

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. T. Gudermann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die Funktion zweier Operator-Sequenzen in der Regulation der
3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase
von *Comamonas testosteroni***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Medizin**

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Stefanie Bernadette Markowetz aus Brüssel
Marburg/Lahn 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
07.09.06.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. E. Maser

Coreferent: Prof. Dr. J. Koolman

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
------------------------------------	------------

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
------------------------------------	----------

1 EINLEITUNG	1
---------------------------	----------

1.1	Steroide	1
1.1.1	<i>Allgemein.....</i>	1
1.1.2	<i>Stammgerüst und Nomenklatur</i>	1
1.1.3	<i>Vorkommen von Steroiden.....</i>	3
1.1.4	<i>Sterole.....</i>	4
1.1.5	<i>Gallensäuren</i>	4
1.1.6	<i>Vitamine</i>	5
1.1.7	<i>Steroidhormone</i>	5
1.1.8	<i>Steroid-Glykoside und andere natürliche Steroide.....</i>	6
1.1.9	<i>Flavonoide.....</i>	6
1.1.10	<i>Mineralisierung und Degradation von Steroiden.....</i>	7
1.2	Polzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH)	11
1.2.1	<i>Allgemein.....</i>	11
1.2.2	<i>Wirkung und Metabolisierung der PAH im menschlichen Organismus</i>	12
1.2.3	<i>Abbau der PAH</i>	12
1.3	Pseudomonas/Comamonas testosteroni.....	13
1.3.1	<i>Familie der Pseudomonaceae</i>	13
1.3.2	<i>Comamonas testosteroni</i>	14
1.3.3	<i>Transport von Steroiden in Comamonas testosteroni.....</i>	15
1.3.4	<i>Steroid-Induktion.....</i>	16
1.3.5	<i>3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase.....</i>	16
1.3.6	<i>Regulation der 3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase.....</i>	18
1.4	Aufgabenstellung.....	20

2 MATERIAL UND METHODEN	21
--------------------------------------	-----------

2.1	Material	21
2.1.1	<i>Chemikalien.....</i>	21
2.1.2	<i>Geräte.....</i>	22
2.1.3	<i>Enzyme und Kits</i>	22
2.1.4	<i>Restriktionsendonukleasen:.....</i>	22
2.1.5	<i>Verwendete Bakterienstämme und deren Kultivierung</i>	23
2.1.6	<i>Antikörper.....</i>	24
2.1.7	<i>Synthetische Oligonukleotide und Plasmide.....</i>	24
2.1.8	<i>Plasmide</i>	27
2.1.9	<i>Marker.....</i>	28
2.1.10	<i>Puffer, Medien und Lösungen.....</i>	29
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	<i>Analyse von Nukleinsäuren anhand von PCR</i>	30
2.2.2	<i>Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR.....</i>	31
2.2.3	<i>Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegel.....</i>	32
2.2.4	<i>Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	33
2.2.5	<i>Dephosphorilierung von 5'-Phosphat-Enden.....</i>	33
2.2.6	<i>Ligation</i>	34
2.2.7	<i>Herstellung dauerkompetenter E.coli-Zellen.....</i>	35
2.2.8	<i>Transformation.....</i>	35
2.2.9	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli.-Mini-Kulturen</i>	35
2.2.10	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus Midi-Kulturen.....</i>	36
2.2.11	<i>Protein-Isolierung</i>	37
2.2.12	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	37
2.2.13	<i>ELISA</i>	38

3	ERGEBNISSE	40
3.1	Herstellung der verschiedenen Plasmide und Darstellung mittels Gel-Elektrophorese.....	41
3.2	Änderung der Konformation der zwei Operatoren zueinander und Darstellung mittels ELISA	54
3.3	Abstandsänderungen der Operatoren und deren Auswirkung, dargestellt mittels ELISA.....	56
3.4	Die Auswirkungen einer Fis-Protein-Bindestelle auf die Expression von 3 α -HSD/CR	58
4	DISKUSSION	61
4.1	Relevanz und Nutzen von Comamonas testosteroni in Medizin und Umwelttechnik.....	62
4.2	Diskussion der Methodik.....	64
4.3	Diskussion zur Ausbildung einer Loop-Struktur.....	65
4.4	Diskussion der Ergebnisse des verifizierten Operator-Abstandes in Comamonas testosteroni... ..	68
4.5.	Diskussion der Konformationsänderung der Operatoren zueinander.....	70
4.6	Diskussion zur Bindung des Fis-Proteins.....	73
4.7	Genregulation in Bakterien im Allgemeinen.....	73
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	LITERATURVERZEICHNIS	79
7	ANHANG	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillinresistenz
Ap	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CPI	Chlorophorm/Phenol/Isoamylalkohol
<i>C.test.</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
hr	Stunde
3 α -HSD/CR	3 α -Hydroxysteroid- Dehydrogenase/Carbonylreduktase
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	milliampere
mV	millivolt
min	Minute
NAD(H)	(reduziertes) Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP(H)	(reduziertes) Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat
nm	Nanometer
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphat, NaCl-Puffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-chain-reaction

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen in der Minute
Tab	Tabelle
TAE	Tris/HCl, Acetat, EDTA-Puffer
TE	Tris/HCl, EDTA-Puffer
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit/Einheit
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gonan.....	2
Abb. 2: Cholesterin.....	2
Abb. 3: Der oxidative Abbau in <i>meta</i> - bzw. <i>ortho</i> -Stellung.....	8
Abb. 4: Mikrobieller Abbau des Sterangerüsts	9
Abb. 5: Struktur der 3 α -HSD/CR.....	17
Abb. 6: <i>Eco</i> RI-Fragment mit <i>hsdA</i> , OP1, OP2, <i>repA</i> und <i>repB</i>	18
Abb. 7: Modell der Regulation von <i>hsdA</i> Expression	19
Abb. 8: Schematische Abbildung der unterschiedlichen Plasmide.....	26
Abb. 9: Restriktionskarte von pK18 und pUC18/19	27
Abb. 10: Marker	28
Abb. 11: Elektrophorese mit PCR-Produkten und Marker.....	41
Abb. 12: Schematische Darstellung der Plasmide	43
Abb. 13: Elektrophorese von verschiedenen Plasmiden nach Transformation und Verdau.	45
Abb. 14: Gel-Elektrophorese der mit <i>pstI</i> verdauten Plasmide P42 mit vier verschiedenen Deletionen.	46
Abb. 15: Gel-Elektrophorese der mit <i>pstI</i> verdauten Plasmide P156 mit vier verschiedenen Deletionen.....	47
Abb. 16: Gel-Elektrophorese des mit <i>pstI</i> verdauten Plasmids P300 mit vier verschiedenen Deletionen.....	48
Abb. 17: Gel-Elektrophorese des mit <i>pstI</i> verdauten Plasmide P 500 mit vier verschiedenen Deletionen.....	49
Abb. 18: Gel-Elektrophorese des mit <i>pstI</i> verdauten Plasmids p990 mit vier verschiedenen Deletionen.....	50
Abb. 19: Gel-Elektrophorese des mit <i>pstI</i> verdauten Plasmids p6R1 mit vier verschiedenen Deletionen.....	51
Abb. 20: Gel-Elektrophorese des mit <i>pstI</i> verdauten Plasmids pAM mit vier verschiedenen Deletionen.....	52
Abb. 21: Gel-Elektrophorese des mit <i>pstI</i> verdauten Plasmids pAFM mit vier verschiedenen Deletionen.....	53
Abb. 22: Abbildung 22 zeigt die Expression von 3 α -HSD/CR bei den Plasmiden p42, p67, p156 und p1644 mit jeweils vier Deletionen, gemessen durch Elisa.....	54
Abb. 23: Abbildung 23 zeigt die Expression von 3 α -HSD/CR bei den Plasmiden p42, p300, p550, p990 und p1644 mit jeweils vier Deletionen, gemessen durch Elisa	55
Abb. 24: Die Plasmide mit der geringsten Menge an 3 α -HSD/CR.....	56
Abb. 25: Die Plasmide mit der höchsten Menge an 3 α -HSD/CR.....	57
Abb. 26: Darstellung der Plasmide p67, p6AFM und pAX1.....	58
Abb. 27: Einfluss des „Fis“-Proteins auf die Expression von 3 α -HSD/CR in <i>E.coli</i>	59
Abb. 28: Formen der Loop-Bildung verändert nach Semsey et al., 2002	66
Abb. 29: ELISA der 3 α -HSD/CR-Expression.....	69
Abb. 30: Schematische Darstellung der DNA-Rotation bei Deletionen von Nukleotiden	70
Abb. 31: Der Bindemechanismus von RepA an die zwei Operatoren.....	72

1 Einleitung

1.1 *Steroide*

1.1.1 Allgemein

Steroide sind natürlich vorkommende, organische Verbindungen, die sowohl in der Medizin, als auch in der Biologie von größter Bedeutung sind und als Reaktionen auf verschiedene neuroendokrine Impulse synthetisiert werden. Ihre Funktionen sind sehr vielfältig. Sie beeinflussen das Wachstum und die Entwicklung von Gewebe, sowie die Homöostase des Organismus.

