rücklauf resuspendiert. Anschließend wurden erneut 500 ml Millipore Wasser zugegeben, zentrifugiert und das Pellet nach vorsichtigem Abschütten des Überstandes im Rücklauf resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 15 %igem Glycerin aufgefüllt. Die kompetenten Zellen wurden nochmals 15 min bei 6000 rpm (Sorvall, SLA-3000) und 4°C zentrifugiert. 1.5 faches Volumen an 15 %igem Glycerin wurde zum abgeschätzten Volumen des Pellets gegeben und resuspendiert. Die Zellen wurden in 50 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Elektroporation der kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA:

50 µl der Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 1 - 5 µl der zu transformierenden DNA (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA) wurden unmittelbar vor der Elektroporation hinzugefügt. Der Elektroporationsansatz wurde durch Auf- und Abziehen in einer Pipette kurz gemischt und in eine trockene, eisgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Küvette wurde in die dafür vorgesehene Halterung gestellt und Spannung angelegt. Sofort nach Impulsgabe wurde 1 ml SOC-Medium zum Transformationsansatz zugegeben, die Zellsuspension aus der Küvette in ein Eppendorfgefäß überführt und 45 - 60 min bei 37°C regeneriert. Die Zellen wurden 2 min bei 7500 rpm zentrifugiert und im Rücklauf resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

Elektroporationsbedingungen (EASYJECT PLUS, EUROGENTEC):

- Spannung: 2.5 kV
- Feldstärke: 25 µF
- Widerstand: 201 Ohm

9.2. Transformation von Streptomyceten-Stämmen

9.2.1. Protoplasten-Transformation von Streptomyceten (Hopwood, 1985)

Die Transformation von Streptomyceten erfolgt durch eine Polyethylenglycol (PEG)-induzierte Aufnahme von DNA in Protoplasten. Die Protoplasten werden auf speziellem Medium regeneriert und durch Überschichten mit Weichagar, der 10 fach konzentriertes Antibiotikum enthält, selektioniert.

Protoplastierung von Streptomyceten (nach Hopwood et al., 1985):

Die Zellen wurden 1 - 2 Tage in S-Medium mit 1 % Glycin kultiviert. 30 ml der Kultur wurden 10 min bei 8000 rpm (Sorvall, SS-34) abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes, wurde das Zellpellet mit 10 ml P-Puffer gewaschen und wieder für 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml P-Puffer/Lysozym (1 mg/ml) resuspendiert und anschließend 15 - 60 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Dabei wurde die Protoplastierung regelmäßig mikroskopisch überprüft. Bei weitgehender Protoplastierung des Mycels, wurden 20 ml eiskalter P-Puffer zugegeben (Stoppen der Reaktion) und die Lösung durch sterile Watte filtriert. Das Protoplasten-Filtrat wurde 5 min bei 5000 rpm (Hettich) zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Protoplasten in 0.5 - 1 ml eiskaltem P-Puffer aufgenommen. Die Protoplasten wurden direkt zur Transformation eingesetzt oder in 200 µl Portionen bei -20°C aufbewahrt.

Standard-Transformation (nach Kieser et al., 1982):

Die Protoplasten wurden langsam auf Eis aufgetaut.

Transformationsansatz:	- 10 - 20 µl	DNA-Lösung
	- 200 µl	Protoplasten-Suspension
	- 500 µl	T-Puffer

Der Transformationsansatz wurde sofort gemischt und auf 3 R5-Platten verteilt. Die Platten wurden bei 30°C oder bei RT über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit je 2.5 ml Weichagar mit 10 fach konzentriertem Antibiotikum überschichtet und bei 30°C inkubiert.

9.2.2. Interkonjugativer Transfer von Plasmid-DNA (Bierman et al., 1992; Mazodier et al., 1989)

Diese Methode ermöglicht die Konstruktion eines rekombinanten Plasmids in einem experimentell gut handbaren Wirt (wie z.B. *E. coli*) und einen anschließenden Transfer durch Konjugation in den gewünschten Stamm. Hierbei findet ein Transfer der Plasmid-DNA von einem Donor (z.B. *E. coli*) zu einem Rezipienten (z.B. *Streptomyces*) statt.

Durchführung:

1.) Konjugation von *E. coli* mit *E. coli*

Die *E. coli* Stämme S 17-1 (Donor) (Simon et al., 1983) und XL1-Blue (Rezipient) wurden bis zu einer OD_{578nm} von 0.5 angezogen. Anschließend wurden zu 2 ml Donor 1 ml Rezipient zugegeben. Dieses Gemisch wurde 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe einer 0.9 % NaCl-Lösung eine 10^{-2}-Verdünnung hergestellt. Damit wurden die Kreuzungspartner getrennt. Weitere Verdünnungen (10^{-3} -10^{-5}) wurden hergestellt und jeweils 100 µl auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

2.) Konjugation von *E. coli* mit *Streptomyces* (Flett et al., 1997)

Zu 20 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum wurden 200 µl einer Übernachtkultur des *E. coli* Stammes S 17-1 angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Bei einer OD_{578nm} von 0.5 wurden die Zellen 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml LB-Medium resuspendiert, wieder 5 min zentrifugiert und in 4 ml LB-Medium aufgenommen.

Je 100 µl Sporensuspension (~$7 \cdot 10^8$ Sporen in 87% Glycerol) des Stammes *S. fradiae* Tü 27 wurden 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Abnehmen des Glycerol-Überstandes wurden die Sporen in 1 ml LB-Medium resuspendiert, wieder 5 min zentrifugiert und in 100 µl S-Medium aufgenommen.

Für die Konjugation wurden die Sporen 10 min bei 50°C erhitzt und mit 100 µl der oben beschriebenen *E. coli*-Kultur (~ 10^8) gemischt. Das Gemisch wurde auf 2 MS-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei Raumtemperatur bzw. bei 30°C über Nacht inkubiert und dann mit Weichagar unter Zusatz von Nalidixinsäure (500 µg/ml) überschichtet.

10. Southern Hybridisierung (Southern, 1975)

Diese Methode macht sich die Tatsache zunutze, daß zwei Nukleinsäure-Einzelstränge (DNA-DNA; DNA-RNA; DNA-Oligonukleotide), die zueinander komplementär sind, durch spezifische Basenpaarung einen Doppelstrang ausbilden können. Die zu untersuchende DNA wird dabei zunächst aus einem Agarosegel oder bei Plaque- oder Koloniehybridisierungen direkt aus den Plaques bzw. Kolonien (von der Platte) durch das "Blotten" auf einen Filter transferiert und anschließend fixiert. Eine markierte, spezifische DNA oder RNA-Sonde kann dann mit der DNA auf dem Filter hybridisieren, sofern komplementäre Nukleotidsequenzen vorhanden sind. Anschließend kann die auf dem Filter gebundene Sonden-DNA oder RNA aufgrund der Markierung detektiert werden.
In dieser Arbeit wurde die Standardhybridisierung und die Koloniehybrdisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden (DIG Nucleic Acid Labeling and Detection Kit, Boehringer) durchgeführt.

10.1. Transfer der DNA auf einen Nylon-Filter

10.1.1. Transfer aus dem Agarosegel

DNA-Restriktionsfragmente wurden in einem Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur späteren Identifizierung und Bestimmung der Größe bestimmter hybridisierender Fragmente konnte ein Digoxygenin-markierter Längenstandard aufgetragen werden. Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator (360 nm) photographiert. Das Agarosegel wurde dann in einer Schale mit 500 ml 1.5 M NaCl/0.5 M NaOH denaturiert (2 x 20 min) und anschließend in 500 ml 1 M Tris/1.5 M NaCl (pH 8.0) neutralisiert (2 x 20 min). Mit dem neutralisierten Gel wurde der Southern Blot aufgebaut. Hierzu wurde das Gel mit der Unterseite nach oben auf eine Lage Whatman 3MM-Papier, dessen Enden in eine mit 20 x SSC gefüllte Schale tauchten, luftblasenfrei überführt. Auf das Gel wurde ein gleichgroßer mit 20 x SSC benetzter Nylon-Filter (ebenfalls luftblasenfrei) gelegt und mit drei Lagen auf Gel- bzw. Filtergröße zugeschnittenem Whatman 3MM-Papier bedeckt. Auf dieses wurde ein ca. 10 cm dicker Stapel Papierhandtücher gelegt und mit einem 750 g schweren Gewicht beschwert. Der durch die Papierhandtücher erzeugte Saugstrom bewirkte, daß 20 x SSC über das 3MM-Papier durch das Agarosegel und den Nylon-Filter gesaugt wurde. Hierbei wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel herausgelöst und auf den Nylon-Filter übertragen. Nach ca. 12 h konnte die auf den Nylon-Filter transferierte DNA durch eine 45

sec UV-Bestrahlung (360 nm) fixiert werden. Der Nylon-Filter wurde zwischen 3MM-Papier getrocknet.

10.1.2. Koloniehybridisierung

Die Platten mit den überstocherten Kolonien wurden 1 h bei 4°C abgekühlt. Anschließend legte man runde Nylon-Membranen für 5 min auf die Platten auf und drückte dabei leicht an. Je 3 Lagen 3MM-Papier wurden luftblasenfrei übereinandergeschichtet und mit dem jeweiligen Puffer gesättigt: Denaturierungs-Puffer 2, Neutralisierungs-Puffer 2 und 2 x SSC. Die Nylon-Membran wurde nacheinander jeweils mit der Kolonie-Seite nach oben folgendermaßen auf das gesättigte 3MM-Papier gelegt:

Membran 15 min auf 3MM mit Denaturierungs-Puffer denaturieren

Membran 5 min auf 3MM mit Neutralisierungs-Puffer neutralisieren

Membran 15 min auf 3MM mit 2 x SSC waschen

Die Membran wurde getrocknet und durch eine 45 sec UV-Bestrahlung (360 nm) fixiert. Zellreste wurden durch 1 - 3 h Inkubation bei 68°C in 3 x SSC/0.1 % SDS und anschließend durch Abwischen mit einem feuchten Papiertuch beseitigt. Proteine entfernte man durch 1 h Behandlung bei 37°C mit Proteinase K (20 µg/ml). Die Proteinase K wurde durch 5 min Inkubation bei Raumtemperatur in PMSF (40 µg/ml) und zweimaliges Waschen in 2 x SSC inaktiviert.

Die Membran konnte sofort zur Hybridisierung eingesetzt oder trocken gelagert werden.

10.2. Nichtradioaktive Markierung von DNA-Sonden mit DIG-dUTP

Nukleinsäuremoleküle werden durch den Einbau eines Digoxygenin-markierten Nukleotids nichtradioaktiv markiert. Das Steroid-Hapten Digoxigenin (DIG) ist über einen Spacer mit dem entsprechenden Uridin-Nukleotid verbunden. Größere DNA-Fragmente werden mit der Klenow-Polymerase durch "random primed"-Einbau von Digoxigenin markierten Desoxyuridintriphosphat (DIG-dUTP) markiert. Nach Denaturierung der DNA können die Hexanukleotide ("random primer") an beliebige Stellen des Einzelstranges hybridisieren und dienen der Klenow Polymerase als Startstellen für die Strangsynthese, wobei auch Digoxigenin-markiertes dUTP in den neusynthetisierten DNA-Strang mit eingebaut wird.

Nach erfolgreicher Hybridisierung der DIG-markierten DNA-Sonde an die Ziel-Nukleinsäure werden die Hybride durch Verwendung hochaffiner Antikörper-Konjugate (Anti-Digoxi-

genin-Alkalische Phosphatase-Konjugat) nachgewiesen. Dieses Enzym ermöglicht durch die anschließende Farbreaktion die Detektion der gebundenen DNA-Sonde.

Für die Markierung wurde die mit Restriktionsenzymen gespaltene Sonden-DNA durch 10 min Erhitzen auf 95°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt.

Markierungsansatz:
- 15 µl der gespaltenen Sonden-DNA
- 2 µl (1 x) Hexanukleotidgemisch ("random primer")
- 2 µl (1 x) dNTP-Markierungsgemisch
- 1 µl (2 U) Klenow Polymerase

Der Markierungsansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0.25 M EDTA (pH 8.0) ab. Anschließend erfolgte eine Ethanolpräzipitation durch Zugabe von 2.5 µl 4 M LiCl und 75 µl vorgekühltem 98%igen EtOH. Nach 20 min Inkubation bei -70°C wurde die DNA abzentrifugiert und nochmals mit 500 µl 70% EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA-Sonde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.
Die Hybridisierungssonden, die markierte DNA enthielten, konnten eingefroren aufbewahrt und nach erneuter Denaturierung mehrmals wieder verwendet werden.

10.3. Hybridisierung

Durch Temperatur und Salzgehalt der Hybridisierungslösung sowie durch die Anwesenheit Helix-destabilisierender Substanzen (z. B. Formamid) läßt sich die Stringenz der Hybridisierung beeinflussen. Durch das Waschen des Filters nach der Hybridisierung kann die am Filter gebundene markierte DNA-Probe je nach Temperatur und Salzgehalt der Waschlösung teilweise wieder abgelöst werden. Durch das Blocking-Reagenz soll die unspezifische Bindung zwischen markierter DNA und Nylon-Filter verringert werden. Um eine gleichmäßige Flüssigkeitsbenetzung des Filters zu gewährleisten, wird der Hybridisierungszylinder während der Vorhybridisierung und der Hybridisierung in einem Rollerschrank inkubiert.

Der fixierte Nylon-Filter wurde mit 20 ml Hybridisierungslösung (mit Formamid) für 4 Stunden bei 42°C im Roller vorhybridisiert. Diese Lösung wurde durch 5 ml Vorhybridisierungslösung mit frisch denaturierter DNA-Probe (10 min bei 95°C) ersetzt. Der Filter wurde über

Nacht bei 42°C im Roller inkubiert. Nach Beenden der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung zum Aufbewahren für eine eventuelle Wiederholung der Hybridisierung in ein Falcon-Tube überführt. Der Filter wurde anschließend 2 x 10 min bei RT mit 70 ml 2 x SSC / 0.1% SDS und 2 x 15 min bei 68°C mit 50 ml 0.1 x SSC / 0.1% SDS gewaschen.
Die Hybridisierungsfilter konnten sofort für die Nachweisreaktion eingesetzt werden. Für eine spätere Nachweisreaktion wurden sie trocken und dunkel aufbewahrt.

10.4. Immunologischer Nachweis der markierten DNA-Probe

An die Digoxigenin-markierte DNA-Sonde, die mit der auf dem Filter fixierten DNA hybridisiert, wird das Antikörper-Konjugat (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase Konjugat, Anti-DIG-AP) gebunden. Die Blocking-Reagenz-Behandlung des Filters soll eine unspezifische Antikörper-Bindung verhindern. Anschließend erfolgt eine Farbreaktion.

Der Filter wurde 1 min in Puffer 1 gewaschen. Dann wurde 30 min in 30 ml Puffer 2 bei Raumtemperatur inkubiert. Das Antikörperkonjugat (150 mU/ml) wurde in 15 ml Puffer 2 verdünnt und der Filter damit 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes Antikörper-Konjugat wurde durch 2 x 15 min Waschen mit je 100 ml Puffer 1 entfernt. Anschließend wurde der Nylon-Filter 2 min mit 100 ml Puffer 3 äquilibriert.

<u>Farbreaktion</u>:
Die Färbelösung wurde immer frisch hergestellt.
Hierzu wurde eine BCIP/NBT-Substrat Tablette (Schleicher & Schuell) in 30 ml $H_2O_{bidest.}$ gelöst. Der Filter wurde in der Färbelösung (im Dunkeln im Roller) inkubiert. Wenn die Banden klar erkennbar waren, wurde die Reaktion durch 5 min Waschen des Filters mit 100 ml TE-Puffer abgestoppt.

11. Long-Distance Genome-Walking (Min und Powell, 1998)

Mit dieser Methode kann mittels PCR-Reaktion eine unbekannte DNA-Sequenz, die auf eine bereits bekannte DNA-Sequenz folgt, isoliert werden.

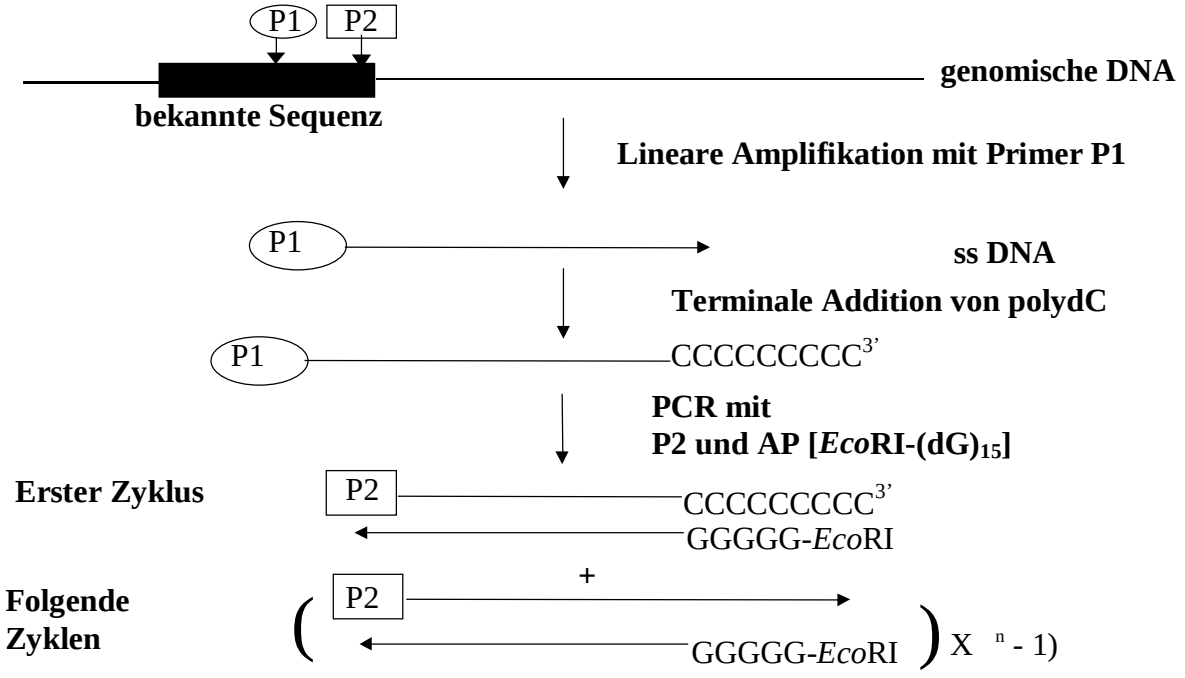


Abbildung 14: Prinzip des Long-Distance Genome-Walking

Wie in Abbildung 14 gezeigt, wird zunächst in einer ersten PCR-Reaktion mit einem Primer P1, entwickelt aus der bekannten Sequenz in der Nähe des 3'-Endes, Einzelstrang DNA amplifiziert. Nach Aufreinigung dieser DNA wird in einer Tailing-Reaktion mit Hilfe der Terminalen Desoxyribonukleotid Transferase (TDT) ein Poly-dC-Schwanz angehängt. Dieses Reaktionsprodukt wird in einer zweiten PCR-Reaktion mit einem Primer P2, ebenfalls aus dem Bereich des 3'-Endes der bekannten Sequenz entwickelt, und einem Adapter-Primer mit Poly-dG und einer *Eco*RI-Schnittstelle für weitere Klonierungsexperimente, eingesetzt.

Durchführung:

1.) PCR-Reaktion zur Amplifizierung von ssDNA:

Die PCR-Reaktionen wurden mit der KlenTaq LA-Polymerase (Clontech) bzw. mit TaqLong (Stratagene) durchgeführt.

Tabelle 17: Zusammensetzung der 1.PCR der LDGW-Methode

Komponente	Volumen pro Reaktion	Konzentration bzw. Menge
10 x-Polymerase-Puffer	5 µl	1 x
DMSO	10 µl	
dNTP-Mix (je 2.5 mM)	4 µl	0.2 mM
Primer 1	0.5 µl	50 pmol
Ausgangs-DNA	2 µl	ca. 100 ng
Polymerase	0.5 - 1 µl	1 - 2 U
H_2O	ad 50 µl	

Tabelle 18: Temperaturprogramm der 1. PCR der LDGW-Methode

Programmschritt (Wiederholung)	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95°C, 5 min		
2 (35 x)	95°C, 40 s	62°C, 30 s	68°C, 4 min
3			68°C, 4 min

2.) Tailing-Reaktion:

Nach der PCR-Reaktion wurde das Produkt mit dem Gelextraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers für die Reinigung von PCR-Produkten aufgearbeitet und mit 30 µl EB-Puffer eluiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend für 2 - 3 min auf Eis gestellt. Für die Tailing-Reaktion wurden folgende Komponenten zugesetzt:

5 µl 5 x Tailing-Puffer (NEB)
5 µl $CoCl_2$ (5 mM)
1 µl dCTP (100 pmol)
2.5 µl TDT (50 U)

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 10 min bei 70°C durch Hitze inaktiviert.

Der Ansatz wurde mit $H_2O_{bidest.}$ auf 100 µl aufgefüllt und konnte dann zur 2. PCR-Reaktion eingesetzt werden, die unter folgenden Bedingungen durchgeführt wurde:

Tabelle 19: Zusammensetzung der 2. PCR der LDGW-Methode

Komponente	Volumen pro Reaktion	Konzentration bzw. Menge
10 x-Polymerase-Puffer	5 µl	1 x
DMSO	5 µl	10 %
dNTP-Mix (je 2.5 mM)	4 µl	0.2 mM
Primer 1	0.5 µl	50 pmol
Primer APO-EcoRI	0.5 µl	50 pmol
Tailing-Ansatz	5 µl	
Polymerase	1 - 2 µl	2 - 4 U
H_2O	ad 50 µl	

Tabelle 20: Temperaturprogramm der 2. PCR der LDGW-Methode

Programmschritt (Wiederholung)	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95°C, 4 min		
2 (40 x)	95°C, 30 s	62°C, 15 s	68°C, 5 min
3			68°C, 5 min

Nach 30 Zyklen wurde zu den Ansätzen nochmals 0.5 - 1 µl-Polymerase zugegeben.

Die isolierten Fragmente wurden in die *Eco*RI/*Sma*I-Schnittstelle von pUC18 ligiert. Hierzu wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl 5 µg pUC18 DNA zuerst mit *Eco*RI 90 min bei 37°C verdaut und danach mit *Sma*I für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Hitzeinaktivierung wurde die DNA direkt auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die geschnittene Vektor-DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert.

Die DNA-Fragmente wurden dann in den gespaltenen pUC18-Vektor mit T4-DNA-Ligase ligiert (siehe 8.3.). Mit dem gesamten Ligationsansatz wurden kompetente *E. coli* DH5α nach der PEG/DMSO-Methode (siehe 9.1.1) transformiert. Die Zellen wurden auf selektive LB-Agarplatten unter Zusatz von X-Gal ausplattiert und auf positve (weiße) Kolonien gescreent.

12. Erzeugung und Screening einer subgenomischen Genbank

12.1. Erzeugung einer subgenomischen Genbank mit vollständig verdauter genomischer DNA

Je 20 µg genomische DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit je 1 µl der Restriktionsenzyme *Pst*I, *Sac*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Kpn*I und *Sph*I für 1 - 2 h bei 37°C gespalten und anschließend 10 min bei inkubieren. Die DNA der Spaltungsansätze wurde in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Die auf dem Agarosegel aufgetrennte DNA wurde photographiert und dann auf eine Nylonmembran transferiert (siehe 10.1.1), mit den DIG markierten DNA-Sonden hybridisiert und anschließend die Hybridisierungsprodukte detektiert (siehe 10.2.-10.4.).

Die ermittelten Fragmente wurden in die jeweilige Schnittstelle von pUC18 ligiert. Hierzu wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl 5 µg pUC18 DNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym 90 min bei 37°C verdaut. Zum Spaltungsansatz wurde direkt 2 µl Alkalische Phosphatase zugegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung wurde die DNA direkt auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die geschnittene Vektor-DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert.
Die jeweiligen DNA-Fragmente wurden dann in die mit dem entsprechendem Restriktionsenzym gespaltenen und dephosphorylierten pUC18 Vektor-DNA mit T4-DNA-Ligase ligiert (siehe 8.3.). Mit dem gesamten Ligationsansatz wurden kompetente *E. coli* DH5α bzw. *E. coli* XL1-Blue nach der PEG/DMSO-Methode (siehe 9.1.1.) bzw. mittels Elektroporation (siehe 9.1.2.) transformiert. Die Zellen wurden auf LB-Amp-Agarplatten unter Zusatz von X-Gal ausplattiert.

12.2. Erzeugung einer subgenomischen Genbank mit partiell verdauter genomischer DNA

Um für den Partialverdau die optimale Enzymkonzentration an *Sau*3AI zu ermitteln, wurde die genomische DNA zunächst in einem Vorversuch mittels Verdünnungsreihe gespalten.

Durchführung:

Spaltungsansatz:	3 µl	NEB *Sau*3AI-Puffer + RNase (10 mg/ml)
	20 µl	DNA (~1 µg/µl)
	7 µl	H_2O

7 Eppendorfgefäße wurden mit diesem Ansatz pipettiert, eines mit dem doppelten Ansatz. Zu diesem doppelten Ansatz wurde 1 µl *Sau*3AI (4 Units) gegeben, kurz gevortext, 30 µl entnommen und zum nächsten Ansatz zugegeben. Endkonzentration an *Sau*3AI im ersten Gefäß entsprach dann 2 Units. Dieser Vorgang wurde bis zum letzten Ansatz wiederholt (Enzymkonzentration: 0.015 U). Die Ansätze wurden 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden je 3 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0) zugegeben. Anschließend wurden die Ansätze 10 min bei 72°C inkubiert. Je 5 µl der Ansätze wurden zur Analyse auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Ansätze, bei denen die DNA gut gespalten war, wurden vereinigt und in einem 1 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die *Sau*3AI DNA-Fragmente mit 3 - 7 kb wurden dann aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Agarosegel isoliert. Die isolierte DNA wurde mit EtOH gefällt und in 22 µl TE-Puffer aufgenommen.

Die DNA Fragmente wurden in die *Bam*HI-Schnittstelle von pUC18 kloniert. Hierzu wurde der Kit "Ready-To-Go pUC 18 *Bam*HI/BAP + Ligase" (Pharmacia Biotech) verwendet. Dieser enthielt den Vektor pUC18, der *Bam*HI gespaltene und mit bakteriell alkalischer Phosphatase (BAP) behandelt war, und T4-DNA-Ligase.

Die Ligation und anschließende Fällung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde nach *E. coli* DH5α nach der PEG/DMSO-Methode (siehe 9.1.1.) bzw. mittels Elektroporation (siehe 9.1.2.) transformiert. Die Zellen wurden auf LB-Amp-Agarplatten unter Zusatz von X-Gal ausplattiert und eine blau-weiß Selektion durchgeführt.

13. Expression von *soyC*

13.1. Verwendete Expressionssysteme

13.1.1. Das lambda p_L-Promotor-Expressionssystem

Im Falle des Bakteriophagen Lambda p_L-Promotors des Expressionssystems pCYTEXP1 (Belev et al., 1991) handelt es sich um einen unter der Kontrolle des temperatur-sensitiven λ-Repressors stehenden Promotor. Der Repressor, codiert durch das auf dem Plasmid befindliche *cI857*-Gen, wird durch Erhöhung der Temperatur von 30°C auf 42°C inaktiviert und dadurch die Transkription des unterhalb des Promotors inserierten rekombinanten Gens gestartet.

Bei Verwendung dieses temperatur-induzierbaren Systems wurden die Klone bis zu einer OD_{578} = 1.0 bei 30°C in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) geschüttelt. Durch Überführen des Ansatzes in ein auf 42°C erwärmtes Schüttel-Wasserbad erfolgte die Induktion der Genexpression. Die Expression wurde im allgemeinen über einen Zeitraum von 3 - 5 h durchgeführt.