Die Nebenniere z.B. sezerniert mehr als 30 verschiedene Steroide, vor allem Glukokortikoide und Mineralkortikoide. Viele Steroide sind fortpflanzungsrelevant, wie Androgene auf der männlichen, Östrogene und Progestine auf der weiblichen Seite. Vitamin D wird für die Knochenentwicklung gebraucht.

Daneben gibt es Hormone mit anderen Strukturen und weiteren physiologischen Aufgaben, die auf molekularer Ebene ähnlich wie die Steroidhormone funktionieren. Schilddrüsenhormone, iodierte Abwandlungen der Aminosäure Tyrosin, steuern im tierischen Stoffwechsel den Grundumsatz. Schilddrüsenhormone wie auch Steroide können zudem auch die Metamorphose bei Fröschen und Insekten beeinflussen.

1.1.2 Stammgerüst und Nomenklatur

Biochemisch werden die Steroide der Gruppe der zyklischen Isoprenoide zugeordnet, deren Gemeinsamkeit im Isopentenyl-Diphosphat liegt. Diese bilden den Grundbaustein für das leicht zyklisierte Triterpen, das Squalen. Aus dem Squalen entsteht nach Abspaltung der Seitenketten und Cyclisierung der Gonan. Dieser Gonan bzw. Perhydrocyclopentanophenantren, welcher den Grundbaustein aller Steroide bildet, ist ein tetrazyklischer, gesättigter Kohlenwasserstoff, der 17 Kohlenstoffatome enthält. In der Regel sitzen noch zwei Methylgruppen an C₁₀ und C₁₃ und eine Seitenkette an C₁₇.

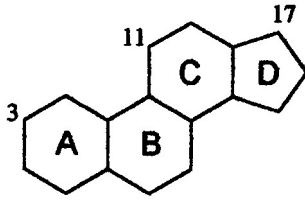


Abb. 1: Gonan

Dieser Gonan besteht, wie Abb. 1 zeigt, aus vier Ringen (A-D), welche untereinander entweder *cis*- oder *trans*- verknüpft sind. Die Ringe B und C, sowie die Ringe C und D sind in den meisten Steroiden *trans*-verknüpft, während die Verknüpfung zwischen den Ringen A und B sowohl *trans*- als auch *cis*- sein kann. Die verschiedenen Steroide mit ihren verschiedenen Funktionen unterscheiden sich in der Zahl von Doppelbindungen, Art, Zahl und Lage funktioneller Gruppen, sowie der Konfiguration α oder β zwischen Substituent und Kern, da das Grundgerüst sechs Asymmetriezentren besitzt. Sehr oft sind das C₃-Atom im Ring A, das C₁₁-Atom im Ring B und das C₁₇-Atom im Ring D substituiert. Der Steroidkern ist insgesamt planar und verleiht dem Molekül einen unpolaren Charakter. Biochemisch leiten sich alle Steroide vom Cholesterin ab.

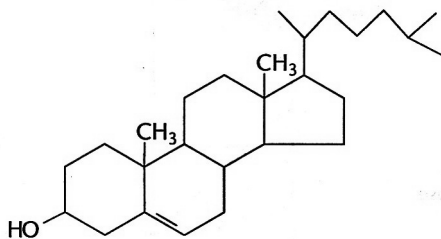


Abb. 2: Cholesterin

Das Cholesterin besteht aus insgesamt 27 C-Atomen (Abb. 2), die bei der Synthese durch Acetyl-CoA geliefert werden. Aus drei Acetyl-CoA entsteht β -HMG-CoA, welches durch β -HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonsäure reduziert wird. Die Aktivität dieser Reduktase ist das Schlüsselenzym in der Cholesterinsynthese, welches die Geschwindigkeit bestimmt. Die Mevalonsäure wird in 2 Schritten ATP-abhängig zu Mevalon-5-P-P phosphoryliert. Daraus entsteht durch Decarboxylierung und H₂O-Abspaltung Isopentenyl-P-P, das aktive Isopren. Aus sechs Isopreneinheiten entsteht

schließlich das Squalen, ein C₃₀-Molekül. Durch die Umlagerung einer Methylgruppe und Hydroxylierung am C₃-Atom entsteht zunächst Lanosterin. Dieses wird durch eine dreifache Demethylierung und die Umlagerung einer Doppelbindung in Cholesterin verwandelt.

Im menschlichen Körper erfolgt der Abbau und die Ausscheidung des Cholesterins hauptsächlich dadurch, dass Cholesterin in der Leber zu Gallensäure umgewandelt wird indem es an Taurin oder Glycerin gekoppelt wird. Im Ileum wird es dann rückresorbiert und der Leber im enterohepatischen Kreislauf wieder zugeführt. Nicht resorbiertes Cholesterin wird von den Darmbakterien zu Koprosterin reduziert und so als neutrales Steroid in den Faeces ausgeschieden, ohne jedoch das Sterangerüst dabei abzubauen.

1.1.3 Vorkommen von Steroiden

Aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Wirkungen sind Steroide und steroidähnliche Verbindungen in der Natur sehr weit verbreitet. Die stabile Struktur bedingt die lange Persistenz dieser Verbindungen in der Umwelt, was ihnen den Namen chemische bzw. molekulare Fossilien eingebracht hat. Daher finden Steroide auch Einsatz als molekulare Markerverbindungen (Mackenzie et al., 1982). Die Ausgangssubstanz für die Steroid-Biosynthese ist sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten das Squalen. Aus dem Squalen werden alle für die Entwicklung des Organismus erforderlichen Steroide synthetisiert. Eine Ausnahme bilden die Insekten, welche nicht in der Lage sind das Sterangerüst aktiv aufzubauen, sondern auf die Aufnahme pflanzlicher Steroide angewiesen sind, welche sie mit der Nahrung aufnehmen und ihren Bedürfnissen entsprechend anpassen (Heftmann, 1975). Die Steroide werden nach Funktion und Aufbau in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die wichtigsten Vertreter sind unter anderem die Sterole, Gallensäuren, Steroidhormone, Flavonoide und die Vitamine, welche im Folgenden näher beschrieben werden.

1.1.4 Sterole

Sterole sind in der Tier- und Pflanzenwelt weit verbreitet. Das wichtigste Sterin der Vertebraten ist Cholesterol bzw. Cholesterin. Der Körper eines erwachsenen Menschen enthält ca. 140 g Gesamtcholesterin, wovon der größte Teil im Gehirn und Knochenmark zu finden ist. Nur ca. 5 g befinden sich im Plasmakompartiment. Die Synthese des Cholesterins findet hauptsächlich in der Leber statt. Daneben spielen Darmmukosa, Nebennieren und Gonaden als Syntheseort eine wichtige Rolle. Cholesterin ist ein wichtiges Strukturelement von Gewebs- und Plasmalipoproteinen und ein sehr wichtiger Bestandteil biologischer Membranen, wo es der Stabilisierung amphiphiler Membranbestandteile dient. Zudem stellt Cholesterin die Vorstufe für eine ganze Reihe von Substanzen wie z.B. der Gallensäuren, der Steroidhormone und des Vit.D₃ dar. Eine weitere wichtige Rolle nimmt es in der Genese der Arteriosklerose und bei der Entstehung von Gallensteinen ein. Die Strukturformel des Cholesterins steht erst seit 1932 fest (Rosenheim und H.Wieland), die Totalsynthese gelang erstmals Robinson und R. B. Woodward, 1951.

Cholesterin zählt zu der Gruppe der Zoosterole, zu welcher auch unter anderem das von Darmbakterien synthetisierte Koprostanol gehört.

Eine weitere große Gruppe der Sterole sind die Phytosterole wie z.B. Stigmasterol und β -Sitosterol, welche die Sterole aus Pflanzen und Mikroorganismen sind. Die Sterole aus niederen Pflanzen wie Pilzen und Algen, z.B. Ergosterol, zählen zu den Mycosterinen. Dass Steroide in fast allen Mikroorganismen gefunden werden können ist schon seit langem bekannt (Carr et al.1970; Schubert et al., 1964).

Die Hopanoide, welche auch zu den Sterolen gezählt werden, wirken bei einer Vielzahl von gram-negativen und gram-positiven Bakterien membranstabilisierend und gelten als Vorgänger der Sterole in der Evolution (Ourisson et al., 1987; Kannenberg et al., 1996).

1.1.5 Gallensäuren

Gallensäuren sind der wichtigste Bestandteil der menschlichen Gallenflüssigkeit. Pro Tag werden etwa 4 g Gallensäuren erzeugt und in den Darm abgegeben. Aufgrund der amphiphilen Struktur (Detergentien) haben sie wesentlichen Anteil an der Verdauung von Fetten. Sie bilden vor allem mit Triglyceriden Micellen, an denen die von der wässrigen Phase wirkende Lipase besser angreifen kann. Sie helfen so bei der Verdauung von Fetten und erleichtern die Resorption vieler Arzneimittel. Die Synthese

der Gallensäuren erfolgt in der Leber aus Cholesterin, indem unter Abspaltung einer Copropylgruppe aus der Seitenkette dort eine Carboxylgruppe entsteht. In Ring B wird die Doppelbindung hydriert, die Hydroxylgruppe an C₃ epimerisiert und zusätzlich werden weitere Hydroxylgruppen eingeführt. Diese so entstandene Gallensäure (Cholsäure oder Chenodesoxycholsäure) wird auch als primäre Gallensäure bezeichnet. Die Ausscheidung der Gallensäure erfolgt als konjugierte Form mit Taurin (Taurocholsäure) oder Glycin (Glycocholsäure), wobei die stark sauren Tauroderivate häufiger sind. Nur bei einigen pflanzenfressenden Säugetieren überwiegen die Glykoderivate.

Die Gallensäuren unterliegen einem ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf und werden zu 90% im Ileum durch aktive Transportmechanismen rückresorbiert.

1.1.6 Vitamine

Auch in der Synthese von Vitamin D (Calciferol) spielen die Steroide eine wesentliche Rolle. Die beiden wichtigsten Vertreter der Gruppe sind Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol). Vitamin D₂ (Vit. D₂) leitet sich vom Provitamin Ergosterol ab, welches nur in Pflanzen synthetisiert werden kann. Vitamin D₃ (Vit. D₃) leitet sich vom Provitamin 7-Dehydro-Cholesterin ab und spielt daher für den Menschen eine größere Rolle. Sowohl Vit. D₂ als auch Vit. D₃ entstehen durch eine Spaltung des Ringes B des Sterangerüsts. Vitamin D fördert den Einbau von Calcium und Phosphat in den Knochen und die Resorption von Calcium und Phosphat im Darm. Fischöle und Eigelb sind die besten Quellen für Vit. D₃, in geringeren Mengen findet es sich auch in Milchprodukten.

1.1.7 Steroidhormone

Steroidhormone sind für einen funktionierenden Stoffwechsel unabdingbar. Sie werden in verschiedenen Organen aus Cholesterin gebildet. In Säugern steuern Progesteron, Cortisol, Aldosteron, Testosteron, Estradiol und Calcitriol den Stoffwechsel, das Wachstum und die Reproduktion. Insekten, Spinnen und Krebse (Arthropoden) bilden Ecdysterioide, die als frühere Formen der Steroide angesehen werden. Das Häutungshormon Ecdyson ist dabei der wichtigste Vertreter. In Pflanzen sind eine

Reihe von Steroiden mit Hormoncharakter identifiziert worden, welche essentiell für Wachstum, Sprossung und Blüte sind. Diese Brassinosteroide und Curcubitacine sind bei Pflanzen weltweit verbreitet (Russell, 1996; Jianming et al., 1996). Daneben gibt es auch in Pflanzen Pregnane, Androstane und Estrogene (Deepak et al., 1989; Heftmann, 1975), welche für die pharmazeutische Industrie bei der Partialsynthese von Hormonpräparaten von großer Bedeutung sind (Kieslich, 1986).

1.1.8 Steroid-Glykoside und andere natürliche Steroide

Natürlich vorkommende Steroide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und haben insbesondere pharmakologische und toxikologische Bedeutung. Zu den wichtigsten Gruppen zählt man die Cardenolide (z.B. Strophanthin), die Saponine (z.B. Digitonin) sowie die Alkaloide (z.B. Solanin), die durch ihre insektizide und antibiotische Wirkung Schutz- und Abwehrmechanismen bilden (Karlson, 1983; Geuns, 1977; Tschesche und Wulff, 1965). Die Cardenolide zählen zu den bekanntesten und best erforschten natürlichen Glykosiden. Sie wirken in geringer Dosierung positiv inotrop, negativ dromo- und chronotrop. Ihre therapeutische Breite ist gering und in zu hoher Dosierung wirken sie sehr leicht toxisch. Glykoside kommen in Fingerhut-Arten vor (*Digitalis*), in afrikanischen *Strophantus*-Arten (*Apocynaceae*) oder im Oleander (*Nerium oleander*). Man findet sie in der Tierwelt als Wehrsekret bei verschiedenen Käferarten und in Hautdrüsen von Kröten.

Ebenfalls zum Schutz bildet der Pilz *Fusidium coccineum* das therapeutisch genutzte Steroidantibiotikum Fusidinsäure.

1.1.9 Flavonoide

Genaugenommen gehören Flavonoide nicht zu der Gruppe der Steroide, besitzen aber dennoch eine sehr steroid-ähnliche Struktur (Geuns, 1977). Sie sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet und werden von den Pflanzen synthetisiert und teilweise aktiv ausgeschieden. Es wird vermutet, dass es sich bei den Flavonoiden um essentielle Substanzen für die pflanzliche Entwicklung handelt. In der Tat konnten für die Flavonoide, analog der Steroidwirkungen, wichtige biologische Funktionen wie Kontrolle von Wachstumsvorgängen oder Schutz gegen Insektenbefall, Virus- und

Pilzinfektionen nachgewiesen werden. Außerdem spielen sie bei der Kommunikation von Pflanzen und Bakterien, z.B. bei der Symbiose von Leguminosen und Rhizobien, eine entscheidende Rolle als Botenstoffe (Redmont et al., 1986).