13.1.2. Das Strep-tag-Expressionssystem

Die Expressionskassette des Plasmids pASK-IBA1CA (Schmidt and Skerra, 1994) (Schmidt et al., 1996) steht unter der transkriptionellen Kontrolle des tetA-Promotors. Der tetA-Promotor besitzt eine dem lac-UV5-Promotor vergleichbare Stärke und wird durch Zugabe von sehr geringen, nicht antibiotisch wirksamen Konzentrationen an Anhydrotetracyclin kostengünstig induziert (Skerra, 1994). Die effiziente Initiation der Translation wird durch die sich an den tetA-Promotor anschließende Tandem-Ribosomenbindungsstelle gewährleistet. Die OmpA-Signalsequenz auf dem Vektor vermittelt die Sekretion des rekombinanten Proteins in das Periplasma von *E. coli*. Dort wird sie von der *E. coli*-eigenen Signalpeptidase abgespalten, so daß der natürliche N-Terminus des rekombinanten Proteins erhalten wird.

Bei Durchführung der Expression unter Verwendung dieses Systems wurden die *E. coli*-Klone bis zu einer OD_{578} = 0.8 bei 30°C in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) geschüttelt. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (Endkonzentration 0.4 µg/ml) und einer 14 stündigen Inkubation bei 30°C.

13.1.3. Expressionssystem pJOE2775

Die Expressionskassette von pJOE2775 (Krebsfänger et al., 1998) steht unter der Kontrolle des rhaP-Promotors, der durch Zugabe von Rhamnose induziert wird. Zusätzlich liegt noch zwischen der *Bam*HI/*Hind*III-Schnittstelle des Vektors ein His-Tag.

Für die Expression in pJOE2775 wurden die Zellen in LB-Medium (Ampicillin 100 µg/ml) bis zu einer OD_{578} von 0.8 bei 30 bzw. 37°C inkubiert. Zur Induktion wurde Rhamnose (Endkonzentration 0.2% (M/V)) zugesetzt und weiter bei 30 bzw. 37°C inkubiert. Nach 3 - 5 h wurde die Expression abgebrochen.

13.2. Überprüfung der Expression in den verschiedenen Expressionssystemen

Die transformierten Kultivierungen wurden auf einem Horizontalschüttler mit 200 rpm bei zunächst 30°C in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml (LB-Medium) durchgeführt. Als Inokulum wurden 4 ml einer Übernachtkultur unter Zusatz von 100 µl Ampicillin (100 mg/ml) zugegeben. Die Induktion der verschiedenen Expressionssysteme erfolgte wie unter 14.1. beschrieben.
Die optische Dichte wurde stündlich aus der Kulturbrühe bestimmt. Nach Induktion wurden auch Proben für SDS-PAGE und Bestimmung der P450-Konzentration entnommen.

13.3. Zellaufschluß

Je 5 g Zellpellet wurden auf Eis aufgetaut und in 20 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.5, 1 mM EDTA) oder 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7.5, 1 mM EDTA) suspendiert. Mittels viermaliger Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W250, Leistungsabgabe 80 W, Arbeitsintervall 20 %) mit jeweils 1 min Pause wurde die auf Eis gekühlte *E. coli*-Zellsuspension aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde 20 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die klare Lösung diente dann zur Bestimmung der P450 Konzentration.

14. Allgemeine biochemische Methoden

14.1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mittels PAGE können Proteine in analytischem oder präparativem Maßstab nach ihrer Größe (SDS-PAGE) aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Dabei wandern die Proteine unter dem Einfluß des angelegten elektrischen Feldes durch die Poren des Polyacrylamidgels, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe des Proteins, der Porengröße des Gels, der Ladung und der angelegten Spannung abhängen. Während die Auftrennung der Proteine bei der nativen PAGE im nicht-denaturierten Zustand erfolgt, werden die Proteine zur Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht durch Bindung des Detergenz SDS proportional zu ihrer Größe negativ geladen (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste) und denaturiert.

14.1.2. Herstellung des SDS-Gels und Durchführung der Elektrophorese

Zunächst wurde zwischen die beiden gründlich gereinigten, durch Abstandshalter getrennten, zusammengeklammerten Glasplatten luftblasenfrei die Trenngellösung (s. Tabelle) bis ca. 2,5 cm unter den oberen Rand gegossen und mit ca. 200 µl Isobutanol überschichtet. Nach 30 min Polymerisationszeit wurde das Isobutanol entfernt, die Sammelgellösung (s. Tabelle) auf das mit $H_2O_{dest.}$ gespülte Trenngel gegossen und der Probentaschenkamm eingesetzt. Nach weiteren 30 min wurden die Klammern, der Abstandshalter und der Probentaschenkamm vorsichtig entfernt und die Probentaschen gründlich mit $H_2O_{dest.}$ gespült.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Gellösungen

	Trenngel	Sammelgel
	12,5 %	4 %
Lower Tris 4x	2.00 ml	
Upper Tris 4x		1.0 ml
Acrylamidlösung 30% (M/V) (Roth)	3.33 ml	0.52 ml
$H_2O_{bidest.}$	2.67 ml	2.47 ml
Ammoniumpersulfat (10% (M/V))	40 µl	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Das Gel wurde in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut und Elektrodenpuffer eingefüllt. Die Proteinproben wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt bzw. Pellets in 100 µl resuspendiert und 5 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifu-

giert, auf Eis gestellt und aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden 5 - 10 µl LMW-Standard (siehe Tabelle) aufgetragen

Tabelle 22: LMW-Standard (BIO-RAD)

Protein	Molekulargewicht
Phosphorylase b	97.4 kDa
Serumalbumin	66.2 kDa
Ovalbumin	45.0 kDa
Carbonic anhydrase	31.0 kDa
Trypsin inhibitor	21.5 kDa
Lysozym	14.0 kDa

Die Elektrophorese erfolgte für 10 min mit 10 mA (pro Gel) und anschließend mit 25 mA (pro Gel) bis die blaue BPB-Bande das Ende des Gels erreicht hatte. Die Dauer der Elektrophorese konnte in Abhängigkeit der zu trennenden Proteine variiert werden. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine im Gel angefärbt.

14.1.2. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Glasplatten entfernt und das Gel 1 h in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung mindestens so lange entfärbt, bis deutliche Proteinbanden sichtbar waren bzw. das Gel klar war. Zur Aufbewahrung wurde das Gel luftblasenfrei zwischen ein Filterpapier und eine Cellophan-Folie gelegt und 2 h im Geltrockner bei 80°C im Vakuum getrocknet.

14.2. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mittels des Bicinchoninsäure-(BCA) Protein-Nachweissystems von Pierce (St. Augustin, Deutschland) spektrometrisch bei 562 nm nach Herstellerangaben entsprechend dem Standardprotokoll bestimmt. Kalibriergeraden wurden mit BSA-Verdünnungen aufgenommen.

14.3. Bestimmung der P450-Konzentration

Die Konzentration von Cytochrom P450 wurde mittels der CO-Differenzspektroskopiemethode (Omura and Sato, 1964) und einem Extinktionskoeffizienten von ε = 91 $mM^{-1}cm^{-1}$ bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 125 nm/min in 0.1 nm Intervallen bestimmt. Hierzu wurde zu 5 ml des Zellaufschlusses eine Spatelspitze Natriumdithionit und 10 µl einer 0.1 %igen (M/V) Methylviologen-Lösung gegeben. Die vermischte leicht bläuliche Probe wurde zu gleichen Teilen in zwei 2 ml Küvetten verteilt. Die Meßküvette wurde etwa 1 min mit CO begast. Hierbei wurde das CO durch Zulauf von konz. Ameisensäure zu konz. Schwefelsäure hergestellt und mit Bariumhydroxid-Lösung und Wasser gewaschen. Die andere Probe diente als Referenz für die spektroskopische Messung.

Die Auswertung des Differenzspektrums erfolgte über die Absorptionsdifferenz $\Delta A_{450/490}$ mit dem Extinktionskoeffizienten ε = 91 $mM^{-1}cm^{-1}$ anhand der Formel:

$$[P\text{-}450]\ [\mu M] = \Delta A \times 1000 \times \text{Verdünnung} / \varepsilon$$

C Ergebnisse

1. Biotransformation

Mikroorganismen wurden auf ihre Fähigkeit überprüft, β- und/oder α-Ionon in 3-Position zu hydroxylieren. In einer ersten Runde wurden über 200 Mikroorganismen mit β-Ionon als Substrat getestet. Um ein solches Screening durchzuführen, mußten zunächst Kultivierungsbedingungen ausgetestet werden, die am Besten für ein solches Screening geeignet sind. Dabei wurden folgende Parameter untersucht:

- Stabilität des Substrats in verschiedenen Medien
- Wachstum der Zellen in verschiedenen Medien
- Toxizität des Substrats gegenüber Mikroorganismen

Zur Überprüfung des Wachstums der Zellen in verschiedenen Medien wurden 20 zufällig ausgewählte Stämme in vier verschiedenen Medien (Medium I-IV, C 2.1.) bei 30°C kultiviert. Sehr schlechtes Wachstum zeigten alle Stämme in dem synthetischen Medium II, das beste Wachstum zeigten alle mit dem Medium IV (Sojabohnenmehl/D-Mannitol). Parallel wurde hierzu das Substrat in den vier Medien bei 30°C inkubiert, um die Stabilität des Substrats darin zu überprüfen. β-Ionon war in allen vier Medien stabil. Zusätzlich wurde auch die Toxizität des Substrats gegenüber diesen 20 Mikroorganismen untersucht. β-Ionon zeigte gegenüber keinem der Stämme Toxizität.

1.1. Screening mit β-Ionon

In einer ersten Runde wurden 217 Bakterienstämme, v.a. Streptomyceten-Stämme aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Tübingen mit β-Ionon als Substrat umgesetzt. Nach fünf Tagen wurden die Umsetzungsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Dabei konnten 64 Stämme detektiert werden, die Umsetzungen zu polareren Produkten, wie z. B. hydroxylierten bzw. oxidierten Produkte durchführten. Diese Stämme, und zusätzlich noch acht Stämme, aus der Stammsammlung der BASF AG, darunter auch sechs Pilzstämme, und der Stamm *S. griseus* ATCC 13273, wurden in einer zweiten Screening-Runde über einen längeren Zeitraum mit β-Ionon als Substrat umgesetzt. Nach 10-12 Tagen konnte dünnschichtchromatographisch keine weitere Umsetzung von β-Ionon festgestellt werden. Die Kultivierungen wurden aufgearbeitet und die Produkt-

gemische per GC analysiert (Tabelle 23). Dabei wurde festgestellt, daß β-Ionon nicht zum gewünschten 3-Hydroxy- sondern zu 4- Hydroxy-β-ionon umgesetzt wurde (Abbildung 15).

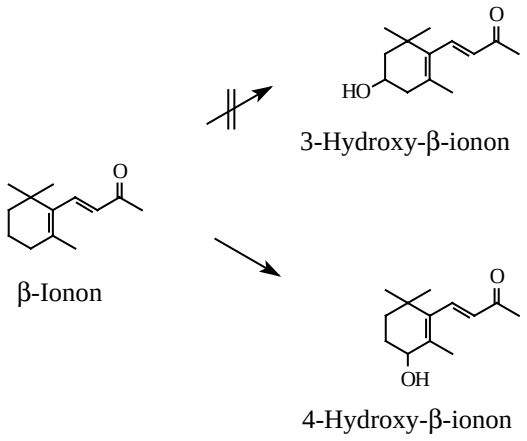


Abbildung 15: Gewünschte und tatsächliche Umsetzung von β-Ionon.

Allerdings wurde β-Ionon zu einem Hauptprodukt umgesetzt und nicht zu einem Produktgemisch, wie das bei Umsetzungen mit Pilzstämmen, wie z. B. *Aspergillus niger*, oft der Fall ist.

Tabelle 23: Biotransformation von β-Ionon durch verschiedene Mikroorganismen

Stämme	Umsatzraten [%][1]		
	β-Ionon	**4-Hydroxy-β-ionon**	**nicht identifizierte Verbindungen**
S. arenae Tü 495	66	33	1
S. antibioticus Tü 46	74	22	4
S. species Tü 124	86	12	2
A. niger LCP521	86	10	4
S. griseus ATCC 13273	88	10	2
S. griseus Tü 18	88	10	2
S. griseus Tü 781A	90	8	2
S. griseus Tü 17	90	8	2
S. violaceoniger Tü 38	91	7	2
S. exfoliatus Tü 1424	92	7	1
S. griseoviridis Tü 1963	92	6	2
S. antibioticus Tü 4	94	5	1
S. fradiae Tü 27	94	4	2
S. griseus Tü 16	94	5	<1
B. bassiana Lu 6343	94	<1	5
S. tendae Tü 21	95	4	<1
Rh. ruber Lu 8510	97	2	1
Ps. fluorescens Lu 8412	97	2	1
S. hygroscopicus Lu 1537	72	<1	27

S.: *Streptomyces*; *B.*: *Beauveria*; *Ps.*: *Pseudomonas*; *Rh.*: *Rhodococcus*; *A.*: *Aspergillus*; Tü: Institut für Biologie II, Universität Tübingen, Lu: Stammsammlung der BASF AG, Ludwigshafen, LCP: Musée National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Cryptogamie, Paris, Frankreich.

[1] Umsetzungsraten wurden durch GC-Analytik der Reaktionsgemische nach 10-12 Tagen Inkubation bestimmt. Um die Produktverhältnisse zu berechnen, wurden die FID-Werte des Substrats β-Ionon (Retentionszeit [Rt], 8.31), des 4-Hydroxy-Produkts (Rt, 16.36) und einer anderen, noch nicht identifizierten Verbindung addiert.

1.2. Hydroxylierung von α-Ionon

Da β-Ionon nicht zu 3-Hydroxy- sondern zu 4-Hydroxy-β-ionon umgesetzt wurde, wurde angenommen, daß die Hydroxylierung durch die elektronische Aktivierung der C-5=C-6-Doppelbindung in die Position 4 gelenkt wurde. Aus diesem Grund wurde nun als Substrat α-Ionon eingesetzt, da hier C-3 in allylischer Position zur Doppelbindung steht und damit der oxidative Angriff in diese Position gelenkt werden sollte.

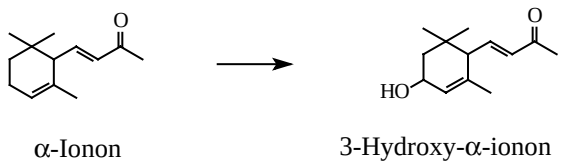


Abbildung 16: Erwartete Umsetzung von α-Ionon.

Die Stämme, die β-Ionon zum 4-Hydroxy-Produkt umsetzen konnten, wurden mit α-Ionon als Substrat inkubiert. Unter diesen 19 Stämmen konnten *S. fradiae* Tü 27, *S. arenae* Tü 495, *S. griseus* ATCC 13273, *S. violaceoniger* Tü 38 und *S. antibioticus* Tü 4 und Tü 46 α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon umsetzen. Bis auf *S. antibioticus* Tü 46 zeigten alle eine signifikant höhere Hydroxylierungsaktivität im Vergleich zu β-Ionon. *S. fradiae* z. B., setzte 75% des zum Kulturmedium zugegebenen α-Ionons um; damit zeigt dieser Stamm gegenüber dem α-Isomer eine 19fach höhere Aktivität als gegenüber dem β-Isomer. Die Ergebnisse der Biotransformation mit α-Ionon als Substrat sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Die GC- und NMR-Analytik der umgesetzten Reaktionsgemische zeigte eindeutig, daß alle Stämme α-Ionon zu einem Hauptprodukt und nicht zu einem Produktgemisch umsetzen. Eine detaillierte ^{1}H-NMR-Analyse (C 1.3.) zeigt eindeutig, daß es sich dabei tatsächlich um das erwartete 3-Hydroxy-α-ionon handelt.

Ausgehend vom racemischen α-Ionon [(+/-)6(*R*,*S*)] würde man erwarten, vier Diastereoisomere des Hydroxy-Produkts (Abbildung 17) in gleichen Mengen zu finden, wenn die Hydroxylierung nicht stereoselektiv ablaufen würde. Bei der Durchführung der gaschromatographischen Messungen mit einer chiralen Säule konnten nur Hauptprodukt-Peaks, die von den zwei Enantiomeren (3*R*,6*R*)- und (3*S*,6*S*)-Hydroxy-α-ionon stammen, detektiert werden (Abbildung 18). Diese beiden Peaks gehen auf einer achiralen Säule in einen Peak über.

Die Ergebnisse zeigten, daß die enzymatische Hydroxylierung von α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon durch *Streptomyces* Stämme folglich mit einer hohen Regio- und einer hohen Diastereoselektivität stattfindet.

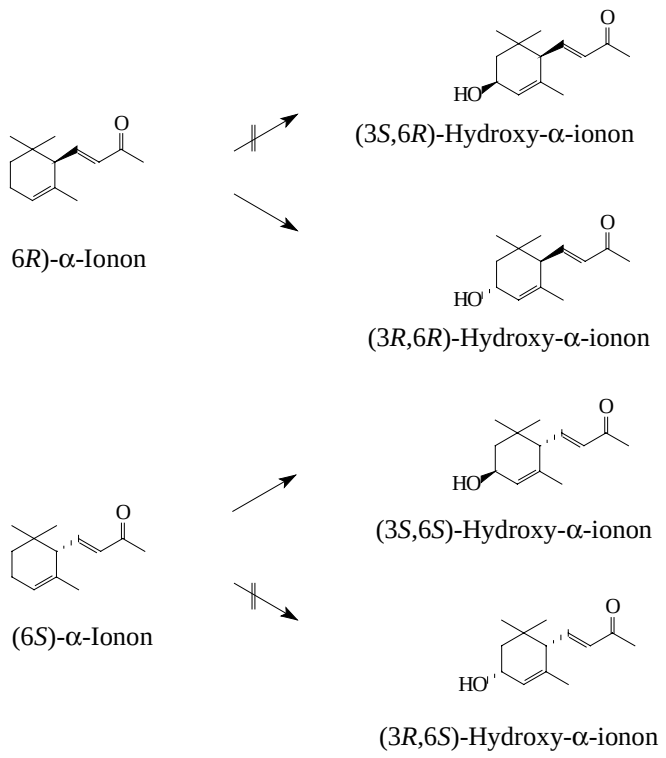


Abbildung 17: Hydroxylierung von (6*R*)- und (6*S*)-α-Ionon durch Streptomyceten-Stämme.

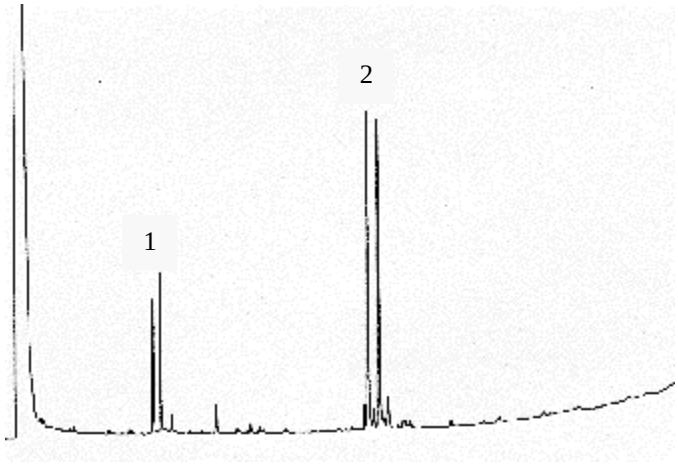


Abbildung 18: GC (chiral) der Umsetzung von α-Ionon mit *S. fradiae* Tü 27.

1: α-Ionon; 2: *trans*-3-Hydroxy-α-ionon

Tabelle 24: Biotransformation von α-Ionon.

Stämme	Umsatzraten [%][1]		
	α-Ionon	**3-Hydroxy-α-ionon**	**nicht identifizierte Verbindungen**
S. fradiae Tü 27	21	75	3
S. arenae Tü 495	35	54	6[1)], 2, 4[2)]
S. griseus ATCC 13273	49	50	1[3)]
S. violaceoniger Tü 38	55	44	<1
S. antibioticus Tü 4	68	28	4
S. antibioticus Tü 46	90	7	3
S. griseus Tü 17	94	<1	5
S. tendae Tü 21	79	0	21
S. griseoviridis Tü 1963	81	0	9
S. species Tü 124	94	0	6
S. exfoliatus Tü 1424	97	0	3
S. griseus Tü 781A	98	0	2
S. griseus Tü 18	98	0	2
S. griseus Tü 16	98	0	2
S. hygroscopicus Lu 1537	99	0	1
B. bassiana Lu 6343	99	0	1
Ps. fluorescens Lu 8412	99	0	1
Rh. ruber Lu 8510	99	0	1
A. niger LCP 521	99	0	1

S.: *Streptomyces*; *B.*: *Beauveria*; *Ps.*: *Pseudomonas*; *Rh.*: *Rhodococcus*; *A.*: *Aspergillus*; Tü: Institut für Biologie II, Universität Tübingen, Lu: Stammsammlung der BASF AG, Ludwigshafen, LCP: Musėe National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Cryptogamie, Paris, Frankreich.

[1] Umsetzungsraten wurden durch GC-Analytik der Reaktionsgemische nach 10-12 Tagen Inkubation bestimmt. Um die Produktverhaltnisse zu berechnen, wurden die FID-Werte des Substrats α-Ionon (Retentionszeit [Rt], 6.42/6.52), des 3-Hydroxy-Produkts (Rt, 14.92/15.36) und anderer, noch nicht identifizierten Verbindungen ([1)] Rt 4.68; [2)] Rt 13.3; [3)] Rt 10.2) addiert.

1.3. Charakterisierung der Struktur von (3*R*,6*R*)- und (3*S*,6*S*)-Hydroxy-α-ionon

Eine Biotransformation mit *S. fradiae*, bei der in der GC-Analytik ein ausreichender Umsatz des racemischen α-Ionons festgestellt wurde, wurde wie unter B 4.3.1. beschrieben aufgearbeitet. Die öligen Rückstände wurden in 1 ml $CDCl_3$ aufgenommen und nochmals über einem Molekularsieb getrocknet. Das filtrierte Extrakt wurde dann für die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Experimente verwendet.

Das (Signal-entkoppelte) ^{13}C-NMR-Spektrum zeigte 13 Signale für das Hauptprodukt (>80 %): eine Carbonyl Resonanz, 4 olefinische Kohlenstoff Resonanzen und 8 sp^3 Kohlenstoff Resonanzen. Die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Die Hydroxylierung an der allylischen Position kann eindeutig durch die NMR-Daten bewiesen werden (siehe Diskussion).

Sowohl die NMR als auch die GC/MS-Messungen zeigten, daß die Hydroxylierung nicht nur regio- sondern auch stereoselektiv stattfindet. Die OH-Gruppe an C-3 wurde transständig zu der Oxobutenyl-Seitenkette an C-6 eingeführt. Dies wird durch die kleine vicinale Kopplungskonstante zwischen 3-H und 4-H ($2{,}8_5$ Hz) begründet, die eine äquatoriale Stellung des anderen Protons an C-3 ausschließt, mit einer quasi-axialen OH-Gruppe.

Durch GC/MS-Messungen konnte zum einen die Struktur von 3-Hydroxy-α-ionon bestätigt werden und andererseits gezeigt werden, daß das *cis*-Enantiomer nur zu einem Anteil von 5% vorkommt.

Tabelle 25: NMR-Daten für (3*R*,6*R*)- und (3*S*,6*S*)-Hydroxy-α-ionon.

Position	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^{1}H	J (^{1}H,^{1}H) [Hz]
C-1	34,02	-	
C-2	43,98	1,328 (ax) 1,761 (eq)	^{3}J (2-H_a, 3-H) $6,5_5$ ^{3}J (2-H_e, 3-H) $5,9_5$ ^{2}J (2-H_a, 2-H_e) (-)13,4
C-3	65,40	4,197	^{3}J (3-H, 4-H) $2,8_5$ ^{5}J (3-H, 6-H) $1,9_5$ ^{5}J (3-H, 13-H) 1,8
C-4	126,10	5,558	^{4}J (4-H, 6-H) $1,7_5$
C-5	135,26	-	
C-6	54,38	2,433	^{3}J (6-H, 7-H) 10,2 ^{4}J (6-H, 8-H) 0,7 ^{4}J (6-H, 13-H) 0,9
C-7	147,51	6,476	^{3}J (7-H, 8-H) 15,8
C-8	133,71	6,031	
C-9	198,35	-	
C-10	27,27	2,196	
C-11_e	29,43	0,952	
C-12_a	24,64	0,815	
C-13	22,77	1,546	
3-OH		1,209	^{3}J (OH, 3-H) 6,4

Abkürzungen: ax: axial; eq: äquatorial

2. Identifizierung von P450-Genen

2.1. Konzept

Nach der Identifizierung von Stämmen, die in der Lage sind, α-Ionon selektiv zu 3-Hydroxy-α-ionon zu hydroxylieren, sollte das Gen, das für das verantwortliche Enzym kodiert, isoliert werden. Da diese Reaktionen meist von Monooxygenasen, insbesondere Cytochrom P450 katalysiert werden, sollten in diesen Stämmen P450-Gene identifiziert werden. Hierzu wurde nach dem in Abbildung 19 gezeigten Schema vorgegangen.

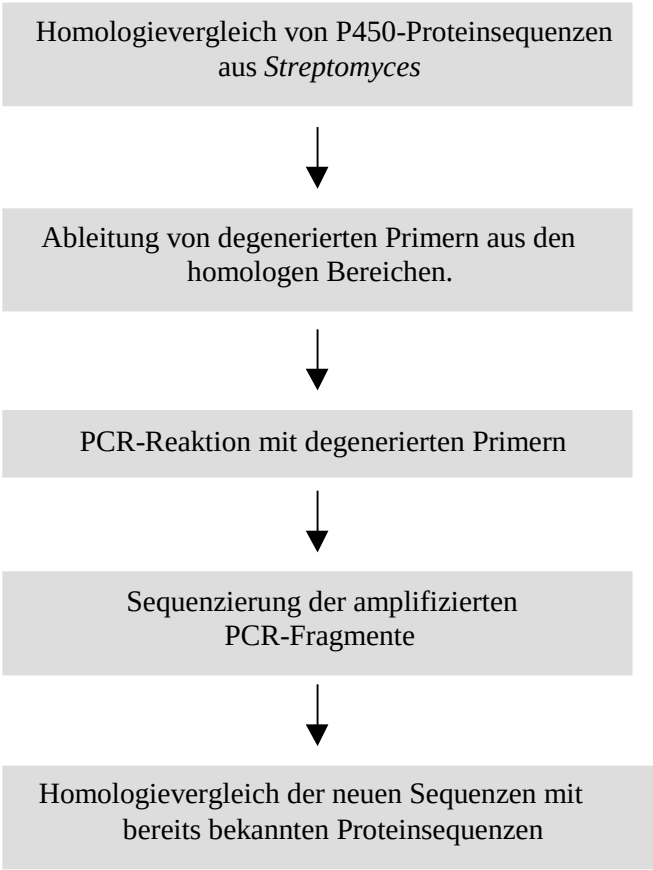


Abbildung 19: Schema des Konzepts zur Identifizierung von P450-Genen.

2.2. Ableitung der Primer

Zur Ableitung der degenerierten Primer wurde ein Homologievergleich der Aminosäuresequenzen bereits bekannter Cytochrom P450-Proteine aus *Streptomyces* durchgeführt. Für dieses Sequenzalignment wurden die Aminosäuresequenzen der P450-Hydroxylasen, die in Tabelle 26 aufgeführt sind, verwendet.

Tabelle 26: P450-Hydroxylasen, die für die Ableitung der Primer verwendet wurden.

Stamm	Gen	Protein	Accession number (Swiss Prot)
S. griseus	*soyC*	P450soy	P26911
S. griseolus	*suaC*	P450su1	P18326
	subC	P450su2	P18327
S. antibioticus	*choP*	CYP105C1	P23296
S. carbophilus	*sca2*	P450sca-2	D30815
S. hygroscopicus	*rapJ*	CYP122A2	Q59921
	rapN	CYP107G1	Q54302
S. griseus	*CYP*107F1	CYP107F1	Q59921
S. fradiae	*CYP*113B1	CYP113B1	Q59910
S. thermotolerans	*CYP*107C1	CYP107C1	Q60005

Die Primer konnten basierend auf drei hoch homologen Regionen entwickelt werden (siehe Abbildung 20): Die erste Region (AS 109-117) enthält konserviertes Aspartat und Prolin. Die zweite Region (AS 263-272) bildet die Sauerstoffbindungstasche mit konserviertem Glycin und die dritte Region (AS 377-385) die Häm-Bindungsregion mit konserviertem Cystein.

```
                  1                                                  50
Sca-2                 MTEMTE KATTFLTSQE APAFPADRTC PYQLPTAYSR LRDEPDALRP
SubC                     MTD TATTPQTT-D APAFPSNRSC PYQLPDGYAQ LRDTPGPLHR
SoyC              MTESTTDPAR QNLDPTSPAP ATSFPQDRGC PYHPPAGYAP LREGR-PLSR
SuaC                  MTTAER TAPPDALTVP ASRAP---GC PFDPAPDVTE AARTE-PVTR
ChoP                               MTQAA PVTFSTVREN YFGPPAEMQA LRHKA-PVTR
RapJ                        M STTDQGETGK ACPYPFAEME RLEIHPEYNR LRDAG-ELGR
Cyp107F1                   MEN TQVQNKETVR NCPFDYAH-- ELEFDPQLRQ LLTEE-PVSR
Cyp113B1            MTTQTLEA EKPPEPERTA NSVHPLAQPA GAGAR-GLLE WFARARAEAP
CYP107C1           MTALNLMDP EVLRDPFGAY AEIRAQAPLV RASYPWGAVQ WLATRYSDVK
RapN                               MSTEA QQESTPTARC PFSIQDGHRT ILETGTVGAH
 Consensus                           t   a   p             g    l        r

                  51                                                100
Sca-2             VTLYDGR-RA WVVTKHEAAR RLLADPRLSS DRL-HADFPA TSPRFKAFRQ
SubC              VTLYDGR-QA WVVTKHEAAR KLLGDPRLSS NRT-DDNFPA TSPRFEAVRE
SoyC              VTLFDGR-PV WAVTGHALAR RLLADPRLST DRS-HPDFPV PAERFAGAQR
SuaC              ATLWDGS-SC WLVTRHQDVR AVLGDPRFSA DAH-RTGFPF LTAGGREIIG
ChoP              TAFADGR-PG WLVTGYSAAR AVLSDSRFTA RGE-RE---- ----------
RapJ              VLMLDGR-EA WLAASWEDVA KVFVDPRFSR SATLGKDVPR VLP---A-IQ
Cyp107F1          IRMAYGEGEA WLVTRYEDVR TVTTDRRFSR SAVLGRDFPR MTP---EPIV
Cyp113B1          VFWDESR-QA WQVFRYDDYL TVSTNPQLFS S---DFSPVF PVPEELAILM
Cyp107C1          AVLTDPR-LV NNPANVPEMH LPHPYEQALG D---G----- GIPDEYVRYL
RapN              ELFGVKQ--- WLVAAAEDVK LVTNDPRFSS AA-------- --PSGILGDR
 Consensus            dgr    wlv    d    v  dprfs               p

                  101                                               150
Sca-2             GSPAFIGMDP PEHGTRRRMT ISEFTVKRIK GMRPDVERIV HGFIDDMLAA
SubC              SPQAFIGLDP PEHGTRRRMT ISEFTVKRIK GMRPEVEEVV HGFLDEMLAA
SoyC              RRVALLGVDD PEHNTQRRML IPTFSVKRIG ALRPRIQETV DRLLDAMERQ
SuaC              TNPTFLRMDD PEHARLRRML TADFIVKKVE AMRPEVQRLA DDLVDRMTTG
ChoP              -HPAVPRAAT LEDERCRRLI AGQFTARRMR QLTGRTERIV REHLDAMEHM
RapJ              DQPVIMLMDP PEHTRLRRVA TKALTSRRME ALRPRTQEVA DDLIDKMLAK
Cyp107F1          QAESINLMDP PASSRLRGLV AKSFTPRRVE QMRGGTQRVV DRLLDEMEEE
Cyp113B1          GPGTFGGIDP PRHGPLRKLV SQAFTPRRIA TLEPRIAEIT RGLLDGLREK
Cyp107C1          A-GSILSQDG PGHLRLRRLS SRAFTVRRVN ALRPRVTELA HRLLASLPDR
RapN              RPGWFSGMDS PEHNRYRQKI ARDFTLRAAR KQEEFIVRAA DSCLDDIEAS
 Consensus                md  peh rlRr      ft rr    lrpr  r   d lld m

                  151                                               200
Sca-2             GPT--ADLVS QFALPVPSMV ICHMLGVPYA DHEFFQDASK RLVQ-AV-D-
SubC              GPT--ADLVS QFALPVPSMV ICRLLGVPYA DHEFFQDASK RLVQ-ST-D-
SoyC              GPP--AELVS AFALPVPSMV ICALLGVPYA DHAFFEERSQ RLLR-GP-G-
SuaC              RTS--ADLVT EFALPLPSLV ICLLLGVPYE DHAFFQERSR VLLTLRS-T-
ChoP              GSP--ADLVE HFALPVPSLV IAELLGVPPP DREHFQHDTL RWGGFGR-S-
RapJ              GAP--ADLME DFALPLPIIM ICELLGVPIE DQTKFRTWSD QMLSNGAYS-
Cyp107F1          GSP--G-LRR PGLRALPLIT MCEALDIPEA DRPWLRAHAM TMMNVGAAG-
Cyp113B1          GQ---IDVVS DLAYPLPVIV IAELLGIPAE DRDLFREWVD VILNNEGMEY
Cyp107C1          AQDGVIDVLE DFSYPLSIDV ICEIVGIPEE AREQWHTWGS AFYTMD----
RapN              GPG--TDLVP GYAKRLASLA IHDLYGLNEE GPVLEGQMRA MEGGTD----
 Consensus        g     dlv   fa plps v icellg p e d   f

                  201                                               250
Sca-2             -------ADS AVAARDDFER YLDGLITKLE SEPGTGLLGK LVTHQLADGE
SubC              -------AQS ALTARNDLAG YLDGLITQFQ TEPGAGLVGA LVADQLANGE
SoyC              -------ADD VNRARDELEE YLGALIDRKR AEPGDGLLDE LIHRDHPDGP
SuaC              -------PEE VRAAQDELLE YLARLARTKR ERPDDAIISR LVAR----GE
ChoP              -------TEE VTEAFVSLGG QLQRLVRLKR TEPGDDLLSG LIAA---DPA
RapJ              -------QEV VMAAGQSLYL YLSELIAERR KQDTNDLLGS LVRARDKDDR
Cyp107F1          -------KQD AVRAKADVRG YFQELTADRR SPG-EDLIST LATARDGDEL
Cyp113B1          PNLPDDFSET MGPAIKEWGD YLYRRIALKR ETPTDDLMSG LIEAEVE-GR
Cyp107C1          -------PAV IGPAVRGMAD HLHLLIEQRR ATPTGDLLTG LVQAEDEQGE
RapN              --------ME SIKRLTDEFG HVLALVRAKR DEAGDRLLHR LAESG-EDEI
 Consensus                   a        yl  li   kR   p ddLl   L  a   dg
```

```
                 251                                                   300
Sca-2            -IDRAELIST ALLLLVAGHE TTASMTSLSV ITLLEHPDQH AALRADPSLV
SubC             -IDREELIST AMLLLIAGHE TTASMTSLSV ITLLDHPEQY AALRADRSLV
SoyC             -VDREQLVAF AVLLLIAGHE TTANMISLGT FTLLSHPEQL AALRAGGTST
SuaC             -LDDTQIATM GRLLLVAGHE TTANMTALST LVLLRNPDQL ARLRAEPALV
ChoP             -LTDEELASI AFLLLVAGHG TTAHQIALGA FLLLEHPDQL AALRADPALT
RapJ             -LSETELVGF AVTLLIAGYE TTANAIGNSV YTLLTHPEKL AELRKDLSLI
Cyp107F1         -LDDDELAVM AMVLLITGQD TTTYQLGNIA YTLLTRPDLL RSLRAEPQRL
Cyp113B1         RLTDEEIVNI VALLLTAGHI SSATLLGNLF LVLDEHREAQ AELRADRDLI
Cyp107C1         PLTDEEIATL VLTFVTAGNE TTAHLIGNGV AALLTHSDQL ALLRSDRRLL
RapN             LLSDEEATGV FATLLFAGHD SMQQMVGYSL YALLSHPEQR AALRENPDLI
 Consensus        l de#l    a  ll aGhe tta   g      Ll hp#gl a LRa#p l

                 301                                                   350
Sca-2            PGAVEELLRV LAIADI-AGG RIATADIEID GQLIRAGEGV IVTNSIANRD
SubC             PGAVEELLRY LAIADI-AGG RVATADIEVE GHLIRAGEGV IVVNSIANRD
SoyC             AVVVEELLRF LSIAE--GLQ RLATEDMEVD GATIRKGEGV VFSTSLINRD
SuaC             KGAVEELLRY LTIVHN-GVP RIATEDVLIG GRTIAAGEGV LCMISSANRD
ChoP             ESAVEELLRH LSVVHH-GPT RAALQDADIE GTPVKAGEVV VVSLGAANRD
RapJ             PKAVDELLRI IPIAKQASWV RMAVEDVELS GTIVKAGEAV AIQTHSANTD
Cyp107F1         PRTLEELLRH IPFRKGVGIP RIALEDVELS GVLIKAGDVV HVSYLTANRD
Cyp113B1         PGAIEETLRY RSPFNN-IF- RLLKEDTDIL GHPMKAGQMV VAWIASANRD
Cyp107C1         SQAVDELMRW CTPVQV-TQP RYATEDLDVG GVTVRKGEQV VAVIGAAGHD
RapN             DGAVEELLRF LPLNQL-GVP RVCVEDVELH GQTISAGDNV IPLYSTANRD
 Consensus         av#El$R  l       g   R a  #D #   G  i aG#  V       AnrD

                 351                                                   400
Sca-2            SSVFENPDRL DVHRSARH-- --HLSFGYGV HQCLGQNLAR LELEVILTVL
SubC             GTVYEDPDAL DIHRSARH-- --HLAFGFGV HQCLGQNLAR LELEVILNAL
SoyC             ADVFPRAETL DWDRPARH-- --HLAFGFGV HQCLGQNLAR AELDIAMRTL
SuaC             AEVFPGGDDL DVARDARR-- --HVAFGFGV HQCLGQPLAR VELQIAIETL
ChoP             PARFERPDAV DVTREDTG-- --HLAFGHGM HQCLGRQLAR IELRVALTAL
RapJ             PKVYDHPEEI DFHRTSNP-- --HMSLGHGA HHCMGAQLVR VEMQTALGSL
Cyp107F1         SAKFDRPDEL DPDRPTIP-- --HMTFGWGP HHCLGAPLAT MELEVGLLHA
Cyp113B1         SAHFSDPDTF DVRRQPNK-- --HMSFGHGI HHCLGSFLAR LEAKVFLELF
Cyp107C1         PDRFPDPERF DITRNHRAPH EAHVGFGFGP HYCLGAALAH QETAIALDTL
RapN             PGVFADPDTF DITRKPEH-- --NFAFGYGI HGCPGQHLAR VLIKVATVRL
 Consensus          v%  p#   D  R         h  fG G  H ClG  Lar  e  val  l

                 401                                   437
Sca-2            FDRIPTLRLA VPVEQLTLRP GTTIQGVNEL PVTW
SubC             MDRVPTLRLA VPVEQLVLRP GTTIQG-NEL PVTW
SoyC             FERLPGLRLA VPAHEIRHKP GDTIQGLLDL PVAW
SuaC             LRRLPDLRLA VPHEEIPFRG DMAIYGVHSL PIAW
ChoP             LERFPHLRLA CPAAEIPLRH DMQVYGADRL PVAW
RapJ             ISRIPALRFA VPEPRIKFLR GRLVPSLEAL PLTW
Cyp107F1         ADPLPGPASG RAARDVSWNT TSIWRYPLAL PVTW
Cyp113B1         FDEFSDYRVE HDEVEFYEED ELTARRLPVT VTRH
Cyp107C1         FDRFPSLALA VPPSALERQP FPGAWRLKSL PVRL
RapN             FERFPDVRLA ---GDVPMNE GLGLFSPAEL RVTWGAE
 Consensus       f rfp lrla vp                   l pv w
```

Abbildung 20: Vergleich der Aminosäuresequenzen von P450-Hydroxylasen aus *Streptomyces* erzeugt durch Multalign version 5.3.3. INRA France (Corpet, 1988). Hoch konservierte Aminosäurereste sind schwarz, zum Teil konservierte sind dunkelgrau unterlegt. Die homologen Regionen, aus denen die Primer konstruiert wurden, sind durch die Boxen unterlegt.

Tabelle 27: Homologe Bereiche verschiedener P450-Proteine zur Ableitung einer Konsensussequenz.

Gen	1. Homologe Region	2. Homologe Region O_2-Bindungstasche	3. Homologe Region Häm-Bindungsregion
sca-2	DPPEHGTRR	LLVAGHETTA	GYGVHQCLG
SubC	DPPEHGTRR	LLIAGHETTA	GFGVHQCLG
SoyC	DDPEHNTQR	LLIAGHETTA	GFGVHQCLG
SuaC	DDPEHARLR	LLVAGHETTA	GFGVHQCLG
ChoP	ATLEDERCR	LLVAGHGTTA	GHGMHQCLG
RapN	DPPEHTRLR	LLIAGYETTA	GHGAHHCMG
*CYP*107F1	DPPASSRLR	LLITGQDTTT	GWGPHHCLG
*CYP*113B1	DPPRHGPLR	LLTAGHISSA	GHGIHHCLG
RapJ	DSPEHNRYR	LLVAGHETTA	GYGIHGCPG
*CYP*107C1	DGPGHLRLR	LLFAGHDSMA	GFGPHYCLG
Konsensus	**DPPEHGRLR**	**LLVAGHETTA**	**GFGVHQCLG** *

* Auswahl der Aminosäuresequenz, von denen Primer abgeleitet werden sollen

Da Streptomyceten-Gene eine deutliche Präferenz für G+C-reiche Codons mit einer über 90 %igen Wahrscheinlichkeit für die Basen G und C in der dritten Position zeigen (Bibb et al., 1984; Wright und Bibb, 1992), wurde folgende Nukleotidauswahl unter Berücksichtigung dieser Kriterien getroffen (mit S = C oder G):

Primer 1: 5‘- GAC CCS CCS GAG CAC GGS CGS CTS CGS -3‘
Primer 2.1: 5‘- CTS CTS GTS GCS GGS CAC GAG ACS ACS GCS -3‘
Primer 2.2: 5‘- SGC SGT SGT CTC GTG SCC SGC SAC SAG SAG -3‘
Primer 3: 5‘- SCC SAG GCA CTG GTG SAC SCC GAA SCC -3‘

Wie in Abbildung 21 gezeigt, konnte mit den Primern 1 und 2.2 ein ca. 470 bp großes Fragment, mit 2.1 und 3 ein ca. 350 bp großes Fragment und mit 1 und 3 ein ca. 790 bp großes Fragment amplifiziert werden. Insgesamt hat das vollständige Gen eine Größe von ca. 1.2 kb.

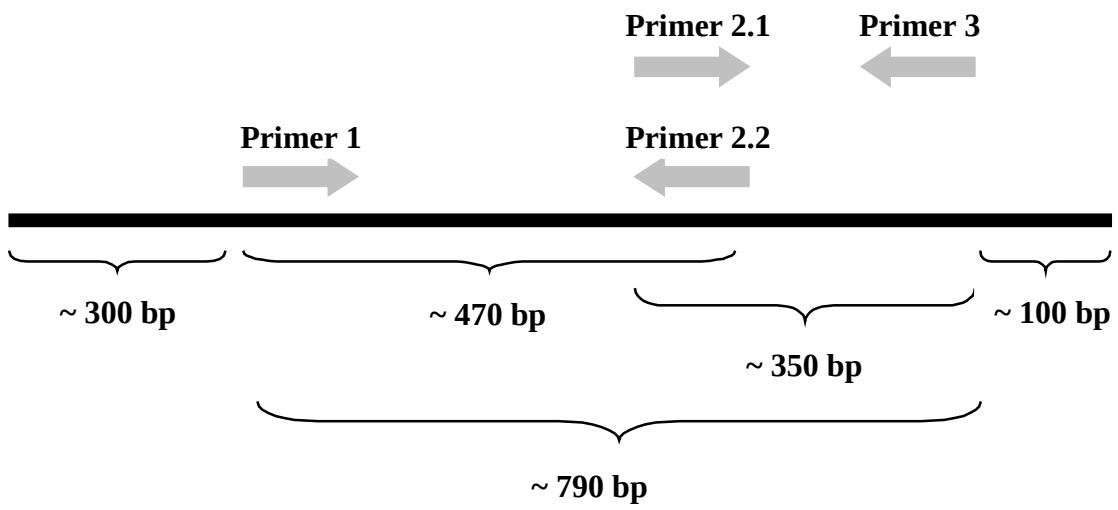


Abbildung 21: Schema für die mit den Primern 1, 2.1, 2.2 und 3 amplifizierten Fragmente.

Mit Hilfe der abgeleiteten Primer sollten P450-Gene aus den Stämmen Tü 4, Tü 27, Tü 38, Tü 495 und ATCC 13273, die mit α-Ionon eine Umsetzung zu 3-Hydroxy-α-ionon gezeigt hatten, identifiziert werden. Die genomische DNA aus diesen fünf Stämmen wurde zur Amplifikation der P450-Genfragmente in PCR-Reaktionen mit den entsprechenden Primern eingesetzt.

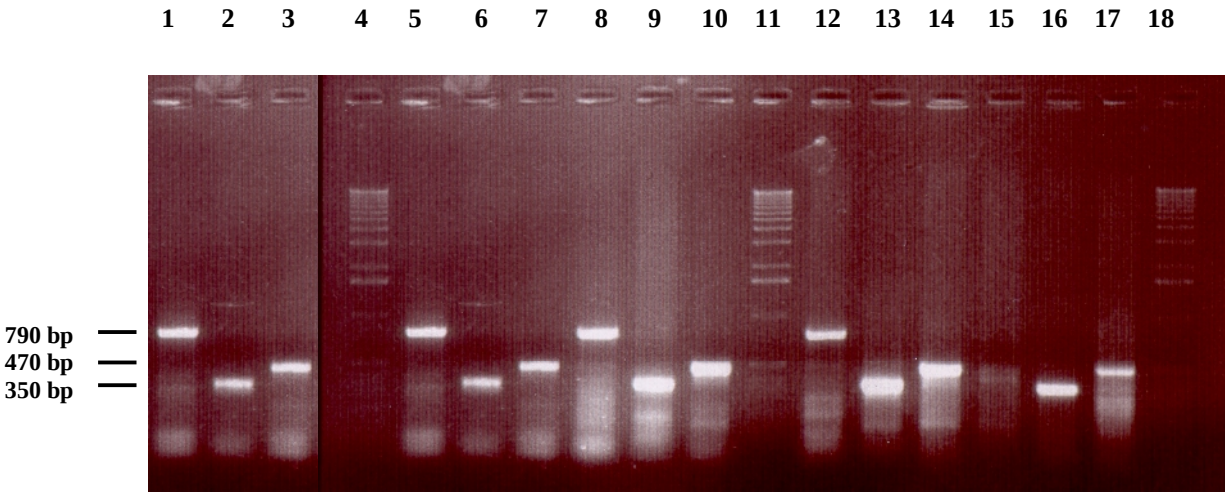


Abbildung 22: PCR-Reaktion zur Amplifizierung der P450-Genfragmente.
Spur 4, 11, 18: Standard; Spur 1-3: ATCC 13273; Spur 5-7: Tü 4; Spur 8-10: Tü 27; Spur 12-14: Tü 38; Spur 15-17: Tü 495; Spuren 1, 5, 8, 12 und 15: mit Primerpaar 1 und 3 amplifiziert; Spuren 2, 6, 9, 13 und 16 mit Primerpaar 1 und 2.2 amplifiziert; Spuren 3, 7, 10, 14 und 17: mit Primerpaar 2.1 und 3 amplifiziert.

Bei den Stämmen Tü 4, Tü 27, Tü 38 und ATCC 13273 konnten alle drei P450-Genfragmente amplifiziert werden, bei Tü 495 nur die zwei kleinen Fragmente. Für die Stämme Tü 4, Tü 27 und Tü 38 sollte nun das 790 bp große Fragment sequenziert werden. Auf die Sequenzierung des Fragments aus dem Stamm ATCC 13273 wurde verzichtet, da in diesem Stamm bereits ein P450-Gen bekannt war, und da dieser Stamm vergleichbare Umsatzraten von α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon wie Tü 38 gezeigt hatte.

Zur Sequenzierung der Genfragmente mußten die PCR-Produkte zuvor in pUC18 kloniert werden. Da eine blunt-end Ligation mißlang, wurden die Fragmente in die *Xba*I/*Eco*RI Schnittstelle von pUC18 kloniert (pUCP450-4, pUCP450-27, pUCP450-38). Hierzu wurden die Genfragmente nochmals mit den Primern 1' und 3', die die entsprechenden Schnittstellen besaßen, mittels PCR amplifiziert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* und Isolierung der Plasmid-DNA, wurden jeweils 10 – 20 Klone sequenziert.

Für Tü 27 und Tü 4 konnten jeweils zwei Sequenzen aus den DNA-Fragmenten erhalten werden, für Tü 38 sogar drei. Dies bedeutet, daß in diesen Stämmen jeweils mehrere P450-homologe Gene vorhanden sind. Die Sequenzen sind im folgenden aufgeführt.

```
1      GACCCGCCGGAGCACGGCCGCCTGCGCCGCATGGTGACGGCCCCCTTCACGATCAGGAAGATCGAGGCC

70     CTGCGGCCGTCCGTGCAGCGGATCGTGGACGACCTGATCGAGGAGATGCTCGCCGGGCCCAACCCCACC
                                                  Primer PGW4
                    Primer 27PR
139    GACCTGGTGGAGGCGTTCGCACTGCCGCCGCCCAGCCTGGTGATCTGCGCGCTGCTCGGCGTGCCGTAC
                    Primer 27P1
208    GAGCGGCACGACTTCTTCCAGCGCCACAGCCGCGTCCTGGTGCGCCGCACCTCCACCCGCGAAGAACTG
                    Primer PGW3
277    CTCGCCGCGTCCGAGGCGCTCACCGACTACCTGGACGACCTCCTGGCCGCCAAGCTCGCGCACCCTGAG

346    GACGATGTGCTCTCCCAGCTCGCCGTCCAGCGCGTCGCCACCGGCGAGCTGACCCGGCGCCAGGCCGCC

415    GAGATGGGCGTCCTGCTGCTCGTGGCGGGGCACGAGACCACCGCCAACATGATCGCGCTCGGCACCGTG
                         Primer 27P2
484    GCCCTGCTGCGCAACCCGGACCAACTCGCCCTGCTGCGCGACTGCGAAGACCCCAAGACGGTCGCCTCG
                                                                      Primer
553    GCCGTCGAGGAACTGCTGCGCTATCTGAACGTCGTCCACTCCGGGCGGCGGCGCGTCGCGCTGGAGGAC
        PGW1                                                Primer 27PF
622    ATCGAGATCGACGGTGAGCTGATCCGCGCGGGCGACGGCGTCATCTTCGCCAACGACATCGCCAACCGG
                                                                Primer PGW2
691    GACCCCGGCGTCTTCCCCGACCCCGACCGGCTCGACCTCACCCGCGACGCCCGCCGCCATGTCGCCTTC

760    GGCTTCGGGTTGCACCAGTGCCTCGGCGAATTCG
```

Abbildung 23: DNA-Sequenz von P450-27P.

Primer P1 und P2: Primer für die Sequenzierung von P450-27P; Primer PGW1, PGW2, PGW3 und PGW4: Primer für Long-Distance Genome-Walking PCR; Primer PF und PR: Primer für die direkte Sequenzierung der genomischen DNA.

```
1      GACCCGCCGGAGCACGGCCGCCTGCGCCGCATGCTGATCCCCAGCTTCGGCGTCAAGCGGATGAACGCC

70     ATCCGGCCCAGCCTGCAAAGCCTGGTCGACCGGCTCCTGGACGACATGCTGGCCAAGGGGCCGGTCGTG
                                                Primer 27QR
139    GACCTGGTGTCGGCCTTCGCCCTGCCCGTGCCCTCCATGGCGATCTGCGAACTCCTCGGCGTCCCCTAC
                                   Primer 27Q1
208    GGCGACCACGACTTCTTCGAGGAGTGCTCCCGCGACTTCGTGGGCGCCGCCACCTCCGGGGAAGCCGAC

277    GCGGCCTTCGCCAAGCTGTACCAGTACCTGCACGGCCTGGTCGCCAAGAAGCAGGCCGAGCCCGGGGAC

346    GGCCTCCTGGACGAGCTGATCGCCCGCCAGCTGGAGGAGGGCGAACTGGACCACAACGAGGTGGTCATG

415    ATCGCCCTGGTCCTGCTGGTGGCCGGCCATGAGACCACCGTCAACGCCATCGCCCTCGGCGCCCTCACC
                                   Primer 27Q2
484    CTCATGCAGCACCCCGAGCAGATCCCGGTGCTGCTGGACGACCCCGCCGCGGTGCCGGGCGTGGTCGAA

553    GAACTGCTGCGGTTCACCTCCGTCTCCGACTACATGGTGCGGATGGCCAAGGAGGACATCGAGGTCGAC
                                                Primer 27QF
622    GGCACGACCGTCAACGCCGGGGACGCCGTACTGGTCTCCATCACCCTGATGAACCGCGACGGCCAGGCG

691    TACGACGACCCCGACGTCTTCTACGCCCGCCGCAACGCGCGGCACCACGTCGGCTTCGGCGTGCACCAG

760    TGCCTCGGCGAATTC
```

Abbildung 24: DNA-Sequenz von P450-27Q.