1.1.10 Mineralisierung und Degradation von Steroiden

Um das Kohlenstoffgerüst der Steroide aufzubrechen sind bestimmte Enzyme, welche nur in Prokaryonten und in einigen niederen Eukaryonten vorkommen, unabdingbar. In Vertebraten dagegen werden Konjugaten gebildet, welche die Wasserbindungsmöglichkeit erhöhen und somit die Ausscheidung über Galle oder Nieren vereinfachen. Die Enzyme, welche den Abbau des Kohlenstoffgerüsts katalysieren, sind notwendig um Transformationen am Sterangerüst und dessen Seitenketten herbeizuführen und sind daher für die pharmazeutische Industrie von großem Interesse (Vischer et Wettstein, 1958; Bartolini et al., 1997). Der komplette Abbau der Steroide gelingt aber nur sehr wenigen Bakterien (Talalay et al., 1952). Die bekanntesten und am weitesten untersuchten sind hier vor allem Bodenbakterien wie *Clostridien* und *Pseudomonaden*. Das bekannteste steroidabbauende Bakterium ist *Comamonas testosteroni*, welches zu der Familie der *Pseudomonaden* gehört. Es ist nicht nur in der Lage das sehr energiereiche Sterangerüst aufzubrechen, sondern kann es auch als Energie- und Kohlenstoffquelle für seinen eigenen Stoffwechsel nutzen (Uwajiima et al., 1978; MacDonald et al., 1979; Marcus et al., 1956). Die energiereichen Abbauprodukte sind ringfreie Carbonsäuren und CO₂, welche über eine Vielzahl, durch Enzyme katalysierte Schritte, herbeigeführt werden (Schubert, 1967).

Eine wichtige Rolle nehmen hierbei die Dioxygenasen ein, welche die oxidative Spaltung des Kohlenstoffringes katalysieren (Eltis et Bolin 1996; Harayama et Reki 1989). Die Dioxygenasen katalysieren den Einbau von zwei Sauerstoffatomen in das jeweilige Substrat und sind bei anabolen sowie katabolen Vorgängen von entscheidender Bedeutung. Bei der Spaltung von aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen zum Beispiel katalysieren sie die Ringdehydroxylierung und anschließende Ringspaltung. Diese Ringspaltung kann allerdings auf zwei unterschiedliche Weisen durchgeführt werden. Entweder in *ortho*-Stellung zu den Hydroxylgruppen, welche durch Häm-FeIII unabhängige, intradiole Dioxygenasen katalysiert werden, oder in *meta*-Stellung zu den Hydroxylgruppen, welche durch Häm-

FeIII unabhängige, extradiole Dioxygenasen (Harayama et al., 1992) katalysiert werden (Abb. 3).

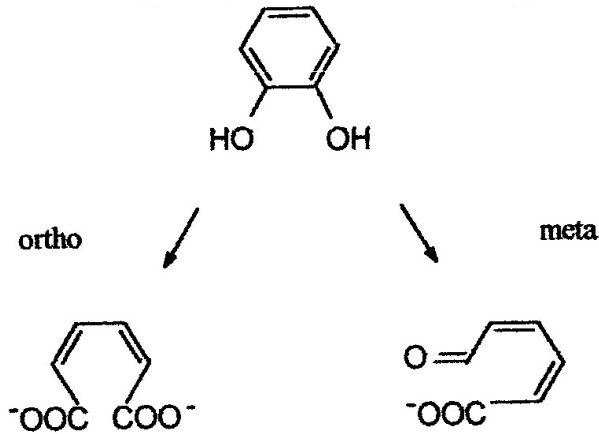


Abb. 3: Der oxidative Abbau in *meta*- bzw. *ortho*-Stellung

Seit vielen Jahren ist der mikrobielle Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen der Gegenstand intensiver Forschung und viele Enzyme und Regulationsmechanismen sind bis ins Detail erforscht worden. Der bakterielle Abbau von Steroiden dagegen ist nur in Grundzügen bekannt und weiterhin Inhalt aktueller Forschung. Aus dem bisherigen Nachweis bestimmter Enzyme und Abbauprodukte konnte ein Schema der Steroid-Degradation aufgestellt werden, welches in Abb. 4 dargestellt ist. Der Abbau des Sterangerüsts erfordert die Aromatisierung des A-Ringes (Levy et Talaly, 1959), um daraufhin die Öffnung des B-Ringes zu ermöglichen. Eine Voraussetzung dafür ist die Oxidation der 3-Hydroxygruppe am A-Ring. Diese Oxidation wird durch eine 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 α -HSD) katalysiert (Shikita et Talaly, 1979; Boyer et al., 1965).

Einleitung

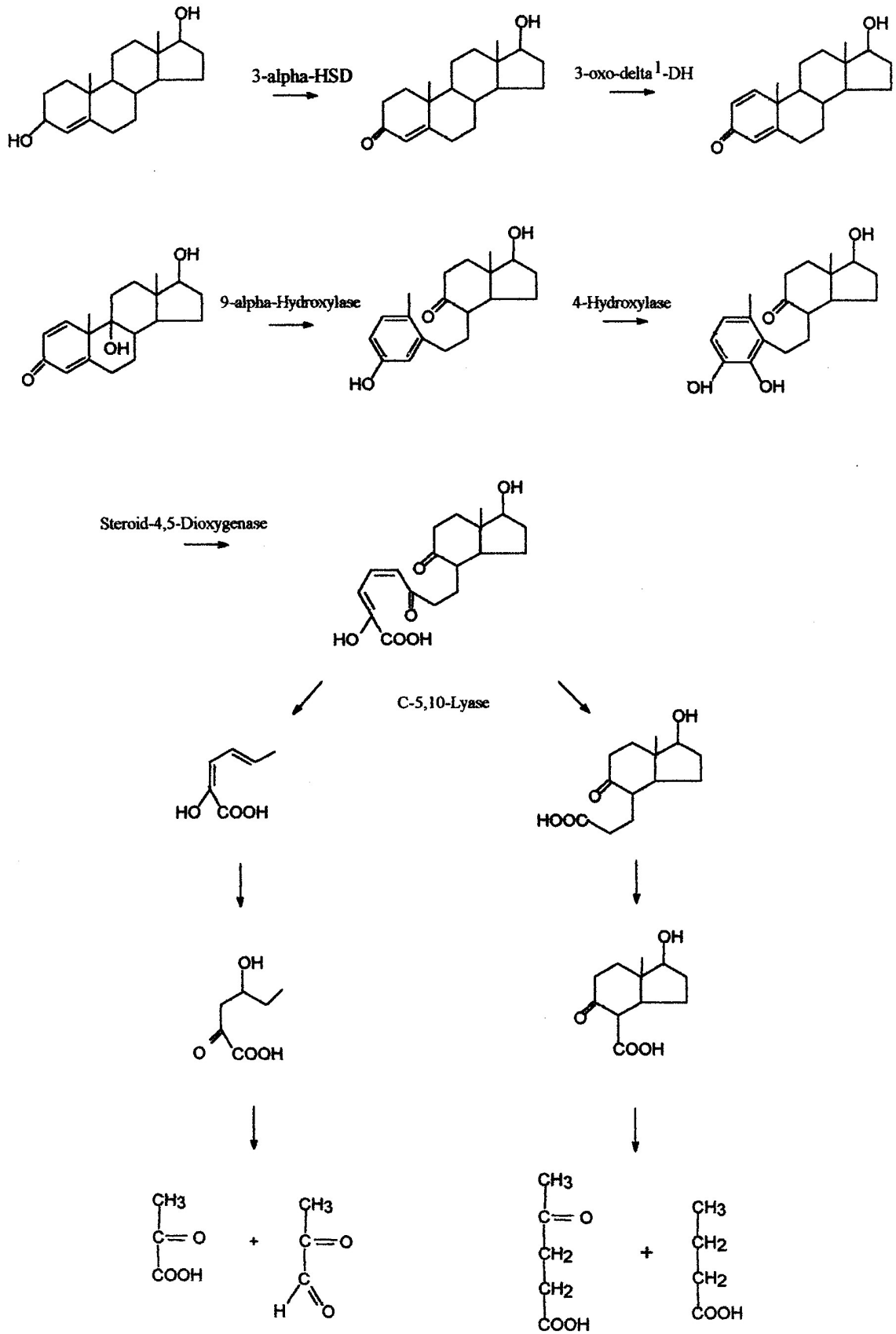


Abb. 4: Mikrobieller Abbau des Sterangerüsts

Im Weiteren wird durch eine 3-Oxosteroid- δ -Hydroxygenase (Drobnic et al., 1993; Molnar et al., 1995) eine zusätzliche Doppelbindung in Ring A integriert. Die anschließende Einführung einer Hydroxygruppe an Position C₉ des Steroidgerüsts durch eine 9 α -Hydroxylase mit spontaner Dienol-Phenol-Umlagerung führt zur Öffnung des B-Ringes und der Bildung der sogenannten Secosteroide (Leppik et al., Sinden, 1987; Wang et Sih, 1963).

Eine weitere Hydroxylierung am Ring A durch eine 4-Hydroxylase stellt die Grundlage für die Spaltung des A-Ringes durch eine Steroid- 4,5- Dioxygenase unter Bildung eines Diseco-Steroids dar (Leppik, 1989; Gibson et al., 1966). Die Reste des Ringes A werden schließlich durch eine C-5,10-Lyase abgetrennt (Coulter et Talaly, 1968). Falls das Ausgangssubstrat ein C₁₉-Steroidkörper ist entstehen zwei Spaltprodukte. Als Reste des A-Ringes entsteht das 2-Hydroxy-2,4-Dienoat, welches im weiteren Verlauf zu Brenztraubensäure und Propion-aldehyd umgewandelt wird und so im Citratzyklus zur Energiegewinnung verwendet werden kann. Die Spaltprodukte des Ringes B, C und D werden in verschiedenen Reaktionen zu Bernsteinsäure, Lävulinsäure und CO₂ metabolisiert. So entstehen insgesamt vier Moleküle CO₂, zwei C₃-Säuren, eine C₄- und eine C₅-Säure beim Abbau eines C₁₉-Sterangerüsts.

1.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH)

1.2.1 Allgemein

Zu der Gruppe der PAH zählt man Naphthaline, Acenaphthylen, Acenaphten, Fluoren, Phenantren, Anthracen, Fluoranthen, Pyren und Benzanthracen. Sie alle sind aromatische Verbindungen mit zwei oder mehr aromatischen Ringen und stark hydrophoben Eigenschaften, sowie guter Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln.

Gebildet werden sie bei der Verbrennung organischen Materials und durch Kondensation von Huminsäure. Daher entstehen sie z.B. bei industriellen Pyrolyseprozessen, beim Grillen, beim Betrieb von Verbrennungsmotoren etc.

PAH können, außer nach oben genannten Entstehungsmechanismen, auch durch Mikroorganismen über den Isopren-Stoffwechselweg oder über Umlagerung, Alkylierung und Oxidation synthetisiert werden.

Eine besondere Stellung unter den PAH nehmen die polychlorierten polycyclischen Biphenyle (PCB) ein, da sie eine Halbwertszeit von mehreren Jahrzehnten besitzen und stark lipophil sind und sich somit stark in der Nahrungskette anreichern (Sawhney, 1986). Insgesamt sind PAH aber ubiquitär in der Umwelt vorzufinden und führen bei chronischer Zufuhr und gleichzeitigem mangelndem Abbau zu einer Anreicherung in der Umwelt, vor allem des Erdbodens.

Der menschliche Organismus ist in erster Linie am Arbeitsplatz durch Exposition mit Verbindungen wie Bitumen, Pech und vor allem Zigarettenrauch mit PAH belastet. Jedoch führt auch der häufige Genuss geräucherter Nahrungsmittel zu einer Anreicherung der PAH in fettreichem Gewebe und Membranen (Santodonato et al., 1997).

1.2.2 Wirkung und Metabolisierung der PAH im menschlichen Organismus

Die PAH werden vom menschlichen Organismus durch den Gastrointestinaltrakt, die Haut, die Körperoberfläche und durch die Atmungsorgane aufgenommen.

Die Metabolisierung erfolgt nach Induktion abbauender Enzyme in der Leber, durch Dioxygenasen und mischfunktionelle Oxygenasen, v.a. die Cytochrom P₄₅₀-abhängige mischfunktionelle Oxygenase. Die dabei entstehenden Stoffwechselprodukte werden entweder als Epoxide oder Phenole an Sulfate bzw. Glutathion gekoppelt, über Harn und Faeces ausgeschieden oder weiter metabolisiert. Bei diesem Abbauweg können daraus Dihydrodirole oder Diol-Expoide entstehen, welche eine stark mutagene und teilweise carcinogene Potenz aufweisen. Diese carcinogene Potenz ist bei Rauchern mitverantwortlich für die Entstehung des Bronchialkarzinoms. Auch akute Vergiftungserscheinungen sind in der Literatur beschrieben worden wie z.B. die sogenannte Yusho-Krankheit, welche epidemisch 1968 in Japan nach Ingestion von PCB verunreinigtem Reisöl aufgetreten ist. Die Vergiftungserscheinungen äußerten sich in unspezifischen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen und Schwindel. Aber auch Gewebeschäden in der Leber, Niere und Milz sind beschrieben worden, außerdem traten Hautveränderungen wie Hyperkeratosen und akneähnliche Veränderungen auf. Die infantile Form der Yusho-Krankheit wird als „cola-colored-babies-disease“ beschrieben (Rogan, 1982). Die Säuglinge fallen durch einen deutlich reduzierten Allgemeinzustand und Untergewicht auf und zeigen hyperplastische Zahnfleischveränderungen und teilweise abnorme Knochenverkalkungen im Schädelknochenbereich.

1.2.3 Abbau der PAH

Die PAH können auf zwei unterschiedlichen Wegen abgebaut werden. Einerseits können sie abiotisch durch Photolyse oder durch Reaktionen mit Radikalen wie z.B. NO, NO₂ oder NO₃ eliminiert werden. Hierbei kommt es nach Hinzufügen des Radikals an eine Doppelbindung in der Atmosphäre zu einer Sauerstoffaddition bzw. Eliminierungsreaktion.

Andererseits können die PAH biotisch durch Bakterien metabolisiert werden. Vor allem gram-negative Bakterien wie *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxell* und *Acetobacter* sind in diesem Zusammenhang zu nennen

(Furuwaka, 1994). Der Abbau erfolgt über mehrere Zwischenstufen, wobei als Endprodukte Pyruvat und Acetyl-CoA als Substrate des Zitronensäurezyklus entstehen.

1.3 *Pseudomonas/Comamonas testosteroni*

1.3.1 Familie der Pseudomonaceae

Der Genus *Comamonas* bildet gemeinsam mit den Genera *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella* und *Sphingomonas* die Familie der *Pseudomonaceae*. Keime dieser Gattungen sind gram-negativ, nichtsporenbildend und besitzen Stäbchenform, welche leicht gebogen sein kann. Die Größe variiert zwischen 0,5 bis 5,0 µm. *Pseudomonadaceae*, ausgenommen *Burkholderia mallei* sind beweglich, da sie eine oder mehrere polar angeordnete Geißeln besitzen. Sie sind obligate Aerobier, welche zur Abdeckung ihres Energiebedarfes Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor benötigen. Sie besitzen alle das Enzym Katalase. Weil sie Glukose nicht fermentativ, sondern nur oxidativ verwenden können, zählt man sie zu der Gruppe der Nonfermenter. Zurückzuführen ist dies auf das Fehlen verschiedener Enzyme, wie z.B. Glukose-Dehydrogenase (Wettermark et al., 1979). Aus diesem Grund wachsen sie vor allem gut auf Aminosäuren, Peptonen und anderen organischen Säuren (Holt et al., 1994).

Den Genus *Comamonas* zählt man zu der Beta-gruppe der Proteobakterien und ordnet ihn dort dem *Acidovorans*-Cluster der rRNA-Superfamilie III zu (Stackbrandt et al., 1988; Madigan et al., 1997). Dieser Cluster umfasst die Stämme *Comamonas Baltica*, *Comamonas acidovorans*, *Comamonas terrigena* und *Comamonas testosteroni*. Ihre Gemeinsamkeit liegt vor allem in dem chemoorganotrophen Stoffwechsel (Willems et al., 1992).

Die Stämme werden zwar als gering pathogen angesehen, es ist aber von Infektionen mit *Comamonas acidovorans* und *Comamonas terrigena* bei immunsupprimierten Patienten (AIDS, Lymphom, u.a.) berichtet worden (Sonnenwirth, 1970; Stonecipher et al., 1991). *Comamonas testosteroni* ist oft im Zusammenhang mit perforierter Appendizitis isoliert worden (Barbaro et al., 1987).