Primer Q1 und Q2: Primer für die Sequenzierung von P450-27Q; Primer QF und QR: Primer für die direkte Sequenzierung der genomischen DNA.

```
1    CACGGGCGGCTGCGGCGCCTGGTGACGGCCCCCTTCACGATCAGGAAGGTCGAGGCCCTGCGGCCGTCC
70   GTGCAGCGGATCGTGGACGACCTGATCGAGGAGATGCTCGCCGGGCCCAACCCCACCGACCTGGTGGAG
139  GCGTTCGCACTGCCGCTGCCCAGCCTGGTGATCTGCGCGCTGCTCGGCGTGCCGTACGAGCGGCACGAC
208  TTCTTCCAGCGCCACAGCCGCGTCCTGGTGCGCCGCACCTCCACCCGCGAGGAACTGCTCGCCGCGTCC
277  GAGGCGCTCACCGACTACCTGGACGACCTCCTGGCCGCCAAGCTCGCGCACCCCGAGGACGATGTGCTC
346  TCCCAGCTCGCCGTCCAGCGCGTCGCCACCGGCGAGCTGACCCGGCGCCAGGCCGCCGAGATGGGCGTC
415  CTGCTGCTCGTGGCGGGCCATGAGACCACCGCCAACATGATCGCGCTCGGCACCGTGGCCCTGCTGCGC
484  AACCCGGACCAACTCGCCCTGCTGCGGGACTGCGAGGACCCCAAGACGGTCGCCTCGGCCGTCGAGGAG
553  CTGCTGCGCTATCTGAACATCGTCCACTCCGGGCGGCGGCGTGTCGCGCTGGAGGACATCGAGATCGAC
622  GGTGAGCTGATCCGCGCGGGCGACGGCGTCATCTTCGCCAACGACATCGCCAACCGGGACCCCGGCGTC
691  TTCCCCGACCCCGACCGGCTCGACCTCACCCGCGACGCCCGCCGCCATGTCGCCTTCGGCTTCGGCGTG
760  CACCAGTGCCTGGGC
```

Abbildung 25: DNA-Sequenz von P450-38/1

```
1    CTGCGGCGCATGCTGATCCCCAGCTTCGGCGTCAAGCGGATGAACGCCATCCGGCCCAGCCTGCAAAGC
70   CTGGTCGACCGGCTCCTGGACAACATGCTGGCCAAGGGGCCGGTCGTGGACCTGGTGTCGGCCTTCGCC
139  CTGCCCGTGCCCTCCATGGCGATCTGCGAACTCCTCGGCGTCCCCTACGGCGACCACGACTTCTTCGAG
208  GAGTGCTCCCGCGACTTCGTGGGCGCCGCCACCTCCGGGGAGGCCGACGCGGCCTTCGCCAAGCTGTAC
277  CAGTACCTGCACGGCCTGGTCGCCAAGAAGCAGGCCGAGCCCGGAGACGGTCTCCTGGACGAGCTGATC
346  GCCCGCCAGCTGGAGGAGGGCGGACTGGACCACAACGAGGTGGTGATGATCGCCCTGGTCCTGCTGGTG
415  GCCGGCCATGAGACCACCGTCAACGCCATCGCCCTCGGCGCCCTCACCCTCATGCAGCACCCCGAGCAG
484  ATCCAGGTGCTGCTGGACGACCCCGCCGCGGTGCCGGGCGTGGTCGAGGAACTGCTGCGGTTCACCTCG
553  GTCTCCGACTACATGGTCCGGATGGCCAAGGAGGACATCCAGGTCGGCGGCACGACCGTCAAGGCCGGG
622  GACGCCGTCCTGGTCTCCATCACCCTGATGAACCGCGACGCCCAGGCGTACGACGACCCCGACGTCTTC
691  GACGCCCCCCGCAACGCACGGCACCACGTCGGATTCGGCGTCCACCAGTGCCTCGGCGAATTC
```

Abbildung 26: DNA-Sequenz von P450-38/2

```
1    CCTCCGGAGCACGGGCGGCTGCGGCGGATGATGATCCCGTCGTTCACCCTCAAACGCGCCGGCGGCCTG
70   CGGCCCGCCATCCAGCGGATCGTGGACGGCCTGCTGGACACGATGATCGAACAGGGGCCGCCCGCCGAT
139  CTGGTCCCCGCCTTCGCGCTGCCCGTGCCGTCGATGGTGATCTGCGATGTGCTCGGCGTGCCCTACGCC
208  GACCACGAGTTCTTCGAGGAGCAGTCCAGGCGGCTGCTGCGCGGGCCGACCGCCGCGGACAGCCAGGGC
277  GCCCGCGACCGCCTGGAGGAGTATCTGGGCGGCCTCGTCGACGCCAAGGCCCGGCAGTCCGAGCCCGGT
346  GACGGCGTCCTCGACGACCTCGTCCACCAGCAGCTGAGCCAGGGCACACTGGAACGTGCCGATGTCGTC
415  TCGCTCGCGGTGATCCTGCTGGTCGCGGGCCATGAGACGACCGCCAACATGATCTCCCTCGGCACCTTC
```

```
484   ACCCTGCACCAGAACCCCGGCCGGCTGGCCGAGCTGCGCGCGGATCCGGCGCTGCTGCCCGCGGCCGTC
553   GAGGAACTGATGCGGATGCTGTCCATCGCCGACGGGCTGGCCCGGGTGGCGCTCCAGGACATCGAGATC
622   GACGGCACCACGATCCGGGCCGGTGAGGGCGTCTTCTTCTCCACGTCGGTGATCAACCGGGACCCGGGT
691   CAGTACGAGGAACCCGACGCCCTGGACTTCCACCGGCCCACCCGCCACCACGTGGCGTTCGGCTTCGGC
760   GTCCACCAGTGC
```

Abbildung 27: DNA-Sequenz von P450-38/6

```
1     ATGCTGATACCGGAGTTCACGGCCCGGCGGGTGCGGGAGCTGCGGCCGCGGATCCAGCAGATCGTGGAC
70    GAGCACGTGGACGCGATGCTGGCCGCGGGCGGCCCGGTGGACCTGGTCACCGCCCTCGCGCTGCCGGTG
139   CCCTCGCTGGTGATCTGCGAACTGCTCGGCGTGCCCTACGAGGACTATGCGCGGTTCGAGGAGTGGTCG
208   GCGGCGCTGATGAACCACGACCTGAGCCCGCAGGAGTACGGGGCTGCCGTGCAGGCCCTGGACACGTAC
277   CTCGACCAGCTCGTCACCCTGAAGGAGAACGAGCCGGGCGACGACCTCATCAGCCGCTTCCTGGAGAAG
346   AACCGCACCGAGCAGGTCGCCGACCACACCGATGTGGTGACGATGGCCCGGCTGATGCTGGTCGGCGGC
415   CACGAGACCACCGCCAACATGATCGCCCTCGGGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCACCCGGAGCAGATGGCC
484   GAGCTGCGGGCCGATCCGGCCCTGCTGCCGAACGCCGTGGAGGAGTTGCTGCGCGTCTTCTCCATCTCC
553   GACGCCGGCACCGCCCGGGTCGCGGTGGCGGACATCGAGGTCGGCGACGTCACCATCCGCGCGGGCGAG
622   GGCATCCTCGCCCTGAACAACGCGGCCGACCACGACGAGTCGGTCTTCCCGGACCCGGACACCCTCGAC
691   ATCCACCGCAAGGAGGCCCGCTCCCACCTGGCG
```

Abbildung 28: DNA-Sequenz von P450-4/1

```
1     ATGCTGGCCCCGGAGTTCAGTGTGCGGCGGATGCGCGAGCTGCGCGGCCGGGTGCGGCAGATCGTGGAC
70    CAGCAGATCGACCACATGCTGGAGAAGGGCGCCGACGGCCCGGTCGACCTGGTCACCGCCCTCGCCCTG
139   CCGGTGCCCTCCCTGGTGATCTGCGAACTGCTCGGCGTCCCCTACGAGGACCACGGCCGGTTCGAGGAG
208   TGGGCGTGGGCCATCATGAACCACGACATCAGCGAGGAGGACCGCGGCCGCGCCCACTACGAGCTGGAC
277   CGGTACGTGGACGGGCTGGTCACCGCCAAGGAGAGCGAGCCGGGCGACGACATGATCAGCCGGCTGATC
346   GAGTTCAACCGGCAGACACCGGCCGTGGAACACTCCGACATCGTCAGCATGTCCAAGCTGATGCTGGTC
415   ACCGGGCACGAGACGACCGCCAACATGATCGCGCTTGGTGTGCTGGCCCTGCTGGAGCACCCGGACCAG
484   CTGGCCGCAGTCCGCGCGGAGCCGGAGCTGATGCCGCGCGCGGTGGAGGAGCTGCTGCGCTTCTTCTCC
553   ATCTCCGACGCGGGCACCGCGCGGGTCGCCCTGGAGGACATCGAGCTGGGCGGGGTCACCATCCGGGCC
622   GGTGAGGGGATCCTGCCGCTGAACAACGCGGCCAACCACGACGCCCGCGTCTTCCCCGACCCCGACCGC
691   CTGGACGTGCGCCGCGAGGCCCGCAGCCAGCTGGCGTTCGGG
```

Abbildung 29: DNA-Sequenz von P450-4/9

Ein Homologievergleich der Aminosäuresequenzen der isolierten Fragmente und der P450-Hydroxylasen aus *Streptomyces* (Abbildung 30) zeigen bemerkenswerte Identität untereinander und zu den P450-Hydroxylasen aus *S. griseolus*, *S. griseus*, *S. hygroscopicus*, *S. antibioticus* und *S. venezuelae*. Zwischen P450-27P und P450-38/1 besteht eine Homologie von 98.5 % zwischen P450-27Q und P450-38/2 von 95.2 %. Über 50 % Homologie zeigen sie mit den Hydroxylasen aus dem Stamm *S. griseolus* ($P450_{su1}$ und $P450_{su2}$) und bis zu 50 % mit *S. griseus* ($P450_{soy}$).

```
             101                                                        150
P450-27P            DPP EHGRLRRMVT APFTIRKVEA LRPSVQRIVD DLIEEMLA-G
P450-38/1             HGRLRRLVT APFTIRKVEA LRPSVQRIVD DLIEEMLA-G
P450-27Q            DPP EHGRLRRMLI PSFGVKRMNG IRPSLQSLVD RLLDDMLA-K
P450-38/2                 LRRMLI PSFGVKRMNA IRPSLQSLVD RLLDNMLA-K
P450-38/6             PP EHGRLRRMMI PSFTLKRAGG LRPAIQRIVD GLLDTMIE-Q
SuaC        NPTFLRMDDP EHARLRRMLT ADFIVKKVEA MRPEVQRLAD DLVDRMTT-G
SubC        PQAFIGLDPP EHGTRRRMTI SEFTVKRIKG MRPEVEEVVH GFLDEMLA-A
SoyC        RVALLGVDDP EHNTQRRMLI PTFSVKRIGA LRPRIQETVD RLLDAMER-Q
RapJ        QPVIMLMDPP EHTRLRRVAT KALTSRRMEA LRPRTQEVAD DLIDKMLA-K
OleP        PDGVLAQDPP DHTRLRRLVG KAFTARRVEE MRPRVRSLVD SLLDDMVA-H
PikC        NHNMLESDPP RHTRLRKLVA REFTMRRVEL LRPRVQEIVD GLVDAMLA-A
P450-4/1                     MLI PEFTARRVRE LRPRIQQIVD EHVDAMLAAG
P450-4/9                     MLA PEFSVRRMRE LRGRVRQIVD QQIDHMLEKG
 Consensus          dpp eh rlrr$   p Ft rr    lRP vq ivD  l # Mla

             151                                                        200
P450-27P    -PNPTDLVEA FALPPPSLVI CALLGVPYER HDFFQRHSRV LVRRTS-TRE
P450-38/1   -PNPTDLVEA FALPLPSLVI CALLGVPYER HDFFQRHSRV LVRRTS-TRE
P450-27Q    -GPVVDLVSA FALPVPSMAI CELLGVPYGD HDFFEECSRD FVG-AA-TSG
P450-38/2   -GPVVDLVSA FALPVPSMAI CELLGVPYGD HDFFEECSRD FVG-AA-TSG
P450-38/6   -GPPADLVPA FALPVPSMVI CDVLGVPYAD HEFFEEQSRR LLR-GP-TAA
SuaC        -RTSADLVTE FALPLPSLVI CLLLGVPYED HAFFQERSRV LLTLRS-TPE
SubC        -GPTADLVSQ FALPVPSMVI CRLLGVPYAD HEFFQDASKR LVQ-ST-DAQ
SoyC        -GPPAELVSA FALPVPSMVI CALLGVPYAD HAFFEERSQR LLR-GP-GAD
RapJ        -GAPADLMED FALPLPIIMI CELLGVPIED QTKFRTWSDQ MLSNGAYSQE
OleP        -GSPADLVEF LAVPFPVAVI CELLGVPLED RDLFRTFSDA MLSSTRLTAA
PikC        PDGRADLMES LAWPLPITVI SELLGVPEPD RAAFRVWTDA FVFPD--DPA
P450-4/1    --GPVDLVTA LALPVPSLVI CELLGVPYED YARFEEWSAA LMNHDL-SPQ
P450-4/9    ADGPVDLVTA LALPVPSLVI CELLGVPYED HGRFEEWAWA IMNHDI-SEE
 Consensus   g p DLv a fAlPvPs vI CeLLGVPyed h fFee s   l      t

             201                                                        250
P450-27P    ELLAASEALT EYLDDLLAAK --LAHPEDDV LSQLA-VQRV ATGELTRRQA
P450-38/1   ELLAASEALT DYLDDLLAAK --LAHPEDDV LSQLA-VQRV ATGELTRRQA
P450-27Q    EADAAFAKLY QYLHGLVSKK --QAEPGDGL LDELI-ARQL EEGELDHNEV
P450-38/2   EADAAFAKLY QYLHGLVAKK --QAEPGDGL LDELI-ARQL EEGGLDHNEV
P450-38/6   DSQGARDRLE EYLGGLVDAK ARQSEPGDGV LDDLV-HQQL SQGTLERADV
SuaC        EVRAAQDELL EYLARLARTK --RERPDDAI ISRLV-AR-- --GELDDTQI
SubC        SALTARNDLA GYLDGLITQF --QTEPGAGL VGALV-ADQL ANGEIDREEL
SoyC        DVNRARDELE EYLGALIDRK --RAEPGDGL LDELI-HRDH PDGPVDREQL
RapJ        VVMAAGQSLY LYLSELIAER --RKQDTNDL LGSLVRARDK D-DRLSETEL
OleP        EIQRVQQDFM VYMDGLVAQR --RDAPTEDL LGALALATDN D-DHLTKGEI
PikC        QAQTAMAEMS GYLSRLIDSK --RGQDGEDL LSALVRTSDE DGSRLTSEEL
P450-4/1    EYGAAVQALD TYLDQLVTLK --ENEPGDDL ISRFL-EKNR TEQVADHTDV
P450-4/9    DRGRAHYELD RYVDGLVTAK --ESEPGDDM ISRLI-EFNR QTPAVEHSDI
 Consensus  e  aA   $   Y$  Lv  k     epg#dl l  L         g l   #
```

```
            251                                                                  300
P450-27P    AEMGVLLLVA GHETTANMIA LGTVALLRNP DQLALLRDCE DPKTVASAVE
P450-38/1   AEMGVLLLVA GHETTANMIA LGTVALLRNP DQLALLRDCE DPKTVASAVE
P450-27Q    VMIALVLLVA GHETTVNAIA LGALTLMQHP EQIPVLLD-- DPAAVPGVVE
P450-38/2   VMIALVLLVA GHETTVNAIA LGALTLMQHP EQIQVLLD-- DPAAVPGVVE
P450-38/6   VSLAVILLVA GHETTANMIS LGTFTLHQNP GRLAELRA-- DPALLPAAVE
SuaC        ATMGRLLLVA GHETTANMTA LSTLVLLRNP DQLARLRA-- EPALVKGAVE
SubC        ISTAMLLLIA GHETTASMTS LSVITLLDHP EQYAALRA-- DRSLVPGAVE
SoyC        VAFAVILLIA GHETTANMIS LGTFTLLSHP EQLAALRA-- GGTSTAVVVE
RapJ        VGFAVTLLIA GYETTANAIG NSVYTLLTHP EKLAELRK-- DLSLIPKAVD
OleP        VNMGVSLLIA GHETSVNQIT NLVHLLLTER KRYESLVA-- DPALVPAAVE
PikC        LGMAHILLVA GHETTVNLIA NGMYALLSHP DQLAALRA-- DMTLLDGAVE
P450-4/1    VTMARLMLVG GHETTANMIA LGVLALLEHP EQMAELRA-- DPALLPNAVE
P450-4/9    VSMSKLMLVT GHETTANMIA LGVLALLEHP DQLAAVRA-- EPELMPRAVE
 Consensus  v ma  $L!a GHETTaNmia lg   L$ hP  gla Lra   #p lvp aVE

            301                                                                  350
P450-27P    ELLRYLNVVH SGRR-RVALE DIEIDGELIR AGDGVIFAND IANRDPVIFP
P450-38/1   ELLRYLNIVH SGRR-RVALE DIEIDGELIR AGDGVIFAND IANRDPGVFP
P450-27Q    ELLRFTS-VS DYMV-RMAKE DIEVDGATVN AGDAVLVSIT LMNPDGQAYD
P450-38/2   ELLRFTS-VS DYMV-RMAKE DIQVGGTTVK AGDAVLVSIT LMNRDAQAYD
P450-38/6   ELMRMLS-IA DGLA-RVALQ DIEIDGTTIR AGEGVFFSTS VINRDPGQYE
SuaC        ELLRYLTIVH NGVP-RIATE DVLIGGRTIA AGEGVLCMIS SANRDAEVFP
SubC        ELLRYLAIAD IAGG-RVATA DIEVEGHLIR AGEGVIVVNS IANRDGTVYE
SoyC        ELLRFLSIAE -GLQ-RLATE DMEVDGATIR KGEGVVFSTS LINRDADVFP
RapJ        ELLRIIPIAK QASWVRMAVE DVELSGTIVK AGEAVAIQTH SANTDPKVYD
OleP        EMLRYTPLVS AGSFVRVATE DVELSTVTVR AGEPCVVHFA SANRDEEVFD
PikC        EMLRYEGPVE SATY-RFPVE PVDLDGTVIP AGDTVLVVLA DAHRTPERFP
P450-4/1    ELLRVFSISD AGTA-RVAVA DIEVGDVTIR AGEGILALNN AADHDESVFP
P450-4/9    ELLRFFSISD AGTA-RVALE DIELGGVTIR AGEGILPLNN AANHDARVFP
 Consensus  E$LR  siv   g   RvA e D!#  g t!r AG#g!      a#rD  v%p

            351                                                                  400
P450-27/P   DPDRLDL-TR DARRHVAFGF GVHQCLG
P450-38/1   DPDRLDL-TR DARRHVAFGF GVHQCLG
P450-27Q    DPDVFYA-RR NARHHV--GF GVHQCLG
P450-38/2   DPDVFDA-PR NARHHV--GF GVHQCLGEF
P450-38/6   EPDALDF-HR PTRHHVAFGF GVHQC
SuaC        GGDDLDV-AR DARRHVAFGF GVHQCLGQPL ARVELQIAIE TLLRRLPDLR
SubC        DPDALDI-HR SARHHLAFGF GVHQCLGQNL ARLELEVILN ALMDRVPTLR
SoyC        RAETLDW-DR PARHHLAFGF GVHQCLGQNL ARAELDIAMR TLFERLPGLR
RapJ        HPEEIDF-HR TSNPHMSLGH GAHHCMGAQL VRVEMQTALG SLISRIPALR
OleP        HADELDF-HR ERNPHIAFGH GAHHCIGAQL GRLELQEALS ALVRRFPTLD
PikC        DPHRFDI-RR DTAGHLAFGH GIHFCIGAPL ARLEARIAVR ALLERCPDLA
P450-4/1    DPDTLDIHRK EARSHLA
P450-4/9    DPDRLDV-RR EARSQLAFG
 Consensus  dp# lD   R  ar H afGf gvhqclg
```

Abbildung 30: Vergleich der Aminosäuresequenzen der isolierten Genfragmente und bekannter P450-Hydroxylasen erzeugt durch Multalign version 5.3.3. INRA France (Corpet, 1988). Hoch konservierte Aminosäurereste sind schwarz, zum Teil konservierte sind dunkelgrau unterlegt.

Wie man bei diesem Homologievergleich sieht, gibt es wieder einige Bereiche mit hoher Identität. In den Regionen der Sauerstoffbindungstasche (255-272) sind, wie bei allen P450-Spezies, die Aminosäuren Gly-261 und Tyr-264 konserviert. Auch in dem Bereich von AS 160 – 179 liegen die Aminosäuren Ala-162, Pro-164, Pro-166, Ile-170, Leu-171, Gly-172, Val-173 und Pro-174 hoch konserviert vor. Weitere hoch homologe Bereiche gibt es bei AS 298-304 und 316-335. Diese zahlreichen homologen Bereichen mit den hoch konservierten Aminosäuren, insbesondere die der Sauerstoffbindungstasche, lassen darauf schließen, daß die amplifizierten DNA-Fragmente tatsächlich für P450-Hydroxylasen kodieren.

3. Isolierung des gesamten P450-Gens aus *Streptomyces fradiae* Tü 27

Nach Identifizierung der 790 bp großen P450-Genfragmente sollte nun für *S. fradiae* Tü 27, der die beste Umsetzungsrate von α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon gezeigt hatte, die vollständigen P450 Gensequenzen, ausgehend von den Sequenzen der Fragmente P450-27P und P450-27Q, ermittelt werden. Dabei wurde nach folgender Strategie (Abbildung 31) vorgegangen:

1.) Direktsequenzierung der genomischen DNA von Tü 27

2.) Genome-Walking-Methode: Long-Distance Genome-Walking-PCR

3.) Erzeugung von subgenomischen DNA-Banken und anschließendes Screening mit den Genfragmenten P450-27P und P450-27Q als Sonden.

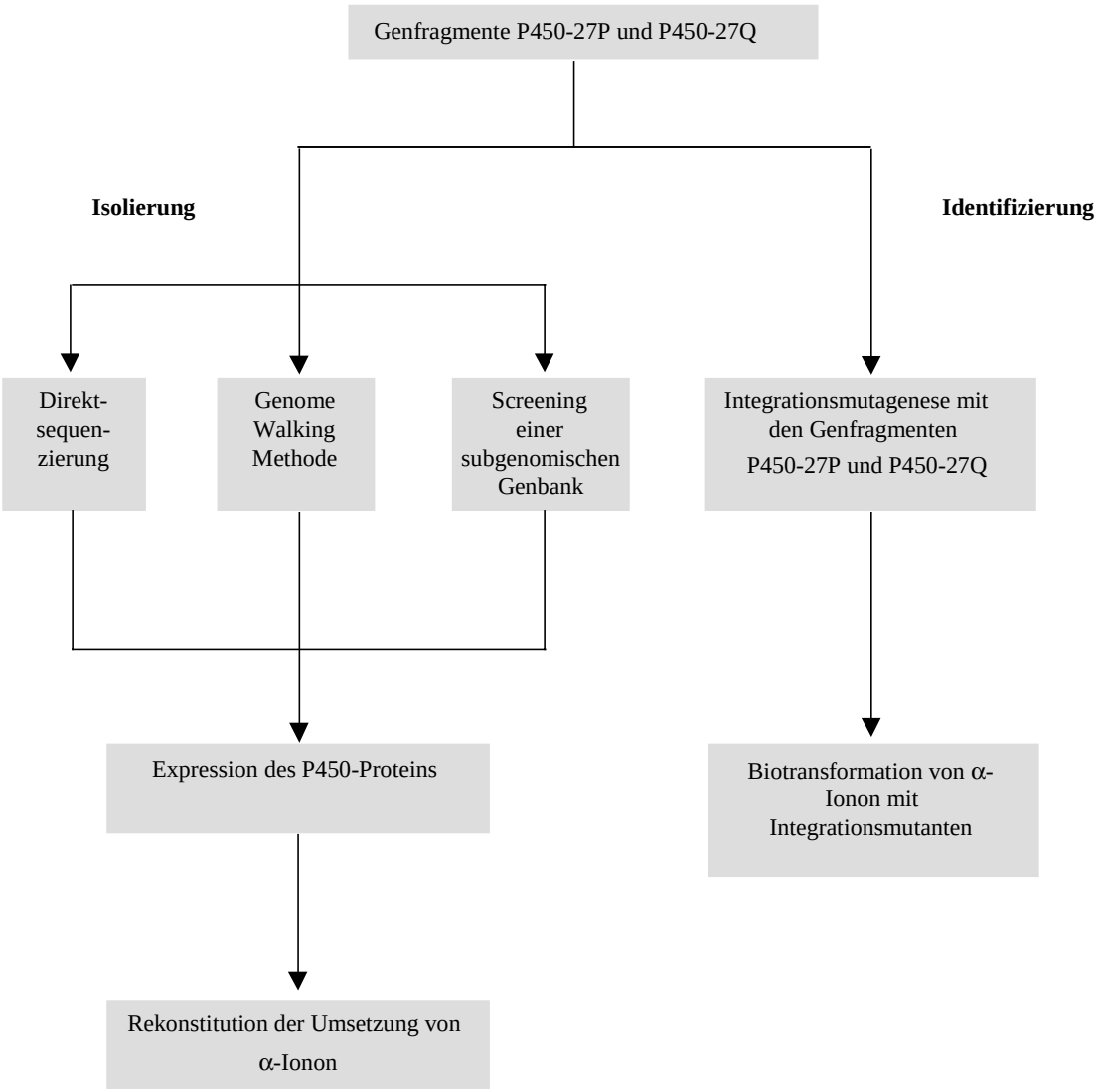


Abbildung 31: Schema der Strategie zur Isolierung der vollständigen P450-Gene aus *S. fradiae* Tü 27 und Identifizierung der richtigen Hydroxylase.

Anschließend sollte das P450-Gen in ein geeignetes Expressionssystem kloniert und in *E. coli* exprimiert werden. Hierzu wurde als Vorarbeit an einem bereits bekannten Gen einer P450-Hydroxylase aus *Streptomyces griseus* Expressionsversuche durchgeführt (siehe C 5).
Der Nachweis, daß es sich bei dem isolierten Protein um das P450-Protein handelt, das die Hydroxylierung von α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon katalysiert, sollte dann durch Umsetzung des α-Ionons mit dem P450-Enzym erbracht werden. Für die Rekonstitution dieser Reaktion werden jedoch zusätzlich NADPH als Cofaktor, NADPH-Reduktase und evtl. Ferredoxin für den Elektronentransport benötigt. Falls bei dieser Rekonstitution die selektive Hydroxylierung von α-Ionon nicht funktioniert, kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden, daß es sich evtl. um das "richtige" P450 handelt, da die Reaktion von zu vielen Komponenten abhängt. Aus diesem Grund wurde für die Identifizierung des "richtigen" Gens eine Integrationsmutagenese durchgeführt (siehe C 4). Mit dieser Methode sollte das Zielgen in der chromosomalen DNA "ausgeschalten" werden. Eine Umsetzung von α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon mit dem mutierten Stamm sollte nicht mehr möglich sein, wenn das richtige Gen ausgeschaltet wurde.

3.1. Direktsequenzierung der genomischen DNA

Für die Direktsequenzierung der genomischen DNA mußte sehr reine und hoch konzentrierte DNA isoliert werden. Hierzu standen verschiedene Methoden zur Verfügung:

1. Gesamt-DNA-Isolierung durch Phenolextraktion
2. Gesamt-DNA-Isolierung über Anionenaustauschersäulen: a) Genomic tip
   b) QIAamp spin column

Mit Phenolextraktion konnte genomische DNA mit einer Konzentration von 700 µg/ml und einer Qualität von $OD_{260/280}$ = 1.96 isoliert werden. Mit den Anionenaustauschersäulen konnte ebenfalls erfolgreich DNA isoliert werden. Allerdings konnten nur geringe Mengen DNA isoliert werden, so daß keine genaue Konzentrationsbestimmungen durchgeführt und damit auch keine eindeutigen Aussagen über die Qualität der DNA-Probe getroffen werden konnten.
Die Sequenzierung der genomischen DNA wurde mit zwei Methoden durchgeführt. Die eine beruhte auf der herkömmlichen Methode der DNA-Sequenzierung unter Zusatz von Q-Lösung. Die andere Methode die angewandt wurde, wurde für die Sequenzierung sehr großer Template-DNA mit BigDye Terminatoren beschrieben (Heiner et al., 1998). In Tabelle 28 sind die Reaktionsansätze der beiden Methoden aufgeführt.

Tabelle 28: Reaktionsansätze für die Sequenzierung der genomischen DNA

Komponente	**Ansatz normal**	**Ansatz nach Heiner**
BigDye	8 µl	16 µl
Primer	2 µl (2 pmol)	13 µl (13 pmol)
DMSO	-	2 µl (5 %)
Q-Lösung (Qiagen)	4 µl	-
Genom. DNA	6 µl (~ 4 µg)	3 µl (~ 2 µg)
H_2O	-	6 µl
Total	20 µl	40 µl

Für die Sequenzierung von *P450-27P* wurden die Primer 27P1, 27P2 und 27PF und 27PR (siehe Abb. 23) eingesetzt, für die Sequenzierung von *P450-27Q*, die Primer 27Q1, 27Q2, 27QF und 27QR (siehe Abb. 24). Beim normalen Ansatz wurde das Primer/DNA-Verhältnis ebenfalls variiert. Für diesen Ansatz wurde die PCR in einem Eppendorf Cycler unter den unter B 7.4.1 Tabelle 13 beschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Für die Methode nach Heiner wurde die Reaktion unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 29: PCR-Reaktion für die Durchführung nach Heiner

Programmschritt (Wiederholung)	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95°C, 5 min		
2 (45 x)	95°C, 30 sec	55°C, 20 sec	60°C, 4 min
3			60°C, 4 min

Mit keiner der beiden Methoden konnte eine auswertbare Sequenz erhalten werden. Es wurden immer nur sehr schwache Signale mit stark überlagerten Banden detektiert.

3.2. Long-Distance Genome-Walking-PCR (LDGW)

Mit Hilfe dieser Methode sollten Genfragmente ausgehend von einer bereits bekannten Gensequenz, in einer Größenordnung von über 2 kb erzeugt werden. Diese Methode wurde wie unter B 11. beschrieben durchgeführt um die gesamte Sequenz der beiden Genfragmente aus Tü 27 zu identifizieren. Zunächst wurde dies nur für P450-27P durchgeführt. Als Primer wurden PGW1, PGW2, PGW3, PGW4 (siehe Abb. 23) und AP-EcoRI eingesetzt.