1.3.2 *Comamonas testosteroni*

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *Comamonas testosteroni* wurde erstmals 1956 von Talalay isoliert, welcher ihn allerdings als *Pseudomonas testosteroni* klassifizierte (Talalay et Marcus, 1956). Erst 1987 folgte die heute anerkannte Zuordnung zu der Gattung der *Comamonaden* (Tamaoka et al., 1987). *Comamonas testosteroni* wurde in erster Linie aus Wasser isoliert, konnte aber auch schon in diversen klinischen Materialien wie Intubationsbestecken, Kathetern, Faeces, Urin, Sputum, Eiter, Nieren und Blut nachgewiesen werden (Gilardi, 1985). Auch das Vorkommen im Magen-Darm-Trakt ist als gesichert anzusehen (Gilardi, 1985). Das Besondere was *Comamonas testosteroni* von den anderen *Comamonas* Stämmen unterscheidet, ist seine Fähigkeit Steroide wie Testosteron oder Progesteron als einzige Energiequelle zu nutzen und somit auf Nährmedien, welche ausschließlich einen dieser Stoffe enthalten, zu wachsen. Abgesehen von der Nutzung der Steroide als Kohlenstoffquelle können aber auch andere Stoffe wie z.B. polychlorierte Biphenyle und andere aromatische Kohlenwasserstoffe abgebaut und verwertet werden (Bergeron et al., 1994; Lochner et al., 1989).

Da *Comamonas testosteroni* als physiologischer Bestandteil der Darmflora angesehen werden kann, ist es interessant zu wissen ob oder inwieweit er in den intestinalen Stoffwechsel der oben genannten Substanzen eingreift. Mögliche Aufgaben wären der Abbau von Steroiden, welche verschiedene wichtige Signalfunktionen im Körper übernehmen, aber auch die Entgiftung verschiedener aromatischer Kohlenwasserstoffe, welche teratogene und kanzerogene Potenz besitzen können. Näher auf die Funktion dieser Stoffe wird in den Kapiteln Steroide und Polycyclische Kohlenwasserstoffe eingegangen.

1.3.3 Transport von Steroiden in *Comamonas testosteroni*

Damit Steroide im Inneren des Bakteriums metabolisiert werden können, müssen sie zuerst durch die Bakterienwand hindurch an ihren Wirkungsort gelangen. Die Wand gram-negativer Bakterien ist normalerweise zwar permeabel für lipophile Steroide, so dass diese durch die Wand in das Innere des Bakteriums diffundieren können, jedoch dauert die Diffusion relativ lange im Vergleich zu anderen biologischen Membranen. Eine Ausnahme bildet *Comamonas testosteroni*. Seine Zellmembran besitzt eine erhöhte Permeabilität für Steroide, so dass diese schneller in den periplasmatischen Raum des Bakteriums eindringen können (Plesiat et Nikaido, 1992).

Im periplasmatischen Raum erfolgt dann die Bindung der Steroide an spezifische Proteine, wobei allerdings nur C₁₉- und C₂₁-Steroide weiter transportiert und metabolisiert werden (Watanabe et Watanabe, 1974; Watanabe et Po, 1974).

Nachweislich existieren verschiedene Proteine und Systeme, die an dem Transport und der Metabolisierung der Steroide mitbeteiligt sind, wovon zwei Bindeproteine des periplasmatischen Raumes näher charakterisiert worden sind. Die Aufgabe dieser zwei Proteine ist die Bindung der Steroide im Zellinneren. Das Verhalten in Bezug auf die Ladung ist sehr ähnlich, deutliche Unterschiede zeigen sich jedoch bezüglich der Massen (30 bzw. 50 kDa) und ihrer Sedimentation (Thomas et al., 1989; Watanabe et al., 1979; Pousette et Carlström, 1984).

Für den Transport der derivatisierten Steroide besitzt *Comamonas testosteroni* spezifische Transportsysteme. Ein System, das für den Transport von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron aus dem periplasmatischen Raum in das Zellinnere verantwortlich ist, konnte bereits identifiziert werden. Intrazellulär konnte dabei Androstadien nachgewiesen werden (Watanabe et Po, 1974). Dies legt den Schluss nahe, dass 3 β -/17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, als membranassoziiert bereits beschrieben, ein Bestandteil des Transportkomplexes darstellt. Zumal lässt sich der Steroidtransport unter anderem durch Anti-3 β -/17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Antikörper hemmen (Lefebvre et al., 1979).

1.3.4 Steroid-Induktion

Interessanterweise wird die Maschinerie, die für die Verwertung des Steroidgerüsts notwendig ist, nicht kontinuierlich exprimiert, sondern ökonomischerweise nur in Gegenwart von Steroiden (Talalay et Wang, 1955; Wacker et al., 1965; Watanabe et al., 1973). Für alle Enzyme, Binde- und Transportproteine konnte eine steroidabhängige Induktion nachgewiesen werden.

Die Substratinduzierbarkeit dieses Stoffwechselweges ermöglicht somit *Comamonas testosteroni* nicht nur eine schnelle Adaptation an wechselnde Substratmengen, sondern bietet dem Bakterium auch eine Schutzfunktion gegen potentiell toxische Substanzen.

Es wurde gezeigt, dass durch eine Induktion mit dem vertebralen Steroidhormon Testosteron eine fünffach höhere Resistenz gegen das Steroidantibiotikum Fusidinsäure des Pilzes *Fusidium coccineum* erreicht werden konnte (Oppermann et al., 1996). Ebenso wurde die Carbonylreduktion xenobiotischer Verbindungen, als Konsequenz der erhöhten Expression der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase induziert. Als Induktoren wurden in *Comamonas testosteroni* vor allem Testosteron und Progesteron nachgewiesen (Oppermann, 1995).

1.3.5 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase

Seit der Pionierarbeit von Markus und Talalay ist es bekannt, dass 3 α -HSD eines der ersten Enzyme beim Abbau der Steroide ist und somit eine zentrale Rolle bei deren Abbau spielt (Markus et Talalay, 1956). Erstmals identifiziert wurde das Enzym bei dem Abbau von Dihydrokortison zu 3 α -Tetrahydrokortison (Tomkins et al., 1956). Nachgewiesen wurde es sowohl in *Clostridium perfringens* (Mac Donald et al., 1976), *Eubakterium lentum* (Mac Donald et al., 1979), *Pseudomonas putida* (Uwajima, Takayama et Terada, 1978) und *Comamonas testosteroni* (Opperman et Maser, 1996; Maser et al., 1992; Suzuki et al., 1993) als auch in Säugetierzellen (Cheng et al., 1991). Obwohl 3 α -HSD sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten gefunden werden kann, handelt es sich nicht um das exakt gleiche Enzym, sondern um ein Enzym unterschiedlicher Superfamilien. Die eukaryotische 3 α -HSD zählt zu der Aldo-Keto-Reduktase Superfamilie (Jez et al., 1997), während die prokaryotische 3 α -HSD zu der Superfamilie der Kurzkettigen-Dehydrogenasen/Reduktasen zählt (Persson et al., 1991; Jörnvall et al., 1995; Möbus et al., 1997). Das Enzym 3 α -HSD katalysiert bei einer

Vielzahl von C₁₉- bis C₂₇- Steroiden die Oxidoreduktion des Steroidgerüsts an Position 3, sowie die Carbonylreduktion von nichtsteroidalen xenobiotischen Aldehyden und Ketonen, was zu dem Namen 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase (3 α HSD/CR) geführt hat (Oppermann et Maser, 1996). Eine zunehmende Menge an 3 α -HSD/CR erhöht nicht nur die Resistenz von *Comamonas testosteroni* gegenüber antibiotischer Fusidinsäure, sondern steigert außerdem auch die Kapazität zum Abbau von Insektiziden (Oppermann et al., 1996).

Die 3 α -HSD/CR von *Comamonas testosteroni* besitzt eine Molekularmasse von 49.4 kDa und stellt sich, wie in Abb. 5 abgebildet, in einer Dimerstruktur dar, was durch eine Röntgenstruktur festgestellt werden konnte (Maser et al., 2001).

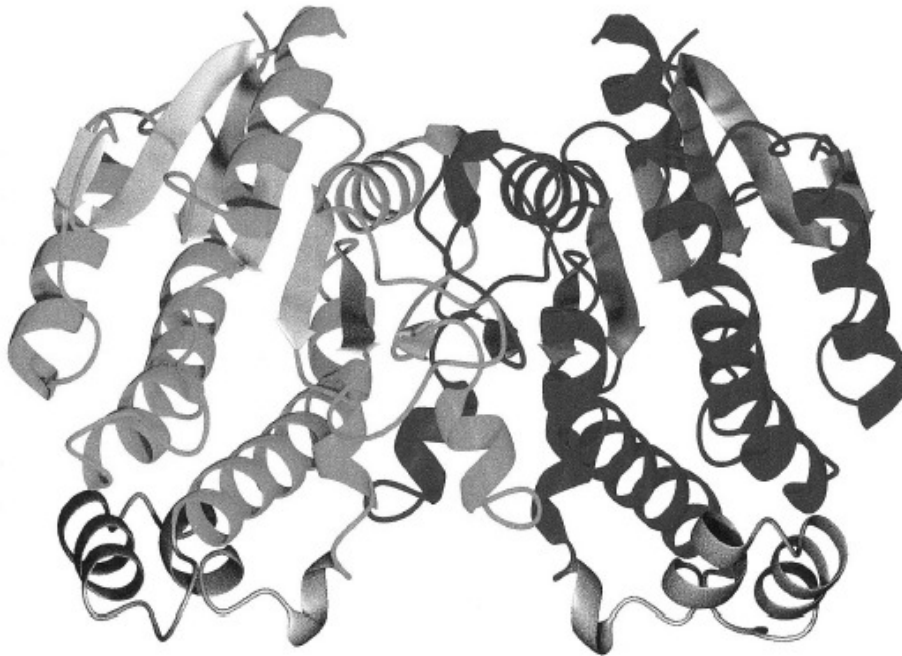


Abb. 5: Struktur der 3 α -HSD/CR

1.3.6 Regulation der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Carbonylreduktase

Das Protein 3 α -HSD/CR besteht aus 258 Aminosäuren, ist 26.4 kDa schwer und wird durch ein Gen (*hsdA*) kodiert. Das Gen ist 774 Basenpaare groß und auf einem 5.257 kb großen *EcoRI* DNA-Fragment von *Comamonas testosteroni* auf Position 3544-3921 (Möbus et Maser, 1998) zu finden. Die Expression unterliegt negativer Kontrolle durch zwei Repressorproteine, welche auf dem gleichen *EcoRI* Fragment kodiert werden wie das *hsdA* Gen (Maser et al., 2001). Beide Repressorgene, *repA* und *repB*, sind in die entgegengesetzte Richtung des *hsdA* Gens orientiert. *repA* liegt downstream von *hsdA*, während *repB* sich mit *hsdA* überschneidet, wie in Abb.6 zu sehen ist.

RepB, bestehend aus 78 Aminosäuren, besitzt eine Molekularmasse von 8.8 kDa und beeinflusst die Regulation von 3 α -HSD/CR auf Translationsebene, indem er an 3 α -HSD/CR mRNA bindet und diese somit blockiert. Sein Gen befindet sich auf Position 4.084-4.320 des *EcoRI* Fragments (Siehe Abb. 6).

RepA ist ein Protein, welches auf Transkriptionsebene tätig ist und dessen Gen auf dem *EcoRI* Fragment auf Position 2.065-3.328 lokalisiert ist (Siehe Abb. 6).

Er wirkt, indem er an zwei Operatoren bindet, welche je 10 bp groß sind (OP1 und OP2) und somit die Transkription von *hsdA* blockiert. Die zwei 10 bp großen palindrome Sequenzen sind upstream von *hsdA* bei 0.935 kb (TCAAAGCCCA) und 2.569 kb (TGGGCTTTGA), des *EcoRI* Fragmentes lokalisiert. Sie liegen somit 1.623 kb voneinander entfernt (Xiong et al., 2001) (Siehe Abb. 6).

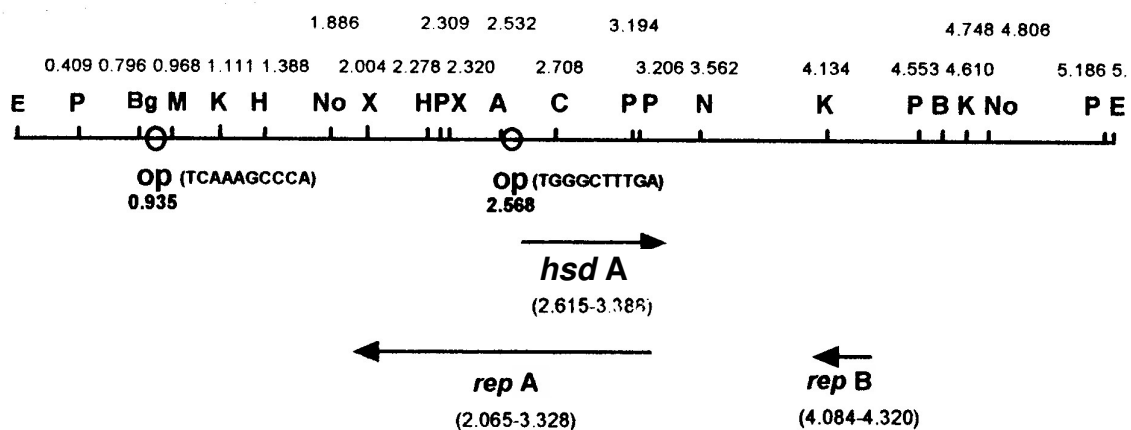


Abb. 6: *EcoRI*-Fragment mit *hsdA*, OP1, OP2, *repA* und *repB*

Das RepA Protein besitzt die Fähigkeit, beim Vorhandensein von Testosteron, mit diesem einen Komplex zu bilden, welcher demzufolge nicht in der Lage ist an die DNA von *Comamonas testosteroni* zu binden. Somit führt das Vorhandensein von Testosteron zu einer De-Repression, was wiederum zu einer zunehmenden Expression von 3 α -HSD/CR führt (Xiong et al., 2001)(Siehe Abb.7).