Für die PCR-Reaktionen wurden unterschiedliche DNA-Polymerasen eingesetzt, die unterschiedliche Ergebnisse lieferten (Tabelle 30). Mit der KlenTaq LA-Polymerase konnten Fragmente mit einer Größe von bis zu 1.6 kb isoliert werden, während mit einem Gemisch aus Pfu- und Taq-Polymerase nur 500 bp Fragmente isoliert werden konnten. Fragmente mit einer Größe über 1.6 kb wurden nicht isoliert.

Anschließend wurden die DNA-Fragmente in pUC18 ligiert und sequenziert. Die Sequenz des Primers konnte wiedergefunden werden, allerdings stimmte die anschließende Nukleotidsequenz nicht mit der von P450-27P überein.

Tabelle 30: Ergebnis der Isolierung von DNA-Fragmenten bei Durchführung der LDGW mit verschiedenen Polymerasen.

Polymerase	Richtung	Fragmentgrößen
Pfu/Taq-Polymerase gemischt (1µl/1.5 µl)	3' → 5'	500 bp
	5' → 3'	350 bp
TaqLong-Polymerase mit high-salt buffer	3' → 5'	keine diskrete Banden
TaqLong-Polymerase mit low-salt-buffer	3' → 5'	0.8 - 1.2 kb
	5' → 3'	1.4 kb
KlenTaq LA-Polymerase	3' → 5'	1.4 - 1.6 kb
	5' → 3'	1.4 kb

Mit dieser Genome-Walking-Methode gelang es für P450-27P nicht, die vollständige Gensequenz zu identifizieren. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Durchführung mit P450-27Q abgesehen.

3.3. Erzeugung und Screening von subgenomischen Genbanken aus *Streptomyces fradiae* Tü 27

3.3.1. Erzeugung einer Genbank nach vollständigem Verdau der genomischen DNA

Zur Erzeugung einer Genbank mit vollständig verdauter DNA von *S. fradiae* Tü 27 wurde die genomische DNA mit den Restriktionsenzymen *Pst*I, *Sac*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Kpn*I und *Sph*I, wie unter B 12.2. beschrieben verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Überführung der Nylonmembran gegen die DNA-Sonden P450-27P (Abb. 32A) und P450-27Q (Abb. 32B) hybridisiert. Mit der Sonde P450-27P wurde mit der *Bam*HI gespaltenen DNA ein positives Hybridisierungssignal bei 7.5 - 8 kb (A Spur 4) erhalten. Bei der Spaltung mit *Sph*I ergab sich bei 6.5 - 7 kb (A Spur 7) ein positives Hybridisierungssignal. Die anderen Spaltungsansätze ergaben nur Hybridisierungssignale über 8 kb, wobei bei dem Spaltungsansatz mit *Sac*I noch ein schwaches Hybridisierungssignal bei 3.5 - 4 kb (A Spur 3) detektiert wurde.

Mit der Sonde P450-27Q konnten bei den mit *Sac*I, *Bgl*II und *Sph*I gespaltenen DNA-Ansätzen Hybridisierungssignale unter 8 kb detektiert werden. Bei *Sac*I ergab sich ein Signal bei 4.5 - 5 kb (B Spur 3) , bei *Bgl*II bei 3.5 - 4 kb (B Spur 5) und bei *Sph*I bei 1.5 - 2 kb (B Spur 7).

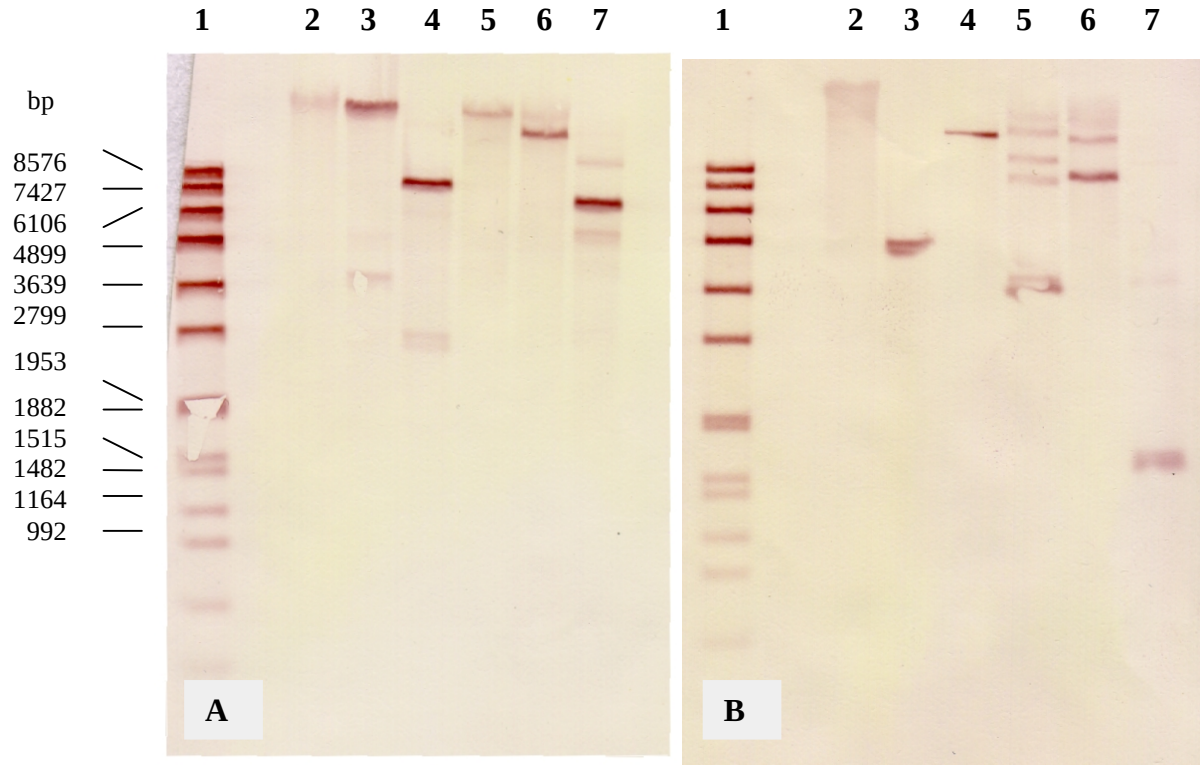


Abbildung 32: Spaltung der genomischen DNA von *S. fradiae* Tü 27 mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Hybridisierung mit den Sonden P450-27P (A) und P450-27Q (B). Spur 1: Standard; Spuren 2-7: Spaltung mit *Pst*I, *Sac*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Kpn*I und *Sph*I.

Die Genbanken wurden nach folgendem Prinzip erstellt:

Für Tü27P wurde die genomische DNA

1. mit *Bam*HI verdaut und die 7 - 9 kb Fragmente in den Vektor pUC18 mit Hilfe des "Ready-To-Go pUC18 *Bam*HI/BAP + Ligase"-Kit (Pharmacia Biotech) ligiert.
2. mit *Sph*I verdaut und die 6 - 8 kb Fragmente in pUC18 ligiert.
3. mit *Sac*I verdaut und die 3.5 - 5.5 kb Fragmente in pUC18 ligiert.

Für Tü27Q wurde die genomische DNA:

1. mit *Sac*I verdaut und die 3 - 5.5 kb Fragmente in pUC18 ligiert.
2. mit *Bgl*II verdaut und die 3 - 5 kb Fragmente in pUC18 ligiert.

Auf eine Ligation eines 1.5 - 2.5 kb *Sac*I-Fragmentes wurde verzichtet, da die Wahrscheinlichkeit sehr gering war, das gesamte Gen auf einem Fragment dieser Größe zu finden.

Die Effizienz der Ligation dieser DNA-Fragmente in pUC18 war allerdings sehr gering. Nur mit *Sac*I-DNA-Fragmenten wurden 500-700 Transformanden durch Transformation mit Hilfe der Elektroporation erhalten. Das Screening der Transformanden durch Koloniehybridisierung ergab im Falle der Hybridisierung mit der Sonde P450-27Q einen positiven Klon mit einer Insertgröße von 4.5 kb (27Q-Sac). Dieser wurde zunächst mit den Primern Q1 und Q2 (aus der Gensequenz P450-27Q) sequenziert. Nur mit dem Primer Q1 konnte eine erfolgreiche Sequenzierung durchgeführt werden. Allerdings ging die Leseweite nur über die bereits bekannte Gensequenz. Durch eine Test-PCR, die mit den Primern QA und QE durchgeführt wurde, konnte das erwartete 700 bp Fragment amplifiziert werden.

Um die Sequenzierung zu vereinfachen, und um überwiegend M13 "forward" und "reverse" Primer verwenden zu können, sollten Subklone erzeugt werden. Ein Restriktionsverdau der Plasmid-DNA des Klons 27Q-Sac mit *Eco*RI, *Pst*I, *Xba*I, *Bam*HI, *Hind*III und *Kpn*I ergab, daß *Eco*RI einmal und *Bam*HI zweimal im Insert schneidet. Das Plasmid wurde mit *Bam*HI gespalten und die Fragmente in pK18, ein pUC18-Derivat, ligiert. Die drei Inserts hatten eine Größe von 1.0 kb, 1.4 kb und 1.6 kb. Die Sequenzierung dieser drei Klone ergab keine Homologie zu P450-Gensequenzen.

3.3.2. Erzeugung einer Genbank nach Partialverdau der genomischen DNA

Durch partiellen Verdau genomischer DNA von *S. fradiae* Tü 27 mit *Sau*3AI wurden DNA-Fragmente mit einer Größe von 3 - 6 kb erzeugt und mit Hilfe des "Ready-To-Go pUC18 *Bam*HI/BAP + Ligase"-Kit (Pharmacia Biotech) in die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors pUC18 ligiert. Allerdings war die Effizienz der Transformation sehr gering. Selbst mit Elektroporation konnten nur 50 Kolonien erhalten werden.

Mit diesen wenigen Kolonien wurde ebenfalls eine Koloniehybridisierung gegen die Sonden P450-27P und P450-27Q durchgeführt. Dabei konnte kein positiver Klon detektiert werden.

4. Integrationsmutagenese

Um zu prüfen, welches der im Stamm *Streptomyces fradiae* Tü 27 identifizierten P450-Genfragmente für die selektive Hydroxylierung verantwortlich ist, sollten die entsprechenden Gene durch Integrationsmutagenese inaktiviert werden. Hierzu werden interne Genfragmente des Zielgens, ohne Translationsstart und -stop in einen Vektor kloniert. Eine homologe Rekombination zwischen dem Plasmid mit Genfragment und der intakten chromosomalen DNA bewirkt eine Integration des gesamten Plasmids in das Chromosom.

Um eine gezielte Integrationsmutagenese durchführen zu können, mußte ein Wirts-Vektor-System für *Streptomyces fradiae* Tü 27 etabliert werden. Daher wurden die zur Transformation von *Streptomyces*-Stämmen beschriebenen Transformationsmethoden (PEG-induzierte Protoplasten-Transformation und interkonjugativer Transfer von Plasmid DNA von *E. coli* nach *Streptomyces*) getestet.

4.1. Etablierung eines Wirts-Vektor-Systems für *S. fradiae* Tü 27

4.1.1. Wachstumsverhalten des Stammes *S. fradiae* Tü 27 in verschiedenen Medien bei unterschiedlichen Temperaturen

Um das Wachstumsverhalten von *S. fradiae* in verschiedenen Flüssigmedien zu analysieren, wurden je 100 ml Flüssigmedium mit 1 ml einer Vorkultur beimpft und für 3 Tage im Schüttelkolben bei unterschiedlichen Temperaturen (28, 30 und 39°C) bei 220 rpm im Schüttler inkubiert. Dabei fiel auf, daß *S. fradiae* in fast allen Flüssigmedien, bis auf YEME-Medium, ein gutes und auch sehr schnelles Wachstum (Tabelle 31) sowie zusätzlich für Streptomyceten ein eher ungewöhnliches feines Wachstum zeigte. Bei S- und HA-Medium konnte bereits nach einem Tag Inkubation ein sehr dichtes Wachstum beobachtet werden.

Tabelle 31: Wachstumsverhalten von *S. fradiae* Tü 27 in verschiedenen Medien und bei unterschiedlichen Temperaturen.

Medium	**28°C**	**37°C**	**39°C**
S-Medium flüssig	+ + +	+ + +	+ +
HA-Medium flüssig	+ + +	+ + +	+ +
HA-Medium fest	+ + +	+ +	+ +
LB-Medium flüssig	+ +		
LB-Medium fest	+ +	(+)	(+)
R5-Medium fest	+ + +		
TSB-Medium flüssig	+ + +		
YEME-Medium flüssig	+		

+ + + = sehr gutes, dichtes Wachstum, + + = gutes Wachstum, + = weniger dichtes, langsameres Wachstum; (+) = sehr langsames Wachstum.

Da der Stamm auch bei höheren Temperaturen mit S- und HA-Medium ein ausreichend gutes Wachstum zeigte, ist auch der Einsatz von temperatursensitiven Vektoren (wie z. B. die pGM-Vektoren) für Integrationsmutagenese-Experimente möglich.
Bei den Festmedien zeigte er bei HA-Medium ein sehr gutes Wachstumsverhalten. Hier konnte bereits nach 2 Tagen eine Sporulation beobachtet werden (graubraune Sporen).

4.1.2. Resistenzmuster von *S. fradiae* Tü 27

Zur Etablierung eines Wirts-Vektor-Systems für *S. fradiae* Tü 27 ist die Kenntnis seines Resistenzmusters entscheidend. Zur Selektion von Transformanden sind nur Antibiotika bzw. Resistenzgene sinnvoll, gegen die der Stamm keine natürliche Resistenz aufweist. Der auf Selektiv-Agarplatten durchgeführte Test wurde mit den häufig eingesetzten Antibiotika Thiostrepton (250 µg/ml), Erythromycin (560 µg/ml), Kanamycin (750 µg/ml), Apramycin (250 µg/ml) und Chloramphenicol (400 µg/ml) durchgeführt.
Der Test ergab, daß *S. fradiae* gegen keines der eingesetzten Antibiotika eine natürliche Resistenz aufwies.

4.1.3. Interkonjugativer Transfer von Plasmid-DNA

Als Voraussetzung für einen interkonjugativen Transfer von Plasmid-DNA benötigt man Vektorsysteme, die das Transfergen *ori*T besitzen. *ori*T muß durch ein weiteres Gen (*tra*), welches auf dem IncP Plasmid RK2 (= RP4 = RP1) liegt, erkannt und mobilisiert werden. In *E. coli* S17-1 ist dieses Plasmid RP4 im Chromosom integriert und in *E. coli* ET12567 liegt es als episomales Plasmid pUB307 vor, das ein Derivat des RP4 darstellt.

Als Vektorsystem wurde der modifizierte Integrationsvektor pSP1mod verwendet. Dieser stammt von dem nicht-replikativen Streptomyceten Integrationsvektor pSP1 ab, der in *E. coli* stabil repliziert. Die Anwesenheit des lacZ'-Fragments erlaubt eine blau/weiß-Selektion und den Einsatz von M13 "forward" und "reverse" Primer zur Sequenzierung klonierter Fragmente. Damit er zum interkonjugativen Transfer eingesetzt werden kann, benötigt er das Transfergen *ori*T. Diese Gensequenz ist in pSP1mod enthalten. Ein Fragment des Gens, das inaktiviert werden soll, wird in einen solchen Vektor ligiert und anschließend in *E. coli* S17-1 bzw. *E. coli* ET12567 transformiert. Nach Mobilisierung des *ori*T wird das Plasmid in den Rezipienten (z. B. Aktinomycet) transformiert und kann dort über homologe Rekombination ins Genom integriert werden (Abbildung 33).

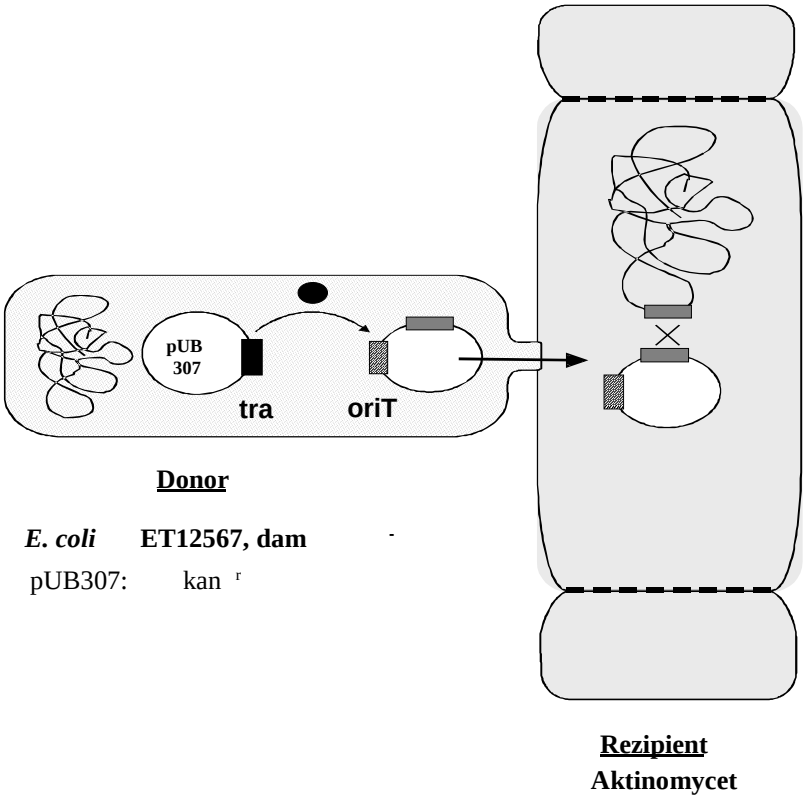


Abbildung 33: Interkonjugativer Transfer eines Plasmids von *E. coli* ET12567 auf einen Aktinomyceten.

Zunächst wurden die Genfragmente P450-27P und P450-27Q als *Xba*I/*Eco*RI-Fragmente in die *Xba*I/*Eco*RI-Schnittstelle des Vektors pSP1mod kloniert, um die Integrations-Plasmide pSP1mod-P und pSP1mod-Q zu erhalten. Die Plasmide wurden in *E. coli* S17-1 und *E. coli* ET12567 transformiert.

Um die Eignung des Vektors pSP1mod (mit Ampicillinresistenz) zum interkonjugativen Transfer zu überprüfen, wurde zunächst ein Transfer von pSP1mod, pSP1mod-P und pSP1mod-Q von *E. coli* S17-1 (mit Trimethoprimresistenz) nach *E. coli* XL1-Blue (mit Tetracyclinresistenz) durchgeführt (siehe B 9.2.2.).

Bei allen Ansätzen gab es Kolonien: pSP1mod: $1.8 \cdot 10^6$ Kolonien
pSP1mod-P: $1.6 \cdot 10^6$ Kolonien
pSP1mod-Q: $2.0 \cdot 10^6$ Kolonien

Zur Selektion von Donor- oder Rezipienten-Zellen, wurden Kolonien parallel auf LB-Amp/Tetrazyklin- sowie auf LB-Amp/Trimethoprim-Agarplatten überstochert. Da *E. coli* XL1-Blue nicht gegen Trimethoprim resistent ist, durften keine Rezipienten Zellen auf diesen Platten wachsen. Bei allen drei Ansätzen wurde Donor und Rezipient im Verhältnis 3:1 eingesetzt und bei den Rezipienten die Plasmide isoliert. Diese wiesen nach Spaltung mit *Xba*I/*Eco*RI und Auftrennung im 1 %igen Agarosegel die erwarteten Fragmentgrößen auf, was die Eignung des Vektors pSP1mod und der Plasmide pSP1mod-P und pSP1mod-Q für einen interkonjugativen Transfer zeigte.

Zur Integrationsmutagenese sollten nun die Plasmide pSP1mod-P und pSP1mod-Q von *E. coli* ET12567 in *Streptomyces fradiae* Tü 27 transformiert werden. Die Transformation wurde, wie unter B 9.2.2. beschrieben, durchgeführt, wobei das Verhältnis von Donor zu Akzeptor variiert wurde (1:1, 1:2, 1:3). Bei allen Variationen wurden ausschließlich Donor-Zellen erhalten. Mit dieser Transformationsmethode gelang es nicht, die Plasmide für die Inaktivierung von *S. fradiae* Tü 27 zu transformieren.

4.1.4. PEG-induzierte Protoplasten-Transformation

Als weitere Transformationsmethode wurde die Protoplasten-Transformation getestet. Zur Erzeugung von Protoplasten wurde die unter B 9.2.1. beschriebene Methode von Hopwood angewandt. Hierzu wurde zuerst das Kultivierungsmedium variiert. *S. fradiae* wurde über 2 - 3 Tage in S-Medium, TSB-Medium und LB-Medium mit jeweils 1 % Glycerin kultiviert. Die höchste Protoplastenanzahl konnte bei Kultivierung in S-Medium erreicht werden. Allerdings

reichte die Anzahl noch nicht für eine Transformation aus. Durch Variation der Kultivierungsdauer von 16 h bis 3 Tage konnte gezeigt werden, daß die Anzahl an Protoplasten mit kürzerer Kultivierungszeit anstieg. Als ideal hat sich eine Kultivierung von *S. fradiae* über Nacht erwiesen.

Um die Transformationseffizienz von *S. fradiae* zu bestimmen, wurden verschiedene Streptomyceten-Vektoren eingesetzt:

-pGMs: Die pGM-Vektoren sind Derivate des Streptomyceten-Plasmids pSG5 und besitzen einen weiten Wirtsbereich. Eingesetzt wurden die Vektoren pGM9 und pGM160 mit dem Thiostreptonresistenzgen und temperatursensitiver Replikation.

-pIJ702: Der 5.6 kb große Vektor stellt ein Derivat des Plasmids pIJ101 mit einem weiten Wirtsbereich dar. Zur Selektion sollte das Melanin-Gen eingesetzt werden.

Nach Transformation dieser Vektoren in *S. fradiae* wurde jeweils ein Teil der ausgestrichenen Platten über Nacht bei 30°C inkubiert und der andere Teil über Nacht bei Raumtemperatur. Die Regeneration war bei den Ansätzen, die bei Raumtemperatur inkubiert wurden erfolgreich. Platten, die bei 30°C inkubiert wurden, waren bereits zu stark angewachsen und konnten nicht mehr regeneriert werden. Es wurde jeweils auch ein Kontrollansatz ohne Vektor durchgeführt, um zu überprüfen ob irgendwelche Kontaminationen bei der Protoplastenpräparation entstanden waren. Bei pGM160 konnten bis zu 100 Einzelkolonien erzielt werden, bei pIJ702 höchstens 10. Einige Einzelkolonien wurden zur Isolierung der Plasmid-DNA in Flüssigkultur mit Selektionsmedium inkubiert. Es konnte Plasmid-DNA isoliert werden, die ungespalten und mit *Eco*RI gespalten nach Auftrennung in einem 1 %igen Agarosegel das gleiche Laufverhalten wie das Ausgangs-Plasmid zeigte.

Da somit die PEG-induzierte Protoplasten-Transformation erfolgreich war, konnte diese Transformationsmethode mit pGM160 als Vektorsystem für weitere Integrationsmutagenese-Experimente eingesetzt werden.

4.2. Inaktivierung der Gene *P450-27P* und *P450-27Q*

Zur Verwendung des Vektors pGM160 für die Integrationsmutagenese mußten die Fragmente P450-27P und P450-27Q in den Vektor pGM160 kloniert werden. Wie unter C 4.1.4. erwähnt, handelt es sich bei pGM160 um ein Vektorsystem mit temperatursensitiver Replikation. Dies bedeutet, daß bei einer Inkubation bei 39°C alle frei-replizierenden Plasmide eliminiert werden, so daß bei Selektion auf den Plasmidmarker davon ausgegangen werden kann, daß alle chromosomalen Kopien des Gens inaktiviert wurden.

Die Genfragmente P450-27P' und P450-27Q' wurden mit den Primern PA und PE bzw. QA und QE *Eco*RI/*Hin*dIII-Schnittstelle mittels PCR amplifiziert, in die *Eco*RI/*Hin*dIII-Schnittstelle des Vektors pGM 160 kloniert (Abbildung 34) und in *E. coli* transformiert. Nach Isolation wurden die Plasmide pGMP450-27P‘ und pGMP450-27Q‘ in *Streptomyces fradiae* Tü 27 transformiert und auf HA-Agarplatten unter Zusatz von Thiostrepton ausgestrichen. Da *S. fradiae* keine natürliche Thiostreptonresistenz besitzt, konnten nur transformierte Zellen wachsen. Die Kolonien wurden anschließend bei 39°C in S-Medium 2 – 3 Tage unter Zusatz von Thiostrepton kultiviert und auf selektiven HA-Agarplatten ausplattiert. Damit sollten alle frei replizierenden Plasmide eliminiert werden und nur noch Integrationsmutanten vorhanden sein.

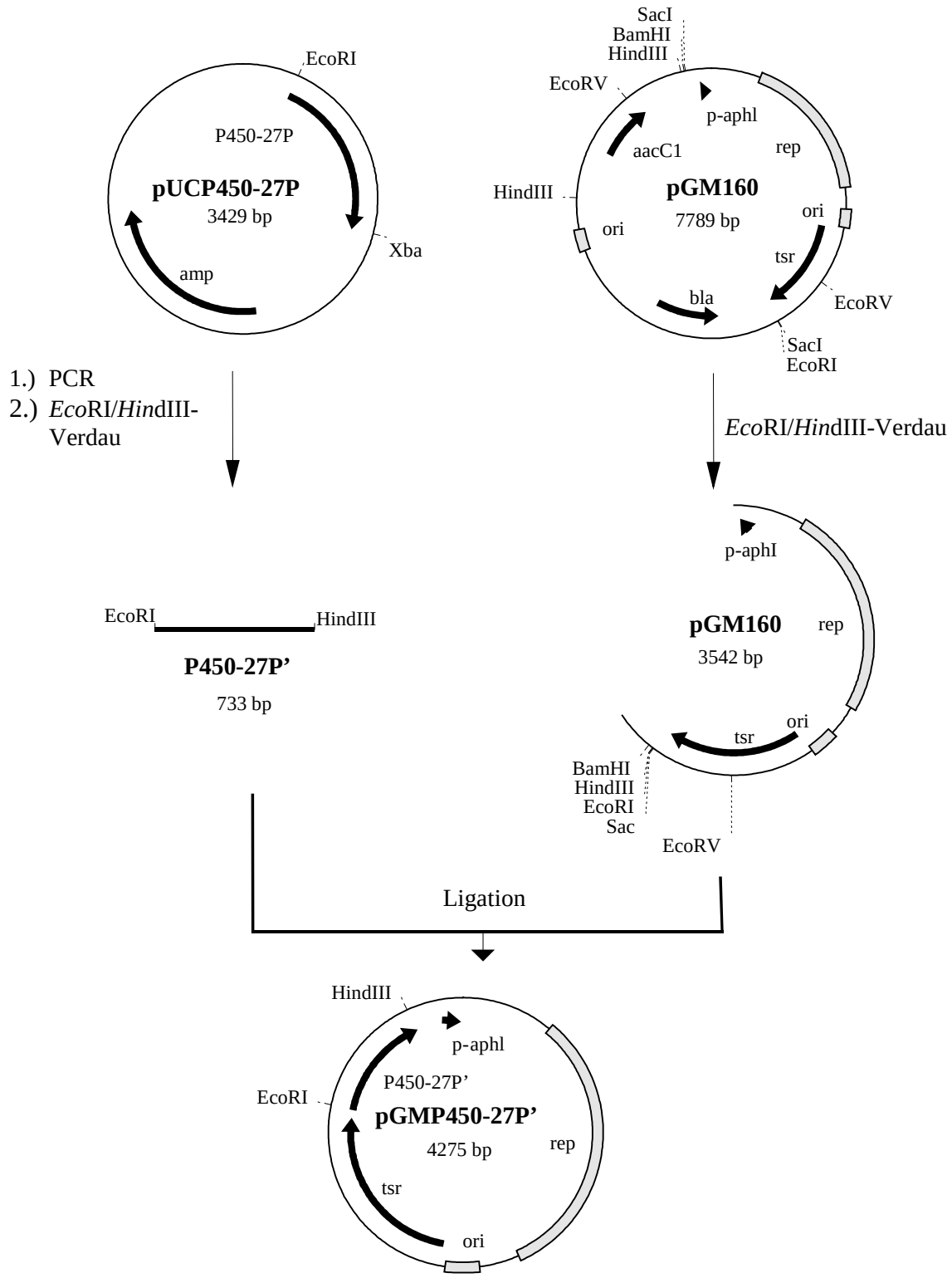


Abbildung 34: Klonierung des Konstrukts pGMP450-27P'.

Die homologe Integration wurde durch Southern Hybridisierung nachgewiesen. Die genomische DNA der isolierten Integrationsmutanten GMP450-27P' und GMP450-27Q' und des Wildtyps wurde mit *Eco*RV und *Bgl*II gespalten. Die Plasmide pGMP450-27P' und pGMP450-27Q' besitzen eine *Eco*RV-Schnittstelle, aber keine *Bgl*II-Schnittstelle. Die gespaltene DNA wurde im Agarosegel aufgetrennt, auf Nylon/NC-Membran transferiert und jeweils gegen die Sonde des *Eco*RI/*Hin*dIII-gespaltenen Plasmids pGM160 (3542 bp) und die Fragmente P450-27P und P450-27Q hybridisiert.

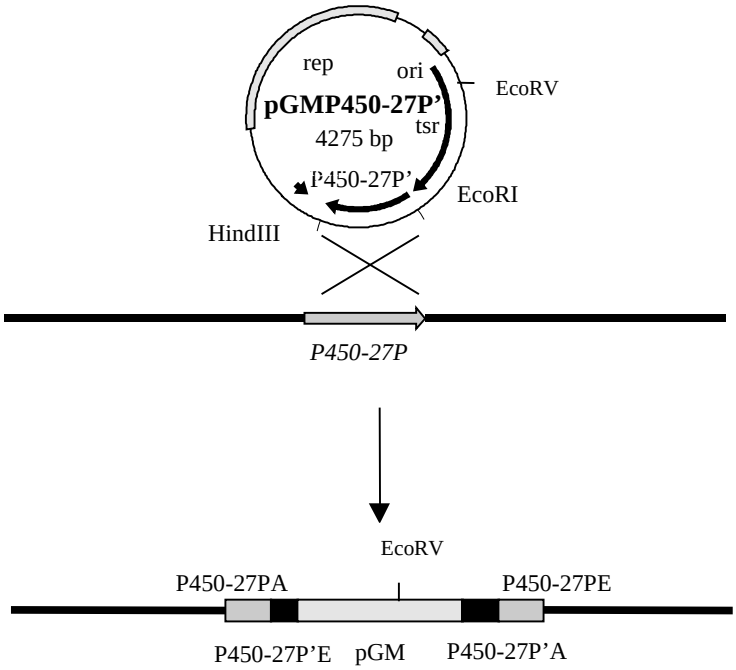


Abbildung 35: Schema des Mechanismus für die Integration von pGMP450-27P in die chromosomale DNA *S. fradiae* Tü 27. P450-27PA bezeichnet die erste Hälfte des Gens *P450-27P*, P450-27PE die andere.

Am Beispiel der Mutante GMP450-27P' soll die Analyse der Southern Hybridisierung im Detail gezeigt werden. In Abbildung 35 ist noch einmal verdeutlicht, wie das Plasmid pGMP450-27P' in die chromosomale DNA integriert wurde. Wichtig für die weiteren Hybridisierungsexperimente war, daß die *Eco*RV-Schnittstelle nur singulär im Plasmid pGMP450-27P' vorkam und nicht im Gen *P450-27P*.

Bei Hybridisierung (Abbildung 36) der *Eco*RV gespaltenen genomischen DNA der Mutante GMP450-27P' mit der Sonde pGM160 (gespalten) konnten zwei Randfragmente detektiert werden (A Spur 4), deren Größen allerdings nicht bestimmt werden konnten, da > 10 kb. Zu-

sätzlich zeigt die Hybridisierung noch ein starkes Signal bei 3.5 kb, was der Größe des *Eco*RV geschnittenen Plasmids entspricht. Dies ist auf eine multiple Integration des Plasmids pGMP450-27P' zurückzuführen. Bei Mutante GMP450-27P', die mit *Bgl*II gespalten wurde (A Spur 6), war wie erwartet nur eine Bande zu sehen. Bei der Hybridisierung mit Sonde P450-27P‘ wurde beim Wildtyp nach Spaltung mit *Eco*RV eine Bande detektiert (B Spur 2), die größer als die Randfragmente der entsprechend mit *Eco*RV gespaltenen Mutante war (B Spur 4).

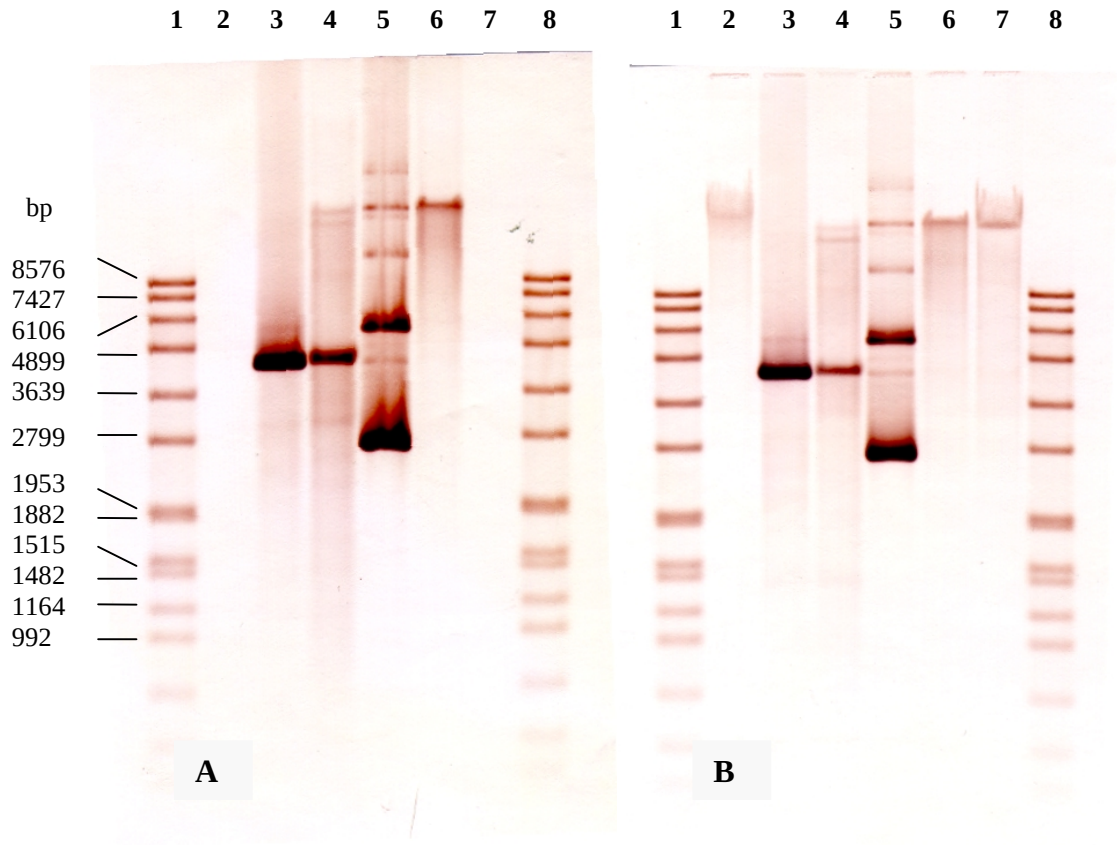


Abbildung 36: Southern Hybridisierung der gespaltenen DNA des Wildtyps (WT) *S. fradiae*, der Integrationsmutante GMP450-27P' und des Plasmids pGMP450-27P‘ gegen die DNA-Sonde pGM160 *Eco*RI/*Hin*dIII gespalten (A) und gegen die Sonde P450-27P' (B).
Spuren 1 und 8: Standard; Spuren 2: WT *Eco*RV gespalten; Spuren 3: pGMP450-27P‘ *Eco*RV gespalten; Spuren 4: GMP450-27P‘ *Eco*RV gespalten; Spuren 5: pGMP450-27P‘ *Bgl*II gespalten, Spuren 6: GMP450-27P‘ *Bgl*II gespalten; Spuren 7: WT *Bgl*II gespalten.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Integration des Plasmids pGMP450-27P' in das Chromosom von *S. fradiae* Tü 27 über homologe Rekombination des 620 bp großen Fragments P450-27P'.

4.3. Umsetzungen von α-Ionon mit den Integrationsmutanten

Nach Inaktivierung der Gene *P450-27P* und *P450-27Q* durch Integration der Plasmide pGMP450-27P‘ und pGMP450-27Q‘ in *S. fradiae* Tü 27 sollte gezeigt werden, daß eine Umsetzung von α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon mit einer der Integrationsmutanten nicht mehr möglich ist, wenn eines der beiden Genfragmente für die “richtige“ P450-Hydroxylase kodiert (Abbildung 37).

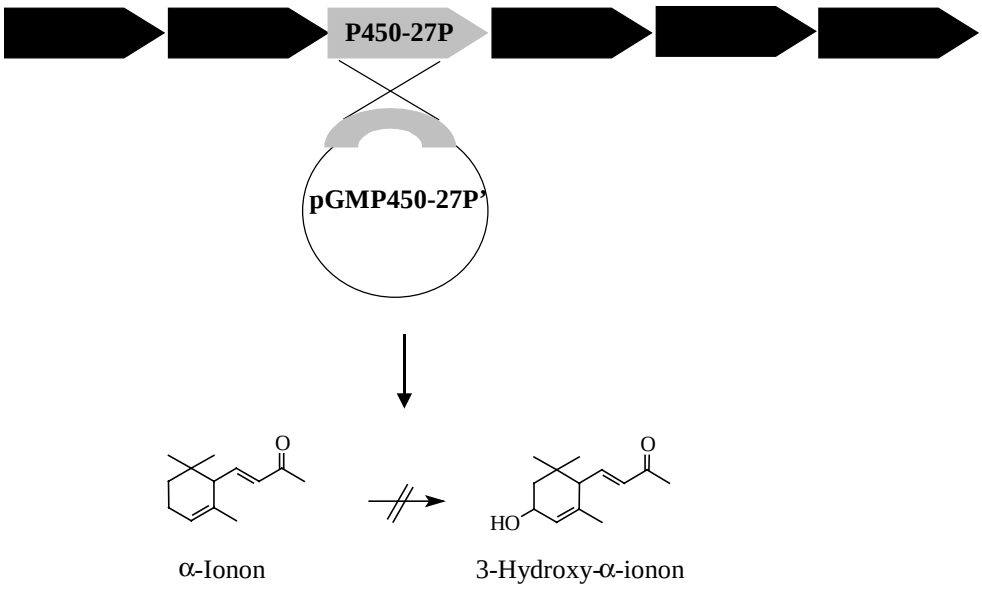


Abbildung 37: Ziel der Mutagenese: Durch “Ausschalten“ des “richtigen“ Gens soll eine Umsetzung von α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon nicht mehr möglich sein.

Die Biotransformationen der Integrationsmutanten wurden bei 39°C unter Zugabe von Thiostrepton zum Kulturmedium durchgeführt. Die beiden Mutanten und der Wildtyp wurden für 10 Tage mit α-Ionon kultiviert. Allgemein zeigten sowohl die Mutanten, als auch der Wildtyp keine so gute Umsatzraten. Der Wildtyp konnte α-Ionon nur zu 22 % 3-Hydroxy-α-ionon umsetzen. Bei GMP450-27Q‘ (Abbildung 39) konnte α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon umgesetzt werden, mit einem Anteil an Nebenprodukt und zeigte damit ein Reaktionsverhalten wie der Wildtyp. Mit GMP450-27P‘ (Abbildung 38) wurde α-Ionon zu einer Anzahl von anderen Hydroxy- und Oxoverbindungen, aber nicht selektiv zu 3-Hydroxy-α-ionon umgesetzt. Die Produkte, die bei der Umsetzung mit Wildtyp und GMP450-27Q als Nebenprodukte auftraten, sind bei Umsetzung mit GMP450-27P nun Hauptprodukte.

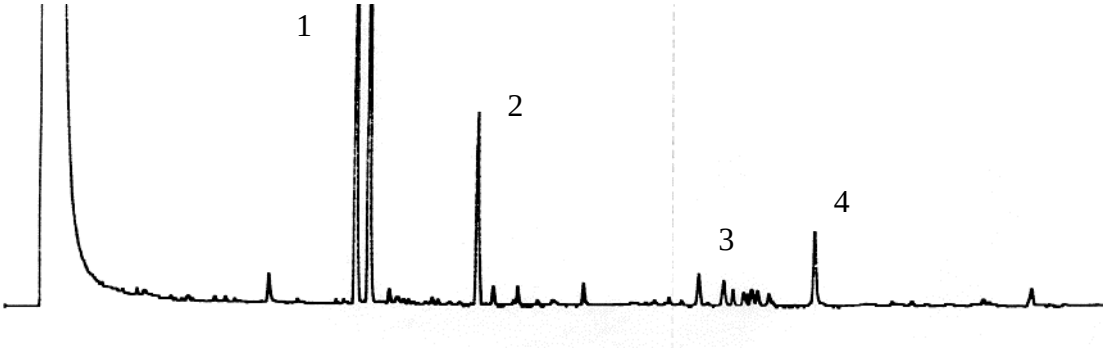


Abbildung 38: GC der Biotransformation von α-Ionon mit GMP450-27P‘.
1: α-Ionon; 2 und 4: Nebenprodukte, 3: zahlreiche Hydroxy- und Oxo-Derivate, darunter auch 3-Hydroxy-α-ionon.

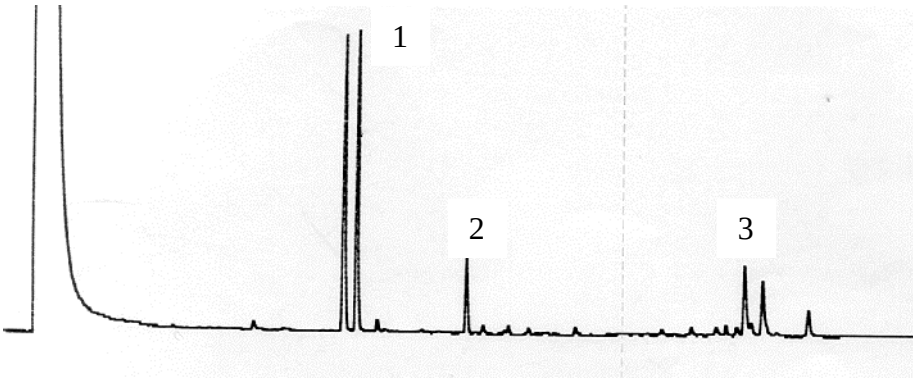


Abbildung 39: GC der Biotransformation von α-Ionon mit GMP450-27Q‘.
1: α-Ionon; 2: Nebenprodukt; 3: *trans*-3-Hydroxy-α-ionon.

Die Mutante GMP450-27P konnte α-Ionon nicht mehr selektiv in Posititon 3 hydroxylieren. Damit scheint das Gen *P450-27P* das Gen zu sein, das für das P450 kodiert, das für die selektive Hydroxylierung verantwortlich ist.

5. Expression von P450 (*soyC*) aus *S. griseus* in *E. coli*

5.1. Klonierung der Konstrukte

Für nachfolgende Arbeiten (siehe C 3.1.) sollte die Überexpression eines bekannten P450-Gens aus *Streptomyces* in *E. coli* überprüft werden. Hierzu wurde das bereits klonierte und in *Streptomyces lividans* exprimierte Gen *soyC* (Trower et al., 1992) aus dem Stamm *Streptomyces griseus* ATCC 13273 ausgewählt. Als Expressionssysteme wurden die Vektoren pCYTEXP1, pASK-IBA1CA und pJOE2775 ausgewählt (siehe B 13.1).

Das P450-Gen *soyC* wurde mittels PCR aus der genomischen DNA von *S. griseus* ATCC 13273 mit den Primern soyC1A und soyC2A amplifiziert. und in die *Bam*HI/*Nde*I-Schnittstelle des Vektors pCYTEXP1 ligiert (Abbildung 40). Für die Klonierung des Gens in pASK-IBA1CA und pJOE2775 wurde das Gen mittels PCR jeweils aus dem Konstrukt pCYTEXP1-soyC amplifiziert. Für das pASK-soyC wurden die Primer soyC1B und soyC2B und für pJOE-soyC soyC1C und soyC2A eingesetzt. Das Gen *soyC* wurde zur Klonierung von pASK-soyC über die *Eco*RI/*Bam*HI-Schnittstelle in den Vektor pASK-IBA1CA ligiert. Für pJOE-soyC wurde *soyC* über die *Afl*II/*Bam*HI-Schnittstelle in pJOE2775 ligiert (Abbildung 41). Zur Überprüfung der korrekten Insertion des *soyC*-Gens in die verschiedenen Vektoren wurden die drei Konstrukte sequenziert.

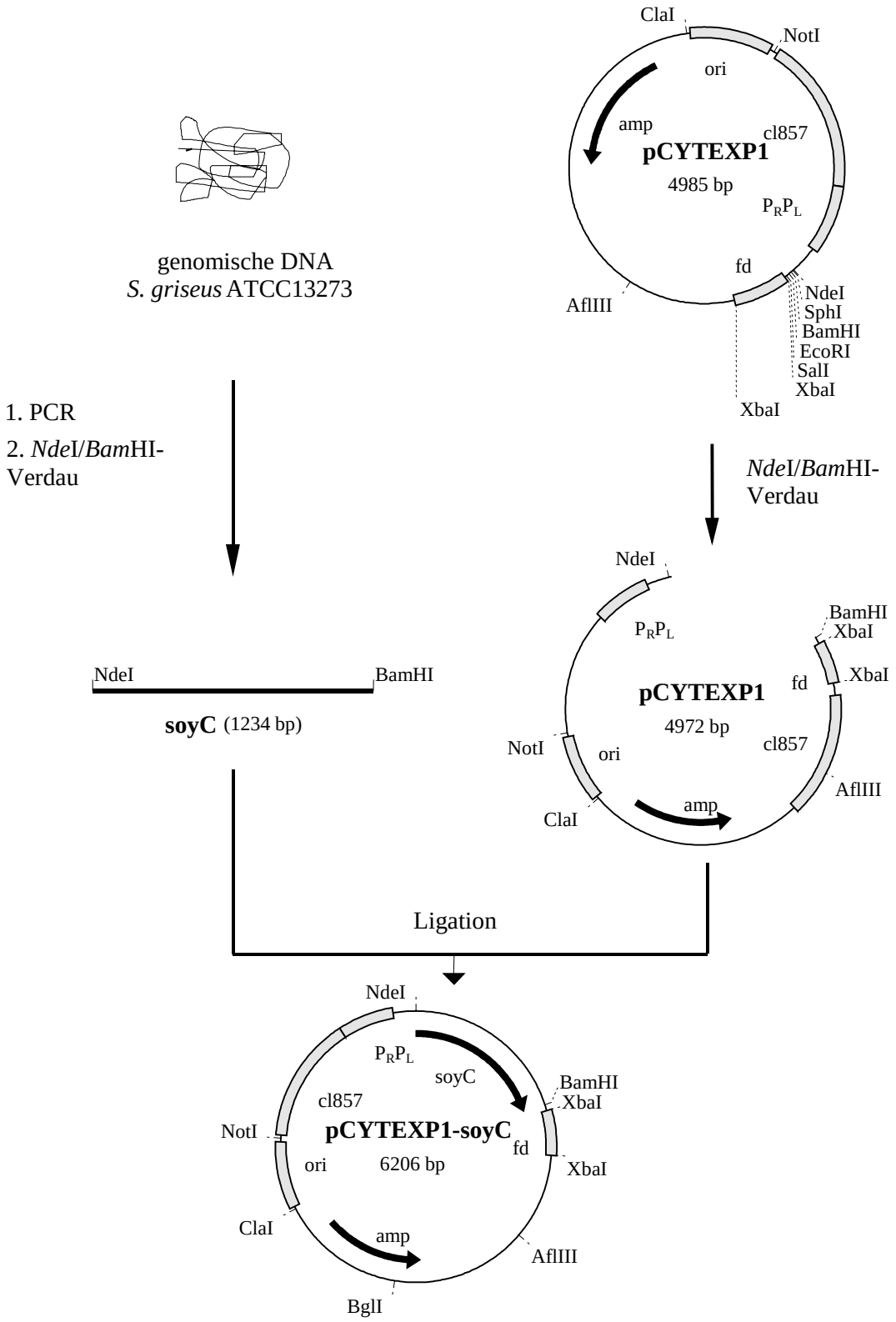


Abbildung 40: Klonierungsschema von pCYTEXP1-soyC

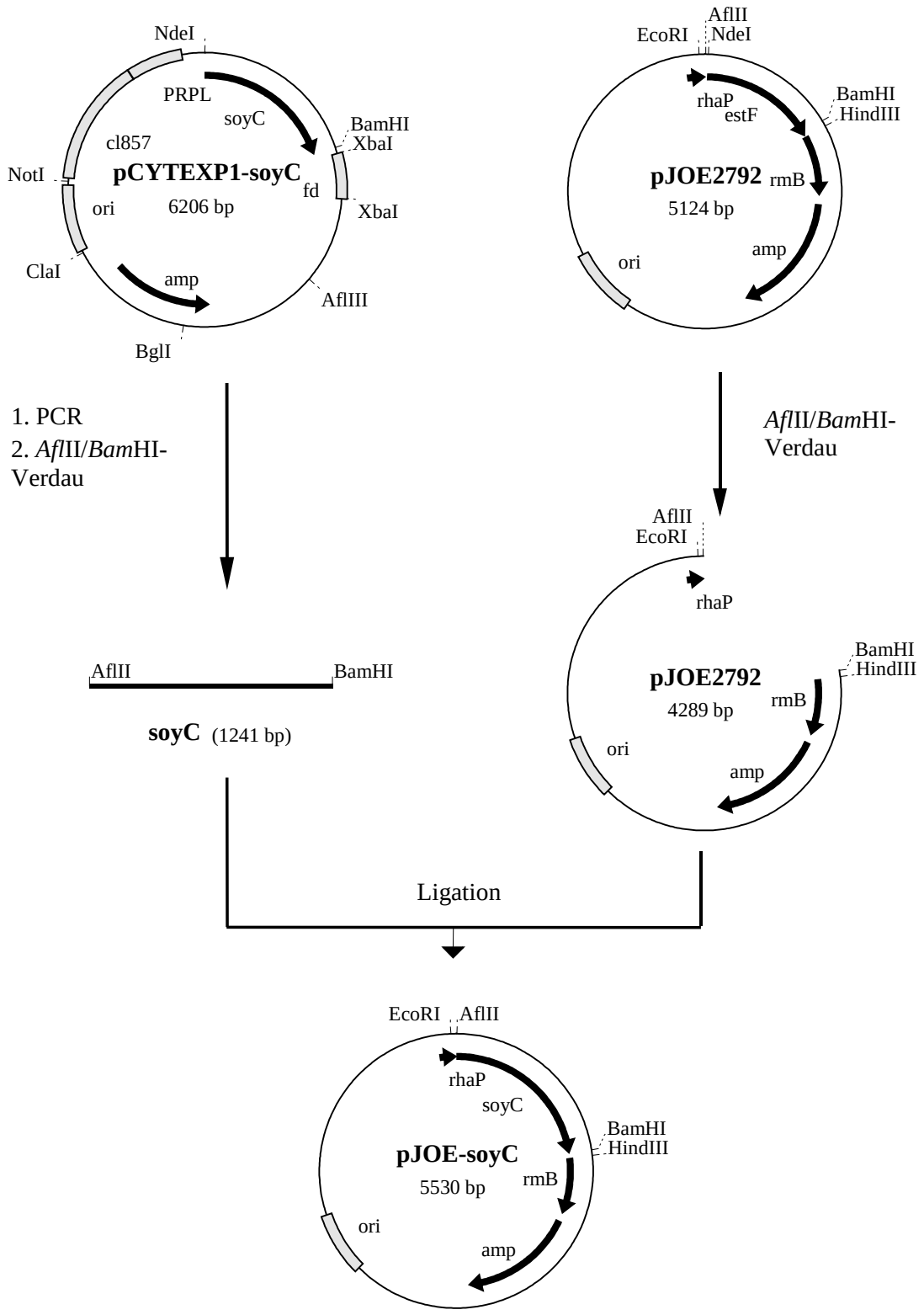


Abbildung 41: Klonierungsschema von pJOE-soyC

5.2. Expression

Für die Expression wurden pCYTEXP1-soyC, pASK-soyC und pJOE-soyC jeweils in die beiden Stämme *E. coli* DH5α und *E. coli* JM109 transformiert. Die Kultivierungen der drei Konstrukte wurden in LB-Medium bei 30°C durchgeführt. Zur Expression von $P450_{soy}$ wurde pCYTEXP1-soyC bei Erreichen einer OD von ~ 1.0 durch Temperaturerhöhung auf 42°C induziert. Wie man auf dem SDS-Gel (Abbildung 42) sehen kann, konnte bereits nach einer Stunde Induktion eine schwache Proteinbande bei 44 kDa beobachtet werden. Nach drei Stunden Induktion ist fast keine Änderung der Stärke der Proteinbande zu erkennen. Die Größe der Proteinbande stimmt mit der für $P450_{soy}$ erwarteten überein (Trower et al., 1992).

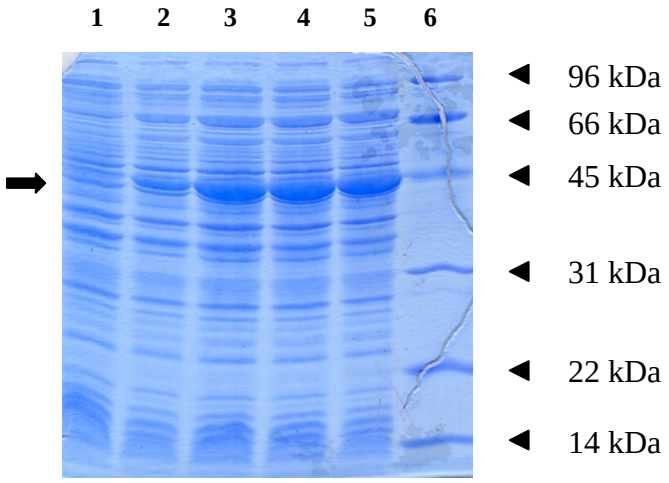


Abbildung 42: Expression von *E coli* DH5α pCYTEXP1-soyC.
Spur 1: DH5α pCYTEXP1-soyC vor Induktion; Spur 2-5: DH5α pCYTEXP1-soyC nach 1, 2, 3 und 4 h Induktion; Spur 6: Proteinstandard; Pfeil zeigt auf Proteinbande.

Für die Expression von pJOE-soyC wurden die Zellen bis zur frühen exponentiellen Phase kultiviert (OD ~ 0.7). Die Genexpression wurde durch Zugabe von Rhamnose induziert und 4 h weiter bei 30°C kultiviert. pASK-soyC wurde bis zu einer OD von 1.0 kultiviert und die Genexpression durch Zugabe von Anhydrotetracyclin induziert. Hier wurde die Induktion nach 4 h abgebrochen. In Abbildung 43 ist die Expressionen von pCYTEXP1-soyC, pJOE-soyC und pASK-soyC in *E. coli* DH5α im Vergleich dargestellt.

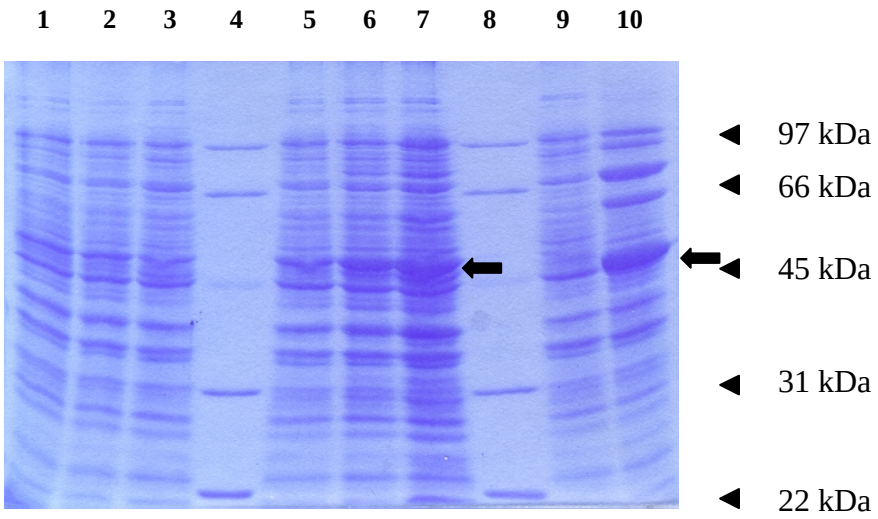


Abbildung 43: Expression der drei Konstrukte in *E. coli* DH5α.
Spur 1-3: pASK-soyC: vor Induktion, nach 1 und 5 h Induktion; Spur 5-7: pJOE-soyC: vor Induktion, nach 1 und 3 h Induktion; Spur 9 und 10: pCYTEXP1-soyC: vor Induktion und nach 4 h Induktion; Spur 4 u. 8: Proteinstandard; Pfeile zeigen auf Proteinbande.

Wie man sehen kann, ist bei der Expression von pASK-soyC keine Proteinbande zu sehen. Hier hat die Expression nicht funktioniert. Bei pJOE-soyC ist wie bei pCYTEXP1 eine Proteinbande bei 44 kDa zu beobachten.

Bei der Expression von pJOE-soyC und pCYTEXP1-soyC in *E. coli* JM105 konnte zwar bei der Kultivierung ein schnelleres Zellwachstum beobachtet werden, aber die Expression war bei pCYTEXP1 erst nach 2 h Induktion zu beobachten und bei beiden Konstrukten keine so starken Proteinbanden mehr zu erkennen.
Für die Expression von pASK-soyC wurde versucht durch Variation der Konzentration an Induktor oder durch Zugabe von $FeCl_3$ (100 mg/l) und Aminolävulinsäure die Induktion positiv zu beeinflussen. Keine der angewandten Maßnahmen führte zu einer Genexpression.

Bei der Bestimmung der P450-Konzentration durch CO-Differenzspektrum konnte sowohl bei pCYTEXP1-soyC, als auch bei pJOE-soyC P450 detektiert werden. Allerdings waren die Konzentrationen so gering, so daß keine definierten Werte berechnet werden konnten.

D Diskussion

1. Biotransformation von β- und α-Ionon

Für ein Screening zur Hydroxylierung von β-Ionon wurden über 200 Streptomyceten-Stämme, einige *Bacillus*-Stämme und wenige Pilzstämme verwendet. Diese Auswahl wurde getroffen, da Pilzstämme in der Vergangenheit gezeigt hatten, daß sie zwar in der Lage sind, Ionone zu hydroxylieren, die Umsetzungen allerdings nicht selektiv abliefen (Krasnobajew, 1980; Mikami et al., 1981). Bakterienstämme, insbesondere Streptomyceten-Stämme, zeigen im allgemeinen ein sehr weites Substratspektrum und im Gegensatz zu den Pilzstämmen verlaufen die Biotransformationen selektiver (O'Keefe und Harder, 1991).

Bei dem Screening zeigten 19 Stämme eine Umsetzung des β-Ionons zu 4-Hydroxy-β-ionon, allerdings nur mit einer sehr geringen Umsatzrate. Keine dieser Stämme zeigte eine Umsetzung zum gewünschten 3-Hydroxy-Produkt. Während die meisten Pilzstämme, wie *Aspergillus niger* JTS 191 (Mikami et al., 1981) und IFO 8541 (Larroche et al., 1995) β-Ionon zu einem komplexen Gemisch umsetzen, wurde mit allen Streptomyceten-Stämmen ein Hauptprodukt, 4-Hydroxy-β-ionon, gebildet. Bei Stämmen wie *Botryodiplodia theobromae*, *Botryodiplodia rhodina* und *Lasiodiplodia theobromae* erfolgte zusätzlich ein oxidativer Angriff an der Seitenkette, was zur Umsetzung von β-Ionon zu β-Cyclohomogeraniol-Derivaten führte (Krasnobajew und Helmlinher, 1982; Krasnobajew, 1980).

Die Screeningergebnisse zeigten, daß eine Hydroxylierung von β-Ionon an C-3 sehr schwierig, wenn nicht sogar unmöglich erscheint. Diese Aussage stimmt mit früheren Veröffentlichungen über Biotransformationen von β-Iononen überein. Ausgehend von stereochemischen Aspekten sollten die zwei Methylgruppen an C-1 jeden oxidativen Angriff schneller in C-3-Position als C-2 lenken. Doch überwiegt die elektronische Aktivierung an C-4 durch die C-5=C-6-Doppelbindung. Die elektronischen Effekte sind dafür verantwortlich, daß der oxidative Angriff an C-4 erfolgt.

Das isomere α-Ionon ist durch die Allylstellung zur C-4=C-5-Doppelbindung elektronisch aktiviert, und sollte damit jeden oxidativen Angriff in die Position C-3 lenken. Sechs der 19 Stämme zeigten eine Umsetzung zu 3-Hydroxy-α-ionon und fünf davon mit einer deutlich höheren Hydroxylierungsaktivität im Vergleich zu β-Ionon. Auch hier wurde α-Ionon zu einem Hauptprodukt, dem 3-Hydroxy-α-ionon umgesetzt. Bei Biotransformationen mit Stäm-

men wie *A. niger* kam es neben Umsetzungen zu 3-Hydroxy-α-ionon ebenfalls zur Bildung von 3-Oxo-α-ionon und mit Spezies von *Botryodiplodia* und *Lasiodiplodia* wieder zu Seitenkettenangriffen, die zu α-Cyclohomogeraniol-Derivaten (Krasnobajew, 1980) führten.
Zusätzlich wurde bei der Biotransformation des racemischen α-Ionons überwiegend das *trans*-Hydroxyderivat gebildet. Bei Umsetzungen des α-Ionons mit *A. niger* und *Cunninghamella blakesleeana* wurden *trans*- und *cis*-Diastereoisomere im Verhältnis 2:1 gebildet. Die *Streptomyces*-Stämme setzten demnach α-Ionon sowohl regio- als auch diastereoselektiv um.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das Enzym nur aktivierte C-H-Funktionen akzeptiert. Scheinbar werden auch die Enantiomere des racemischen α-Ionons unterschiedlich an das Enzym gebunden, so daß die beiden *trans*-Diastereoisomere gebildet werden. Es sprechen aber auch thermodynamische Gründe für ein Entstehen des *trans*-Diastereoisomerengemischs.

Bei der Strukturanalyse der Biotransformationsprodukte von α-Ionon konnte eindeutig gezeigt werden, daß es sich dabei um *trans*-3-Hydroxy-α-ionon handelt.
Die Einführung der OH-Gruppe könnte sowohl an C-3 als auch an C-2 erfolgen. Die Hydroxylierung an der allylischen Position C-3 kann eindeutig durch die folgenden NMR-Argumente belegt werden:

1.) Die (geminale) ^{2}J-Kopplungskonstante zwischen den zwei diastereotopen Protonen an der verbleibenden Methylen-Gruppe beträgt (-)13,4 Hz; für eine CH_2-Gruppe gefolgt von einer olefinischen π-Bindung, wie in Position 3, würde eine um 2,5 - 6 Hz negativere Kopplung erwartet werden.
2.) Bei einer OH-Gruppe an C-2 sollte bei der ^{13}C-NMR-Spektroskopie eine der geminalen Methyl-Gruppen an C-1 um 4 - 6 ppm Hochfeld verschoben sein (γ-*cis*-Effekt). Tatsächlich bewegt sich eine Methylgruppe in Richtung Hochfeld, die andere in Richtung Tieffeld, beide um ~2,5 ppm.

Zusätzlich konnte noch durch die sehr kleine vicinale Kopplungskonstante zwischen 3-H und 4-H gezeigt werden, daß es sich um die *trans*-Verbindung handelt. Eine komplette Analyse der ^{1}H,^{1}H long-range-Kopplungsmuster des α-Ionons stellten zusätzlich den definitiven Beweis für die quasi-axiale Verbindung her. Diese Orientierung wurde ebenfalls durch Kern-Overhauser-Effekt (NOE) Differenzspektroskopie Experimente (Machida und Kikuchi, 1996) gezeigt. Doch weder diese noch andere Experimente (Rüttimann und Mayer, 1980; Mori, 1974; Pfander und Semadeni, 1995; Mayer und Rüttimann, 1980) konnten diese kleine ^{1}H,^{1}H-Kopplungskonstante auflösen, bei der die 3-H und 4-H Resonanzen in hoch komplexe Mul-

tiplets aufgespalten werden. Die ^{1}H-NMR Daten von *cis*- und *trans*-3-Hydroxy-α-ionon, die von Yamazaki ermittelt wurden (Yamazaki et al., 1988), zeigten andererseits deutlich, daß sich die Werte der chemischen ^{1}H-Verschiebungen dieser zwei diastereoisomeren Verbindungen allein nicht genügend für eine einfache stereochemische Übertragung unterscheiden.
Die GC/MS-Messungen konnten diese Strukturaufklärung bestätigen und belegten, daß *cis*-3-Hydroxy-α-ionon tatsächlich nur unter 5 % gebildet wird.

3-Hydroxy-α-ionon könnte gegenüber 3-Hydroxy-β-ionon als adäquater Baustein für die Carotinoidsynthese dienen, da durch Isomerisierung eine Überführung von 3-Hydroxy-α- nach 3-Hydroxy-β-ionon möglich sein sollte.
Bei der Biosynthese der Carotinoide ist der genaue Mechanismus der einzelnen Schritte bisher noch nicht geklärt. Das Vorhandensein der 3-Hydroxy-β-carotin-Derivate in der Natur kann folgendermaßen gedeutet werden: Entweder es gibt hochspezifische Enzyme, die nicht aktivierte C-H-Bindungen oxidieren, dafür jedoch mehr Wechselwirkungen zwischen Substrat und Protein benötigen als Ionone vermitteln können, oder es gibt auf dem Biosyntheseweg zu oxidierten β-Carotinen eine Isomerase, die intermediär eine allylische Funktion an der zu oxidierenden Stelle erzeugen kann.

2. Identifizierung der P450-Gene

Nach Identifizierung der Stämme die α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon umsetzen können, sollten die Gene, die diese Hydroxylase kodieren, identifiziert und isoliert werden. Da solche Reaktionen im allgemeinen von Cytochrom P450-Hydroxylasen katalysiert werden, sollten die P450-Gene dieser Stämmen identifiziert werden.

Die Identifizierung dieser Gene fand über eine PCR-Reaktion mit abgeleiteten P450-Primern statt. Für die Ableitung der Primer wurde ein Homologievergleich mit zehn Aminosäuresequenzen von bereits beschriebenen P450-Enzymen aus *Streptomyces* durchgeführt. Die Primer wurden sowohl aus den beiden hoch homolgen Regionen der Sauerstoffbindungstasche und der Häm-Bindungsregion gewählt (Hyun et al., 1998), als auch aus einer weiteren homologen Region, womit dann ein etwa 790 bp großes Fragment amplifiziert werden konnte. Es wurden nicht nur die Sequenzen von P450-Hydroxylasen ausgewählt, die sehr homolog zueinander sind, sondern auch solche, die in der Subfamilie etwas weiter voneinander entfernt sind, um mit den abgeleiteten Primern ein möglichst breites Spektrum an Cytochrom P450-Genen amplifizieren zu können.
Mit den Stämmen *S. antibioticus* Tü 4, *S. fradiae* Tü 27, *S. violaceoniger* Tü 38, *S. arenae* Tü 495 und *S. griseus* ATCC 13273 wurde dann mit den abgeleiteten Primern die PCR-Reaktion durchgeführt. Bis auf Tü 495 konnte bei allen Stämmen alle drei Fragmente amplifiziert werden. Bei Tü 495 wurden nur die kleinen Fragmente amplifiziert, was vermutlich auf vorhandene Sekundärstrukturen zurückzuführen ist.
Nach Sequenzierung der 790 bp großen DNA-Fragmente konnten für Tü 27 und Tü 4 jeweils zwei P450-homologe Gensequenzen und für Tü 38 sogar 3 Gensequenzen identifiziert werden. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, daß in Streptomyceten in der Regel mehr als ein Cytochrom P450 vorhanden ist (O'Keefe und Harder, 1991).
Auch Hyun et al. konnten mit einem ähnlichen Ansatz P450-homologe Genfragmente aus verschiedenen Stämmen isolieren, die allerdings nur 350 bp groß waren. Darüber hinaus konnte mit dieser Methode pro Stamm nur ein P450-Genfragment identifiziert werden.
Besonders bemerkenswert sind die hohen Homologien, die zwischen den Aminosäuresequenzen von P450-27P und P450-38/1 (98.5 %), sowie P450-27Q und P450-38/2 (95.2 %) herrschen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß diese Gene dieselbe Funktion und/oder denselben Evolutionsprozeß besitzen. Dies könnte schon mal ein Hinweis sein, daß eines der

beiden Genfragmente für die Hydroxylase kodiert, die die selektive Umsetzung von α-Ionon katalysiert.

In Tabelle 32 ist das Ergebnis des Vergleichs der Aminosäuresequenzen der PCR-Produkte und weiterer P450-Hydroxylasen gezeigt.
Es ist zu erkennen, daß P450-27P und P450-38/1 eine höhere Homologie zu *suaC* (61.3 %) als zu *subC* (50.2 %) und *soyC* (~ 48.4 %) besitzen. Bei P450-27Q und P450-38/2 ist das genau umgekehrt. Auch P450-38/6 zeigt eine höhere Homologie zu *subC* (56.5 %) und *soyC* (63.9 %). Auffallend ist auch die hohe Homologie von P450-38/6 zu den Genfragmenten HCG74 (67.5 %) aus *S. griseus* und JM2 (76.3%) aus *S. sclerutialis* sowie dem Gen *S.liv* (74.6 %) aus *S. lividans*, die auch familiär dem *soyC* und *subC* zugeordnet werden (Hyun et al., 1998). P450-4/1 und P450-4/9 zeigen in fast allen Fällen eine geringere Homologie als die aus Tü 27 und Tü 38 isolierten Genfragmente, wobei sie untereinander eine Homologie von 71.4 % besitzen. Allen gemeinsam ist, daß sie zu *CYP*113B1 und *CYP*107F2 nur knapp 30 % homolog sind.
Es konnte zum einen gezeigt werden, daß aufgrund der hohen Homologien die isolierten Genfragmente tatsächlich Fragmente von P450-Genen darstellen. Zum anderen konnte die Zuordnung von P450-27P und P450-38/1 zu *suaC* und P450-27Q, P450-38/2 und P450-38/6 zu *soyC* und *subC* als Subfamilien (über 50% Homologie) gezeigt werden.

Tabelle 32: Vergleich zwischen den Aminosäuresequenzen der PCR-Produkte mit anderen P450-Hydroxylasen.

	P450-27P	P450-27Q	P450-38/1	P450-38/2	P450-38/6	P450-4/1	P450-4/9
P450-27/P		47.7	98.5	46.6	53.3	47.5	48.3
P450-27Q	47.7		47.2	95.2	54.5	47.1	45.2
P450-38/1	98.5	47.2		46.2	52.9	47.5	48.3
P450-38/2	46.6	95.2	46.2		54.9	47.1	45.4
P450-38/6	53.3	54.5	52.9	54.9		49.6	47.9
P450-4/1	47.5	47.1	47.5	47.1	49.6		71.4
P450-4/9	48.3	45.2	48.3	45.4	47.9	71.4	
SuaC	61.3	47.6	61.3	49.2	50.2	47.9	47.5
SubC	50.2	51.6	50.2	50.4	56.5	48.1	44.0
SoyC	48.8	52.3	48.1	52.3	63.9	47.5	47.1
choP	45.5	43.6	45.5	45.1	45.7	44.3	46.4
rapN	39.8	32.3	40.6	32.3	39.6	38.8	35.9
rapJ	35.8	39.8	36.3	41.0	34.5	32.4	33.5
CYP107C1	37.6	34.5	38.8	35.3	31.9	33.8	32.0
eryF	41.9	36.5	42.6	37.6	37.4	38.2	41.3
pikC	44.2	38.5	45.1	38.6	38.8	42.3	40.3
oleP	42.3	39.1	42.0	37.8	40.8	40.1	38.5
sca-2	51.0	50.7	51.0	50.0	57.6	48.5	46.9
CYP113B1	33.7	34.4	34.9	35.2	33.2	34.9	35.4
CYP107F2	33.2	33.0	34.0	34.3	32.9	29.0	34.0
HCG73	54.2	48.2	53.4	48.2	54.4	50.5	49.5
HCG74	56.9	50.1	57.8	51.8	67.5	49.1	50.9
JM2	65.5	52.6	66.4	55.3	76.3	58.5	58.3
S.liv	51.6	51.2	51.6	51.6	74.9	51.7	45.0
HCG72	54.1	44.0	53.2	44.0	46.7	47.7	53.5

Sequenzvergleich wurde durch Multalign version 5.3.3.INRA France (Corpet, 1988) durchgeführt. Die Aminosäuresequenzen wurden aus folgenden Quellen bezogen: suaC (P18326), subC (P18327), soyC (P26911), choP (P23296), rapN (Q54302), rapJ (Q59921), CYP107C1 (Q60005), eryF (Q00441) aus *S. erythraeus*, pikC (O87605) aus *S. venezuelae*, oleP (Q59819) aus *S. antibioticus*, sca-2 (Q59831), CYP113B1 (Q59910), CYP107F1 (Q59915), HCG73 (O85650) aus *S. glaucescens*, HCG74 (O85651) aus *S. griseus.*, JM2 (O85655) aus S. *sclerutialis*, S.liv (O85697): Putative Cytochrom P450 aus *S. lividans*, HCG72 (O85649) aus *S. albus*.

3. Isolierung des gesamten P450-Gens aus *Streptomyces fradiae*

Um die gesamte Gensequenz der Genfragmente P450-27P und P450-27Q zu ermitteln, wurden verschiedene Methoden durchgeführt: Direkte Sequenzierung der genomischen DNA, Long-Distance Genome-Walking und Erstellung und Screening einer Genbank von *Streptomyces fradiae*. Mit keine der Methoden konnte die gesamte Sequenz ermittelt werden.

Die direkte Sequenzierung von genomischer DNA ist sehr problematisch. Die Signalintensität entspricht nur 10 - 20 % verglichen mit derjenigen, die bei der Sequenzierung von Plasmid-DNA erreicht wird. Allerdings konnte durch Einsatz des BigDye-Terminators die Qualität der Signale so verbessert werden, daß durch eine Erniedrigung des Grundrauschens auch schwache Signale gut aufgelöst werden können. Die Methode, die von Heiner et. al. (1998) entwickelt wurde, versucht, die geringen Mengen an eingesetzter DNA, die bis zu eintausend Mal geringer ist, als die an Plasmid-DNA, durch höhere Mengen an Primer und höhere Zyklenzahl bei der PCR-Reaktion zu kompensieren.
Für das Scheitern dieser Methode gibt es mehrere Gründe, z. B. die Qualität und Quantität der DNA, da eine optimale Menge an DNA (2 µg) sehr wichtig ist (Heiner et al., 1998). Für die DNA, die über Anionenaustauschersäulen isoliert wurde, war aufgrund geringer Mengen keine Quantifizierung möglich. Hier konnten aufgrund zu geringer DNA-Mengen nur schwache Signale erhalten werden und damit keine auswertbare Sequenz.
Ein weiteres Problem liegt darin, daß die Streptomyceten-DNA durch ihren hohen GC-Gehalt sehr stark verknäult ist und eine Anlagerung der Primer dadurch erschwert wird. Durch Zugabe von 5 % DMSO zum Sequenzieransatz und Aufkochen der DNA vor der Sequenzierung wurde versucht, diesem entgegenzuwirken.

Bei der Durchführung der Long-Distance Genome-Walking Methode konnten nach Durchführung der PCR mit verschiedenen Polymerasen unterschiedlich große Genfragmente isoliert werden. Die größten Fragmente wurden mit der KlenTaq LA-Polymerase erzielt. Allerdings konnten keine Fragmente über 1.6 kb isoliert werden. Die Sequenzierung ergab keine Homologie mit P450-Genen. Dies bestätigt die Untersuchungen von Min et al. (1998), daß Fragmente unter 2 kb Artefakte und nur Fragmente über 2 kb erfolgsversprechend sind.
Aufgrund der Probleme mit den vorherigen Methoden wurde versucht, über die klassische Methode des Erstellens und Screenens einer Genbank, das vollständige P450 homologe Gen

zu isolieren. Als Sonde für das Screening der Genbank konnten hier die beiden Genfragmente P450-27P und P450-27Q dienen.

Um gezielt eine Genbank zu erstellen, wurde die genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen, die in der „Multiple cloning site“ von pUC liegen, verdaut. Die Hybridisierung der resultierenden DNA-Fragmente mit den Sonden P450-27P und P450-27Q ergab in den meisten Fällen mehr als 7 kb große hybridisierende DNA-Fragmente. Nach Verdau der genomischen DNA mit *Sac*I wurde mit der Sonde P450-27P ein DNA-Fragment der Größe 3.5 - 4 kb und mit der Sonde P450-27Q ein DNA-Fragment der Größe 4.5 - 5 kb erhalten. Allerdings war die Hybridisierungsbande mit der Sonde P450-27P sehr schwach. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß noch ein Anteil an genomischer DNA ungespalten vorlag. Auch nach Verdau mit *Sph*I konnte mit beiden Sonden jeweils ein DNA-Fragment unter 8 kb detektiert werden. Mit *Bam*HI konnte ebenfalls ein Hybridisierungssignal unter 8 kb mit der Sonde P450-27P detektiert werden und mit *Bgl*II mit der Sonde P450-27Q. Vermutlich besitzt die genomische DNA von *Streptomyces fradiae* wegen ihres hohen GC-Gehaltes nur wenige Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme.
Aufgrund der erhaltenen Größen, der mit der Sonde hybridisierenden DNA-Fragmente schien eine Klonierung mit dem durch *Sac*I-Verdau der genomischen DNA und Erstellung einer Genbank mit einem 3.5 - 5.5 kb großen Fragment am sinnvollsten. Parallel sollten aber auch durch Verdau mit anderen Enzymen entstandene Fragmenten kloniert werden, die Hybridisierungsbanden mit einer der beiden Sonden unter 8 kb zeigten. Nur mit *Sac*I konnte eine Transformationseffizienz von 500 - 700 Transformanden erreicht werden.
Durch Koloniehybridisierung der Genbank gegen die Sonde P450-27Q konnte ein positiver Klon (27Q-Sac) identifiziert werden. Erste Test-PCR-Reaktionen und eine Sequenzierung bestätigten, daß es sich dabei wirklich um das P450-homologe Genfragment P450-27Q handeln sollte. Eine weitere Subklonierung des Klons 27Q-Sac mit *Bam*HI zeigte allerdings nach Sequenzierung der Subklone keine Homologie mehr mit dem Genfragment P450-27Q.

Daraufhin wurde versucht, eine Genbank durch partiellen Verdau der genomischen DNA zu erstellen. Als Restriktionsenzym für den partiellen Verdau der genomischen DNA wurde *Sau*3AI verwendet. Dieses Enzym sollte aufgrund der Sequenz seiner Schnittstelle (GATC) häufiger schneiden und daher auch eine gute statistische Verteilung aller Fragmentgrößen liefern. Durch Variation der Enzymmenge wurde versucht, eine optimale Spaltung der DNA zu erhalten. Die 3 - 6 kb Fragmente wurden dann in pUC18 ligiert und in *E. coli* transformiert. Allerdings war die Transformationseffizienz so gering, daß kein Screening durchgeführt werden konnte.

4. Integrationsmutagenese

4.1. Etablierung eines Wirts-Vektor-Systems

Die Anwendbarkeit von zwei für *Streptomyces*-Stämme beschriebenen Transformationsmethoden (PEG-induzierte Protoplastentransformation (Hopwood, 1985) und interkonjugativer Transfer (Flett et al., 1997)) wurde überprüft.
Zunächst wurde der interkonjugative Transfer von Plasmid-DNA von *E. coli* auf *Streptomyces* untersucht. Hier mußte zunächst die Eignung des Integrationsvektor pSP1mod zur Interkonjugation durch einen Transfer von *E. coli* S17-1 nach *E. coli* XL1-Blue überprüft werden. Das Resultat war positiv und somit konnte pSP1mod für den interkonjugativen Transfer von Plasmid-DNA von *E. coli* nach *Streptomyces* eingesetzt werden. Als Donor wurde der Stamm *E. coli* ET12567 eingesetzt, der das Plasmid pUB307 trägt. Auch eine Variation des Mengenverhältnisses von Donor und Rezipient führte zu keinem positiven Konjuganten. Den Stamm *E. coli* S17-1 als Donor zu verwenden erschien nicht sinnvoll, da er bereits in früheren Untersuchungen (Flett et al., 1997) eine geringere Transformationseffizienz gezeigt hatte.

Daraufhin wurde versucht, transformierbare und regenerierbare Protoplasten nach der Methode von Hopwood (1985) zu erzeugen. Hierbei wurde festgestellt, daß die Kultivierungsdauer des Stammes *S. fradiae* Tü 27 eine sehr große Rolle für die Anzahl der Protoplasten spielt. Wurde eine Kultivierungsdauer von 2 bis 3 Tagen wie von Hopwood beschrieben eingehalten, konnte nur eine geringe Anzahl an Protoplasten isoliert werden. Eine äußerst geringe Transformationseffizienz war die Folge. Als optimal hat sich eine Kultivierung über Nacht in S-Medium herausgestellt. Die Regenerierbarkeit der Protoplasten war der nächste kritische Schritt. Durch das schnelle Wachstum des *S. fradiae* konnten Ansätze, die über Nacht bei 30°C inkubiert wurden, nicht mehr regeneriert werden. Nach Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht, war es möglich, die Protoplasten zu regenerieren.
Auch der eingesetzte Vektor hatte einen Einfluß auf die Effizienz der Transformation. Mit den pGM-Vektoren konnten 10 mal so viele Transformanden erzielt werden, wie mit pIJ702. Aus diesem Grund wurde pGM als Vektor für Integrationsmutagenese verwendet.

4.2. Inaktivierung der Gene *P450-27P* und *P450-27Q* und Umsetzung der Integrationsmutante mit α-Ionon

Um die Gene P450-27P und P450-27Q durch Integrationsmutagenese zu inaktivieren, wurden die Plasmide pGMP450-27P' und pGMP450-27Q' in *S. fradiae* transformiert und über homologe Rekombination in die chromosomale DNA von *S. fradiae* integriert. Die erfolgreiche Integration der Plasmide konnte über Southern Blot Experimente nachgewiesen werden. Da die in den Plasmiden vorhandenen P450 Genfragmente P450-27P und P450-27Q ohne Translationsstart und Stopkodons integriert wurden, sollte die weitere Expression dieser Gene unmöglich sein.

Es sollte nun gezeigt werden, daß eine Umsetzung von α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon mit einer der Integrationsmutanten GMP450-27P und GMP450-27Q nicht mehr möglich ist, wenn eines der beiden Genfragmente für die "richtige" P450-Hydroxylase kodiert. Bei den Umsetzungen der Mutanten mit α-Ionon zeigte sich generell eine schlechtere Umsetzung, die aber auf die veränderten Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sein kann. Bei der Etablierung des Wirts-Vektor-Systems wurde bereits gezeigt, daß sich eine Veränderung der Inkubationstemperatur auf das Zellwachstum negativ auswirkt. Bei der Biotransformation von α-Ionon mit der Mutante GMP450-27Q konnte durch GC-Analytik die Umsetzung zu 3-Hydroxy-α-ionon und einem weiteren Nebenprodukt nachgewiesen werden. Für GMP450-27P dagegen konnte eine Umsetzung von α-Ionon zu zahlreichen Hydroxy- und Oxo-Derivaten, aber nicht mehr selektiv zu 3-Hydroxy-α-ionon nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß das Gen P450-27P das Gen ist, das die P450-Hydroxylase kodiert, die α-Ionon selektiv zu 3-Hydroxy-α-ionon umsetzen kann.

Die Integrationsmutanten könnten in weiteren Arbeiten für die weitere Isolierung der vollständigen Gene dienen. Durch die Integration der Plasmide steht die Position der Gene fest. Über gezielte Spaltung der genomischen DNA der Integrationsmutanten, können die Gene dann isoliert und gegebenenfalls nach Subklonierung sequenziert werden.

Auf die Isolierung würde sich eine Überexpression der vollständigen Gene in einem geeigneten Wirt anschließen, um die exprimierten Proteine dann auf ihre Hydroxylierungsaktivität hin untersuchen zu können.

5. Expression von *soyC* aus *Streptomyces griseus* in *E. coli*

Für die Expression von *soyC* in *E. coli* wurden die Expressionssysteme pCYTEXP1, pASK-IBA1CA und pJOE2775 verwendet. Nach SDS-Gel Analyse von mit pCYTEXP1-soyC transformierten Zellen ergab eine Proteinbande von 44 kDa, was gut mit dem erwarteten Molekulargewicht übereinstimmte. Auch bei der Expression von pJOE-soyC in *E. coli* konnte eine Proteinbande bei 44 kDa detektiert werden. Bei pASK konnte keine Expression festgestellt werden. Die Probleme könnten bei der Induktion des Anhydrotetracyclin-Promotors liegen.
Generell konnte bei den P450-Konzentrationsbestimmungen im Zellysat induzierter Zellen zwar P450 detektiert werden, allerdings war der Gehalt so gering, daß eine genaue Quantifizierung nicht möglich war. Bei der Expression des *soyC* in *S. lividans* (Trower et al., 1992) konnte eine Expressionsrate von 0.19 nm P450 pro mg Protein erzielt werden. Allerdings zeigten hier Untersuchungen, daß die Expression sehr stark vom Medium abhing. Es wurde bevorzugt in Medium, das Sojabohnenmehl enthält, exprimiert. Die Gene *suaC* und *subC* aus *S. griseolus* konnten bereits erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden (Omer et al., 1990). Hier wurden die Gene unter Kontrolle des *Lac*-Promotors durch Induktion mit IPTG exprimiert.

Da P450-Enzyme meistens sehr thermolabil sind, könnte durch Wärmeentwicklung bei der Ultraschallbehandlung zu viel Protein denaturiert worden sein und die geringen P450-Konzentrationen erklären. Um nun höhere Konzentrationen an P450 zu erhalten, könnte zusätzlich versucht werden, die Aufschlußmethoden zu variieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse eröffnen somit Wege, Zwischenstufen für die chemo-enzymatische Synthese von Carotinoiden durch Umsetzung von Iononen mit Streptomyceten-Stämmen zu gewinnen.

E Zusammenfassung

Ionone sind wichtige Komponenten in essentiellen Ölen und stellen wichtige Zwischenprodukte im Terpenmetabolismus, z.B. in der Carotinoidbiosynthese, dar. Dabei könnten insbesondere die 3-Hydroxyionone als wertvolle Zwischenstufen für die chemisch-enzymatische Synthese von Carotinoiden, z.B. für Zeaxanthin und Astaxanthin dienen.

Gegenstand dieser Arbeit war es, diese Synthesebausteine durch direkte Umsetzung von α- bzw. β-Ionon mittels Mikroorganismen zu gewinnen. Hierzu wurden für ein Screening überwiegend Streptomyceten-Stämme verwendet, da diese schon bei Biotransformationen anderer Naturstoffe ein breites Substratspektrum gezeigt hatten.

Über 200 Stämme wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, β- und/oder α-Ionon regio- und stereoselektiv zu den jeweiligen 3-Hydroxy-Derivaten umzusetzen. Mit β-Ionon als Substrat zeigten 19 Stämme Umsetzung zu 4-Hydroxy- und nicht zum gewünschten 3-Hydroxy-β-ionon. Unter diesen 19 Stämmen setzten sechs α-Ionon zu 3-Hydroxy-α-ionon um. *Streptomyces fradiae* Tü 27 zeigte mit 75 % die größte Umsatzrate. Aufgrund von GC- und NMR-Daten konnte gezeigt werden, daß die Hydroxylierung von racemischem α-Ionon [(6*R*)-(-) / (6*S*)-(+)] nur die Bildung der zwei Enantiomere (3*R*,6*R*)- und (3*S*,6*S*)-Hydroxy-α-ionon ergab. Das bedeutet, daß die enzymatische Hydroxylierung von α-Ionon durch die getesteten Streptomyceten-Stämme sowohl mit einer hohen Regio- als auch mit einer hohen Stereoselektivität stattfindet.

Um die Gene, die für diese Hydroxylase kodieren, zu isolieren, wurden P450-Genfragmente aus drei Stämmen amplifiziert und sequenziert. Aus *S. fradiae* Tü 27 konnten zwei P450 Genfragmente identifiziert werden. Die Isolierung der vollständigen P450-homologen Gene mit unterschiedlichen Methoden (Direktsequenzierung der genomischne DNA, Long-Distance Genome Walking, Erstellung und Screening einer Genbank) gelang jedoch nicht.

Parallel wurde für nachfolgende Arbeiten als Modell die Überexpression eines bereits bekannten P450-Gens, *soyC*, in *E. coli* durchgeführt. Mit den Systemen pCYTEXP1 und pJOE2775 konnte auf dem SDS-Gel eine Proteinbande in der erwarteten Größe detektiert werden, allerdings war die Konzentration an P450 so gering, daß bei Messungen der CO-Differenzspektren keine Quantifizierung durchgeführt werden konnte.

Um nun eine Aussage darüber treffen zu können, ob eines der beiden P450-Genfragmente aus dem Stamm *Streptomyces fradiae* Tü 27 die Hydroxylase kodiert, die die selektive Hydroxylierung des α-Ionons katalysiert, wurden die P450 homologen Gene durch Integrationsmutagenese inaktiviert. Die Mutanten wurden für die Umsetzung von α-Ionon eingesetzt. Während mit der Integrationsmutante GMP450-27Q eine Umsetzung zu 3-Hydroxy-α-ionon stattfand, allerdings mit Nebenprodukt, konnte mit GMP450-27P keine selektive Hydroxylierung zu 3-Hydroxy-α-ionon nachgewiesen werden. Statt dessen wurde α-Ionon zu zahlreichen Hydroxy- und Oxo-Derivaten umgesetzt. Somit scheint *P450-27P* für die selektive Hydroxylierung von α-Ionon verantwortlich zu sein.

F Literatur

Altenbuchner, J.und Cullum, J. (1984). DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. Mol. Gen. Gentetic *195*, 134-138.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. und Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90*, 7915-7922.

Andersen, J. F. und Hutchinson, C. R. (1992). Characterization of *Saccharopolyspora erythraea* cytochrome P-450 genes and enzymes, including 6-deoxyerythronolide B hydroxylase. J. Bacteriol *174*, 725-735.

Bauernfeind, J. C. (1981). In Carotenoids as colorants and vitamin A precursors, J. C. Bauernfeind, ed. (New York: Acadamic Press).

Belev, T. N., Singh, M. und McCarthy, J. E. (1991). A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*. Plasmid *26*, 147-150.

Belitz, H.-D. und Grosch, W. (1992). Lehrbuch der Lebensmittelchemie (Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag), S. 217.

Betlach, M. C., Kealey, J. T., Ashley, G. W. und McDaniel, R. (1998). Characterization of the macrolide P-450 hydroxylase from *Streptomyces venezuelae* which converts narbomycin to picromycin. Biochemistry *37*, 14937-14942.

Bibb, M. J., Findlay, P. R. und 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*, 157-166.

Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E. T., Nagaraja-Rao, R. und Schoner, B. E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. Gene *116*, 43-49.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res *7*, 1513-1523.

Brolle, D. F., Henzler, T., Stefani, S., Weissenborn, A., Zell, D. und Wohlleben, W. (1997). Isolation of very-low-copy SCP2* plasmids from *Streptomyces*. QIAGEN News, 9-10.

Brush, A. H. (1990). Metabolism of carotenoids in birds. FASEB J. *4*, 2969.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987). XL1-Blue, a high efficieny plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. BioTechniques *5*, 376-379.

Chung, C. T., Niemela, S. L. und 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*, 2172-2175.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. *16*, 10881-10890.

Enzell, C. R., Wahlberg, I. und Aasen, J. A. (1977). Isoprenoids and alkaloids of tobacco. Fortschr. Chem. Org. Naturst. *34*, 1-79.

Evans, C. T., Adam, D. und Wisdom, R. A. (1990). In European Patent Application.

Flett, F., Mersinias, V. und Smith, C. P. (1997). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. FEMS Microbiol. Lett. *155*, 223-229.

Freeman, M., Baehler, C. und Spotts, S. (1990). Automated laser-fluorescence sequencing. Biotechnology (N Y) *8*, 147-148.

Golovacheva, R. S., Loginova, L. G., Salikhov, T. A., Kolesnikov, A. A.undZaitseva, G. N. (1975). [New species of thermophilic bacilli-*Bacillus thermocatenulatus* nov. sp]. Mikrobiologia *44*, 265-268.

Goodwin, T. W. (1984). Biochemistry of Carotenoids, 2nd Edition, Volume 2 (London: Chapman & Hall).

Goodwin, T. W. (1986). Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. Annu. Rev. Nutr. *6*, 273.

Guengerich, F. P. (1991). Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. J. Biol. Chem. *266*, 10019-10022.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. *166*, 557-580.

Hartman, D. A., Pontones, M. E., Kloss, V. F., Curley, J., R. W. und Robertson, L. W. (1988). Models of retinoid metabolism: microbial biotransformation of α-ionone and β-ionone. J. Nat. Prod. (Lloyida) *51*, 947-953.

Haydock, S. F., Dowson, J. A., Dhillon, N., Roberts, G. A., Cortes, J. und Leadlay, P. F. (1991). Cloning and sequence analysis of genes involved in erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*: sequence similarities between EryG and a family of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. Mol. Gen. Genet. *230*, 120-128.

Heiner, C. R., Hunkapiller, K. L., Chen, S.-M., Glass, J. I. und Chen, E. Y. (1998). Sequencing multimegabase-template DNA with BigDye terminator chemistry. Genome Research *8*, 557-561.

Hirayama, T. (1979). Nutr. Cancer *1*, 67.

Hopwood, D. A. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. (Norwich, England: John Innes Foundation, F. Crowe & Sons Ltd.).

Hopwood, D. A., Kieser, T., Wright, H. M. und Bibb, M. J. (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. J. Gen. Microbiol. *129*, 2257-2265.

Horii, M., Ishizaki, T., Paik, S. Y., Manome, T. und Murooka, Y. (1990). An operon containing the genes for cholesterol oxidase and a cytochrome P-450-like protein from a *Streptomyces* sp. J. Bacteriol. *172*, 3644-3653.

Hundle, B., Alberti, M., Nievelstein, V., Beyer, P., Kleinig, H., Armstrong, G. A., Burke, D. H. und Hearst, J. E. (1994). Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. *245*, 406-416.

Hyun, C.-G., Kim, J.-M., Hong, S.-K. und Suh, J.-W. (1998). An efficient approach for cloning P450 hydroxylase genes from actinomycetes. J. Microbiol. Biotechnol. *8*, 295-299.

Jakoby, W. B. und Ziegler, D. M. (1990). The enzyme of detexofication. J. Biol. Chem. *265*, 20715.

Kaim, W., und Schwederski, B. (1995). Bioanorganische Chemie, C. Elschenbroich, Hensel, F., and Hopf, H., ed. (Stuttgart: Teuber).

Katz, E., Thompson, C. J. und Hopwood, D. A. (1983). Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. J. Gen. Microbiol. *129*, 2703-2714.

Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces* lividans and *Escherichia coli*. Plasmid *12*, 19-36.

Klaui, H. und Bauernfeind, J. C. (1981). In Carotenoids as colorants and Vitamin A precursors, J. C. Bauernfeind, ed. (New York: Acadamic Press), S. 47.

Klingenberg, M. (1958). Pigments of Rat Liver Microsomes. Arch. Biochem. Biophys. *75*, 376-386.

Krasnobajew, V. (1980). Riech- und Geschmackstoffe, deren fermentative Herstellung, deren Verwendung und Produkte, die sie enthalten. (Europäisches Patentamt.

Krasnobajew, V. (1984). Terpenoids. In Biotechnology, Vol. 6a. Biotransformations, K. Kieslich, ed. (Deerfield Beach, Fla.: Verlag Chemie).

Krasnobajew, V. und Helmlinher, D. (1982). Fermentation of fragrances: Biotransformation of β-ionone by *Lasiodiplodia theobromae*. Helv. Chim. Acta *65*, 1590-1601.

Krebsfänger, N., Schierholz, K. und Bornscheuer, U. T. (1998). Enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens* towards alcohols and carboxylic acids. J. Biotechnol. *60*, 105-111.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Larroche, C., Creuly, C. und Gros, J.-B. (1995). Fed-batch biotransformation of β-ionone by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. *43*, 222-227.

Lenoir, D. und Sandermann, H. J. (1993). Entstehung und Wirkung von Dioxinen. Biol. Unserer Zeit *23*, 363.

Lippard, S. J., und Berg, J. M. (1995). Bioanorganische Chemie, Volume 1, M. Jeremey, ed. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).

Loeber, D. E., Russell, S. W., Toube, T. P., Weedon, B. C. L. und Diment, J. (1971). Carotenoids and related compounds. Part XXVIII. Syntheses of zeaxanthin, β-cryptoxanthin, and zeinoxanthin (α-cryptoxanthin). J. Chem. Soc. C, 404-408.

Lomovskaya, N., Otten, S. L., Doi-Katayama, Y., Fonstein, L., Liu, X. C., Takatsu, T., Inventi-Solari, A., Filippini, S., Torti, F., Colombo, A. L. und Hutchinson, C. R. (1999). Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. J. Bacteriol. *181*, 305-318.

Machida, K. und Kikuchi, M. (1996). Norisoprenoids from *Viburnum dilatatum*. Phytochemistry *41*, 1333-1336.

MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H. und MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. Gene *111*, 61-68.

Maier, E. und Lehrach, H. (1997). Neue Techniken zur Automatisierung in der DNA-Sequenzierung. Chemie in unserer Zeit *2*, 66.

Mandon, D., Weiss, R., Franke, M., Bill, E. und Trautwein, A. X. (1989). Ein Oxoeisen-porphyrinat mit höherwertigem Eisen: Bildung durch lösungsmittelunabhängige Protonierung eines Peroxoeisen(III)-porphyrinat-Derivats. Angew. Chemie *101*, 1747.

Manome, T. und Hoshino, E. (1989). Abstr. Jpn. Agric. Biol. Chem. *63*, 157.

Masamoto, K., Misawa, N., Kaneko, T., Kikuno, R. und Toh, H. (1998). Beta-carotene hydroxylase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. Plant. Cell Physiol. *39*, 650-564.

Matsuoka, T., Miyakoshi, S., Tanzawa, K., Nakahara, K., Hosobuchi, M. und Serizawa, N. (1989). Purification and characterization of cytochrome P-450_{sca} from *Streptomyces carbophilus*. Eur. J. Biochem. *184*, 707-713.

Maxam, A. M. und Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol. *65*, 499-560.

Mayer, H. und Rüttimann, A. (1980). Synthese von optisch aktiven, natürlichen Carotinoiden und strukturell verwandten Naturprodukten. IV. Synthese von (3*R*,3'*R*,6'*R*)-Lutein. Helv. Chem. Acta *63*, 1451-1455.

Mazodier, P., Petter, R. und Thompson, C. (1989). Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. J. Bacteriol. *171*, 1459-1466.

McDonnell, M. W., Simon, M. N. und Stidier, F. W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J. Mol. Biol. *110*, 119.

Merson-Davies, L. A. und Cundliffe, E. (1994). Analysis of five tylosin biosynthetic genes from the tyllBA region of the *Streptomyces fradiae* genome. Mol. Microbiol. *13*, 349-355.

Mikami, Y., Fukunaga, Y., Arita, M. und Kisaki, T. (1981). Microbial transformation of β-ionone and β-methylionone. Appl. Environ. Microbiol. *41*, 610-617.

Mikami, Y., Watanabe, E., Fukunaga, Y. und Kisaki, T. (1978). Formation of 2S-hydroxy-β-ionone and 4ζ-hydroxy-β-ionone by microbial hydroxylation of β-ionone. Agric. Biol. Chem. *42*, 1075-1077.

Min, G.-S. und Powell, J. R. (1998). Long-distance genome walking using the long and accurate polymerase chain reaction. BioTechniques *24*, 398-400.

Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. und Harashima, K. (1990). Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. *172*, 6704-6712.

Mori, K. (1974). Syntheses of optically active grasshopper ketone and dehydrovomifoliol as a synthetic support for the revised absolute configuration of (+) abscisic acid. Tetrahedron *30*, 1065-1072.

Motamedi, H., Shafiee, A., Cai, S. J., Streicher, S. L., Arison, B. H. und Miller, R. R. (1996). Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520. J. Bacteriol. *178*, 5243-5248.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *51*, 263-273.

Muth, G., Nußbaumer, B., Wohlleben, W. und Pühler, A. (1989). A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in Streptomycetes. Mol. Gen. Genetic *219*, 341-348.

Mutschler, E. (1991). Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 6. Aufl. Edition (Stuttgart: WVG).

Narhi, L. O., und Fulco, A. J. (1987). Identification and Characterization of Two Functional Domains in Cytochrome P-450 BM-3, a Catalytically Self-sufficient Monooxygenase Induced by Barbiturates in *Bacillus megaterium*. J. Biol. Chem. *262*, 6683-6690.

Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W.et al. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. DNA *6*, 1-11.

Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. und Nebert, D. W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics *6*, 1-42.

Ninet, L. und Renault, J. (1979). . In Microbiol Technology, H. J. Peppler und D. Perlman, Hrsg. (New York: Acadamic Press), S. 529.

Ohloff, G. (1978). Recent development in the field of naturally occuring aroma components. Fortschr. Chem. Org. Naturst. *35*, 431 527.

Okanishi, M., Suzuki, K. und Umezawa, H. (1974). Formation and reversion of Streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study. J. Gen. Microbiol. *80*, 389-400.

O'Keefe, D., Gibson, K. J., Emptage, M. H., Lenstra, R., Romesser, J. A., Litle, P. J. und Omer, C. A. (1991). Ferredoxins from two sulfonylurea herbicide monooxygenase systems in *Streptomyces griseolus*. Biochemistry *30*, 447-455.

O'Keefe, D. P. und Harder, P. A. (1991). Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes. Mol. Microbiol. *5*, 2099-2105.

O'Keefe, D. P., Romesser, J. A. und Leto, K. J. (1988). Identification of constitutive and herbicide inducible cytochromes P-450 in *Streptomyces griseolus*. Arch. Microbiol. *149*, 406-412.

Olano, C., Rodriguez, A. M., Michel, J. M., Mendez, C., Raynal, M. C. und Salas, J. A. (1998). Analysis of a *Streptomyces antibioticus* chromosomal region involved in oleandomycin biosynthesis, which encodes two glycosyltransferases responsible for glycosylation of the macrolactone ring. Mol. Gen. Genet. *259*, 299-308.

Omer, C. A., Lenstra, R., Litle, P. J., Dean, C., Tepperman, J. M., Leto, K. J., Romesser, J. A. und O'Keefe, D. P. (1990). Genes for two herbicide-inducible cytochromes P-450 from *Streptomyces griseolus*. J. Bacteriol. *172*, 3335-3345.

Omura, T. und Sato, R. (1964). The carbon monooxid-binding pigment of liver microsomes. J. Biol. Chem. *239*, 2370-2378.

Omura, T. und Sato, R. (1961). A new cytochrome in rat liver microsomes. J. Biol. Chem. *237*, 1375-1376.

Peczynska-Czoch, W. und Mordarski, M. (1984). Biology of the Actinomycetes, M. Goodfellow, ed. (London: Acadamic Press).

Peterson, J. A. und Graham, S. E. (1998). A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. Structure *6*, 1079-1085.

Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D. und Sporn, M. B. (1981). Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? Nature *290*, 201-208.

Pfander, H. (1992). Meth. Enzymol., S. 3.

Pfander, H. und Semadeni, P. A. (1995). The synthesis of optically active enriched (+)-(6R)-α-ionone. Aust. J. Chem. *48*, 145-151.

Pridmore, R. D. (1987). New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. Gene *56*, 309-312.

Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A. und Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. Science *238*, 336-341.

Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasermann, C. A., Peterson, J. A. und Deisenhofer, J. (1993). Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. Science *261*, 731-736.

Rodriguez, A. M., Olano, C., Mendez, C., Hutchinson, C. R. und Salas, J. A. (1995). A cytochrome P450-like gene possibly involved in oleandomycin biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. FEMS Microbiol. Lett. *127*, 117-120.

Rüttimann, A. und Mayer, H. (1980). Synthese von optisch aktiven, natürlichen Carotinoiden und strukturell verwandten Naturprodukten. V. Synthese von (3*R*,3'*R*)-, (3*S*,3*S*')- und (3*R*,3'*S*, *meso*)-Zeaxanthin durch asymmetrische Hydroborierung. Ein neuer Zugang zu optisch aktiven Carotinoidbausteinen. Helv. Chim. Acta *63*, 1456-1462.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (NY: Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor).

Sandmann, G. (1994). Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. Eur. J. Biochem. *223*, 7-24.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *74*, 5463-5467.

Sariaslani, F. S. und Kunz, D. A. (1986). Induction of cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus* by soybean flour. Biochen. Biophys. Res. Commun. *141*, 405-410.

Scherr, O. (1997). Cyclodextrin-modifizierte Polysiloxan-Phasen für die Kapillar-Gaschromatographie. Institut für organische Chemie (Stuttgart: Universität Stuttgart).

Schmidt, T. G. M., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. J. Mol. Biol. *255*, 753-766.

Schmidt, T. G. M. und Skerra, A. (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of "Strep-tag" and immobilized recombinant core streptavidin. J. Chromatogr. A *676*, 337-345.

Scholz, T., Demharter, W., Hensel, R. und Kandler, O. (1987). *Bacillus pallidus* sp. nov., a new thermophilic species from sewage. System. Appl. Microbiol. *9*, 91-96.

Schwecke, T., Aparicio, J. F., Molnar, I., Konig, A., Khaw, L. E., Haydock, S. F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortes, J., Lester, J. B. et al. (1995). The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *92*, 7839-7843.

Shafifee, A. und Hutchinson, C. R. (1988). Purification and reconstitution of the electron transport components for 6-deoxyerythronolide B hydroxylase, a cytochrome P-450 enzyme of macrolide antibiotic (erythromycin) biosynthesis. J. Bacteriol. *170*, 1548-1553.

Sharp, P. A., Sugden, B. und Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide e-lectrophoresis. Biochemistry *12*, 3055-3063.

Shirahama, T., Fumurai, T. und Okanishi, M. (1981). A modified regeneration method for streptomycete protoplasts. Agric. Biol. Chem. *45*, 1271-1273.

Simon, R., Priefer, U. und Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. Bio/Technology *1*, 748-791.

Skerra, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. Gene *151*, 131-135.

Sohal, R. S., Agarwal, S., Dubey, A. und Orr, W. C. (1993). Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *90*, 7255-7259.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. *98*, 503-517.

Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. Science *257*, 1220-1224.

Steven, D. M. (1948). Studies on animal Carotenoids. I. Carotenoids of the brown trout (Salmo trutta Linn.). J. Exp. Biol. *25*, 369.

Sutherland, J. B. (1986). Appl. Environm. Microbiol. *52*, 98-100.

Suzuki, Y., Kishigami, T., Inoue, K., Mizoguchi, Y., Eto, N., Takagi, M. und Abe, S. (1983). *Bacillus thermoglucosidasius* sp. nov., a new species of obligately thermophilic bacilli. System. Appl. Microbiol. *4*, 487-495.

Thompson, C. J., Kieser, T., Ward, J. M. und Hopwood, D. A. (1982). Physical analysis of antibiotic-resistance genes from *Streptomyces* and their use in vector construction. Gene *20*, 51-62.

Torrison, O. J., Hardy, R. W. und Shearer, K. D. (1989). Pigmentation of salmanoids - carotenoid deposition and deposition in salmanoids. Crit. Rev. Aquatic. Sci. *1*, 209.

Trower, M. K., Emptage, M. H. und Sariaslani, F. S. (1990). Purification and characterization of a 7Fe ferredoxin from *Streptomyces griseus*. Biochim. Biophys. Acta *1037*, 281-289.

Trower, M. K., Lenstra, R., Omer, C., Buchholz, S. E. und Sariaslani, F. S. (1992). Cloning, nucleotide sequence determination and expression of the genes encoding cytochrome P-450_{soy} (*soyC*) and $ferredoxin_{soy}$ (*soyB*) from *Streptomyces griseus*. Mol. Microbiol. *6*, 2125-2134.

Trower, M. K., Marshall, J. E., Doleman, M. S., Emptage, M. H. und Sariaslani, F. S. (1990). Primary structure of a 7Fe ferredoxin from *Streptomyces griseus*. Biochim. Biophys. Acta *1037*, 290-296.

Vieira, J. und Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene *19*, 259-268.

Watanabe, I., Nara, F. und Serizawa, N. (1995). Cloning, characterization and expression of the gene encoding cytochrome P-450sca-2 from *Streptomyces carbophilus* involved in production of pravastatin, a specific HMG-CoA reductase inhibitor. Gene *163*, 81-85.

Weber, J. M., Leung, J. O., Swanson, S. J., Idler, K. B. und McAlpine, J. B. (1991). An erythromycin derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea*. Science *252*, 114-117.

Wright, F. und Bibb, M. J. (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. Gene *113*, 55-65.

Xue, Y., Wilson, D., Zha, L., Liu, H. und Sherman, D. H. (1998). Hydroxylation of macrolactones YC-17 and narbomycin is mediated by the *pik*C-encoded cytochrome P450 in *Streptomyces venezulae*. Chemistry and Biology *5*, 661-667.

Xue, Y., Zhao, L., Liu, H. W. und Sherman, D. H. (1998). A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *95*, 12111-12116.

Yamamoto, H., Maurer, K. H. und Hutchinson, C. R. (1986). Transformation of *Streptomyces erythraeus*. J. Antibiot. (Tokyo) *39*, 1304-1313.

Yamazaki, Y., Hayashi, Y., Arita, M., Hieda, T. und Mikami, Y. (1988). Microbial conversion of α-ionone, α-methylionone, and α-isomethylionone. Appl. Environ. Microbiol. *54*, 2354-2360.

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

Zarilla, K. A. und Perry, J. J. (1987). *Bacillus thermoleovorans*, sp. nov., a species of obligately thermophilic hydrocarbon utilizing endospore-forming bacteria. System. Appl. Microbiol. *9*, 258-264.

Lebenslauf

Name : Sabine Lutz-Wahl, geb. Wahl

Geburtsdatum : 21.10.1969

Geburtsort : Stuttgart

Familienstand : verheiratet

Staatsangehörigkeit : deutsch

Schulausbildung :

1976 - 1980	Rosenschule in Stuttgart
1980 - 1989	Ferdinand - Porsche - Gymnasium in Stuttgart Abschluß : Abitur

Hochschulstudium :

seit WS 1989	Chemiestudium an der TU Stuttgart
Nov 1992	Vordiplomprüfung
Juli 1995	Diplomprüfung:
Sep. 1995 – März 1996	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart unter Leitung von Prof. Dr. Rolf D. Schmid. Thema: „Produktion, Aufarbeitung, Reinigung und Kristallisation einer thermoalkalophilen Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus*.“
Seit Mai 1996:	Anfertigen der Dissertation am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart unter Leitung von Prof. Dr. Rolf D. Schmid. Thema: „Selektive Hydroxylierung von α- und β-Ionon durch Streptomyceten-Stämme und molkulargenetische Arbeiten zur Identifizierung und Isolierung der Ionon-Hydroxylase aus *Streptomyces fradiae* Tü 27.“