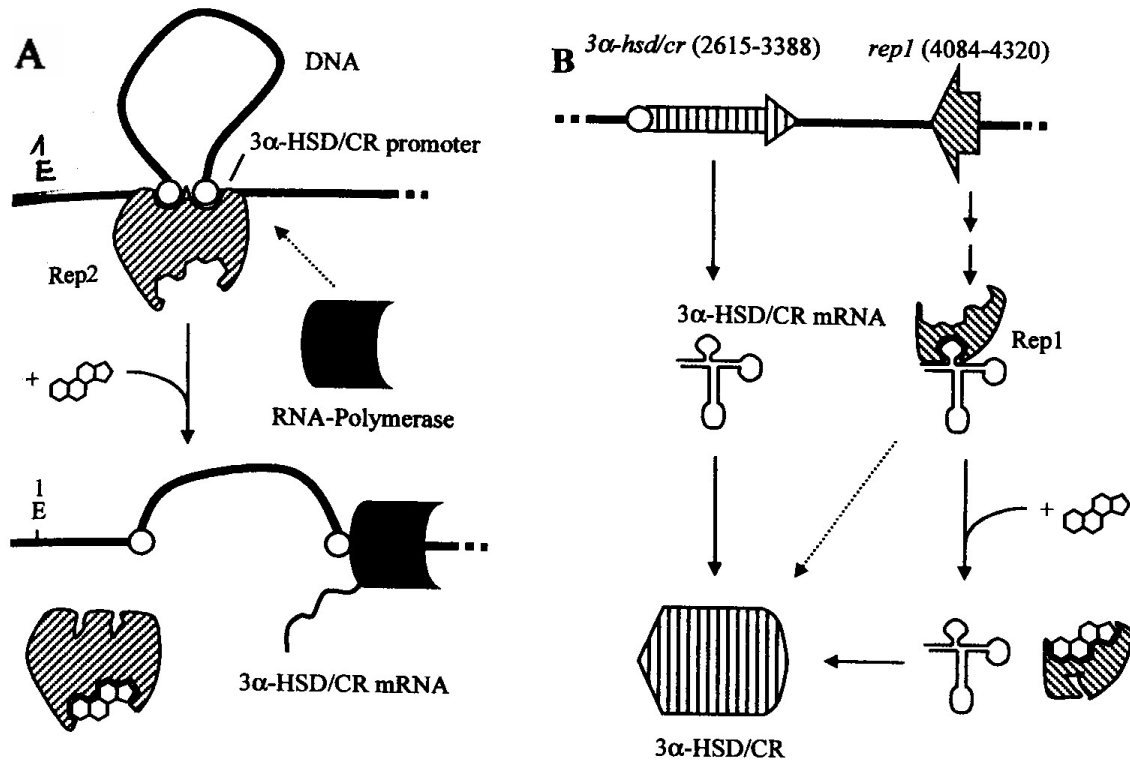


Abb. 7: Modell der Regulation von *hsdA* Expression

A) RepA bindet an die zwei palindrome DNA Sequenzen und blockiert somit den Startpunkt der Transkription durch die RNA-Polymerase. Bei Anwesenheit eines Steroides führt dies zu einer Komplexbildung, welche zu einer De-Repression führt.

B) RepB bindet an die 3 α -HSD/CR mRNA. Auch hier führt das Vorhandensein von Steroiden zu einer Hemmung der Repressorbindung an die mRNA. Das Ergebnis ist wieder eine De-Repression. (Xiong et al., 2001)

1.4 Aufgabenstellung

Schon seit langem beschäftigt sich die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser mit dem Bakterium *Comamonas testosteroni*, im speziellen mit der Genregulation der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase.

Nach erfolgreicher Lokalisierung des 3 α -HSD/CR-Gens (*hsdA*) konnte ein Repressor A (RepA) und ein Repressor B (RepB), sowie zwei Operatoren (OP1 und OP2) identifiziert werden.

Die Aufgabe meiner Doktorarbeit bestand darin, zu untersuchen, ob und wie die Distanz zwischen den zwei Operatoren Einfluss auf die Repression der 3 α -HSD/CR nimmt. Es schien ungewöhnlich, dass die zwei Operator-Sequenzen 1.623 nt auseinander liegen, da palindrome Bindungs-Motive normalerweise maximal 100 nt von einander entfernt sind (Müller-Hill, 1998).

Wir gingen davon aus, dass sich eine „Loop-Structure“ der DNA zwischen den zwei Operatoren bildet und sie so in die optimale Bindungsposition für RepA bringt und somit die Expression der 3 α -HSD/CR unterdrückt wird. Wir nahmen an, dass sowohl bei einem zu langen als auch zu kurzem Abstand die Möglichkeit einer „Loop-Structure“ nicht mehr gegeben sei und damit die Expression der 3 α -HSD/CR zunimmt.

Um dies herauszufinden benutzten wir transformierte *E.coli* Zellen mit Plasmiden, welche unterschiedliche Deletionen und somit unterschiedliche Distanzen zwischen den beiden Operatoren besaßen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand darin, die Konformation der Operatoren zueinander zu verifizieren um somit ihren Einfluss auf die Expression der 3 α -HSD/CR beurteilen zu können. Um den Einfluss der Rotation der DNA und der Konformation der Operatoren zu untersuchen, wurden bei den neu hergestellten Plasmiden noch zusätzlich -3, -5 und -7 nt Deletionen durchgeführt.

Ausserdem sollte der Einfluss einer Fis-Protein-Bindestelle (zwischen den zwei Operatoren) auf die Expression der 3 α -HSD/CR untersucht werden. Hierzu wurde ein Fis-bindendes DNA-Fragment in p42 kloniert und anschliessend wieder Deletionen von -3, -5, und -7 nt durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 Chemikalien

ABTS		Roche
Agar–Agar		Merck
Agarose		Amersham
Ampicillin		AppliChem, Darmstadt
BSA		Biolabs
Calciumchlorid	CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroform	CCl ₄	Merck, Darmstadt
Desoxynukleosidtriphosphat	dNTP	MBI, Fermentas, Heidelberg
DNA–Ladder 1 kb		MBI, Fermentas, Heidelberg
Ethanol	EtOH	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid		Fluka, Biochemiska Buchs
Ethylendiaminotetraessigsäure	EDTA	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	Baker, Holland
Kanamycin (Sulfate)		AGS GmbH, Heidelberg
Lysozym		Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	MBI, Fermentas, Heidelberg
Natriumchlorid	NaCl ₂	Merck, Darmstadt
Phenol		Roth, Karlsruhe
Polyoxythylensorbitanmonolauraz	Tween 20	Merck, Darmstadt
Rotiquant		Roth, Karlsruhe
Shrimp Alkaline Phosphatase	SAP	Amersham
SAP Puffer		Amersham
Taq–Polymerase		Biolab
Tris		Promega, USA
Acetat		Merck, Darmstadt
EDTA		Promega, USA

2.1.2 Geräte

Elektrophoresegerät	Bio-Rad. München
Elektrophoresekammern	Instituswerkstatt ,Marburg
ELISA-Messgerät	Bio-Rad. München
PCR-Thermocycler Hybaid HB-OV-BM	MWG - Biotech
Photometer DU-62	Beckmann, München
Schüttelinkubator Rosi 1000	Thermolyne,Smithfield, Australia
Thermomixer	Eppendorf
Thermomixer	B.Braun, Melsungen
Vortex-Gerät	Heidolph
Zentrifuge	Heraeus, Sepatech
Zentrifuge ,GPKR	Beckmann

2.1.3 Enzyme und Kits

Plasmid Midi Prep Kit, GenElute	Sigma
---------------------------------	-------

2.1.4 Restriktionsendonukleasen:

- <i>Pst</i> I: 5'-CTGCA'G-3' 3'-G'ACGTC-5'	Fermentas
- <i>Bam</i> H I: 5'-G'GATCC-3' 3'-CCTAG'G-5'	Biolabs
- <i>Hind</i> I : 5'-A'AGCTT-3' 3'-TTCGA'A-5'	Biolabs
- <i>Sma</i> I: 5'-CCC'GGG-3' 3'-GGG'CCC-5'	AGS/Gmbh

Material und Methoden

- <i>Avr</i> II:	5'-C'GTAGG-3' 3'-GGATC'C-5'	Biolabs
- <i>Bgl</i> I:	5'-GCCNNNN'NGGC-3' 3'-CGGN'NNNNCCG-5'	Biolabs
- <i>Eco</i> RI:	5'-G'AATTC-3' 3'-CTTAA'G-5'	Biolabs
- <i>Mlu</i> I:	5'-A'CGCGT-3' 3'-TGCGC'A-5'	Biolabs
- <i>Cla</i> I:	5'-AT'CGAT-3' 3'-TAGC'TA-5'	Biolabs

2.1.5 Verwendete Bakterienstämme und deren Kultivierung

Escherichia coli HB101 (Amersham, Pharmacia Biotech, Freiburg)

Dieser Stamm diente als Wirtsstamm für rekombinante pUC 18 Plasmide (Roche).

Kultivierung von *E. coli* HB101

Für die Anzucht wurde SIN Medium (SIN-Standard-Nährboullion, Firma Merck) verwendet, wobei jeweils 25 g pro Liter Wasser eingewogen wurden. Bei festen Nährböden für das Ausplattieren von Bakterien wurde zusätzlich vor dem Autoklavieren 15 g Agar zugefügt. Bei ampicillinresistenten Zellen wurde Ampicillin als konzentrierte Stammlösung in Wasser angesetzt und sterilisiert und anschließend bis zu einer Konzentration von 60-80 µg/ml zugesetzt. Bei kanamicinresistenten Zellen wurde Kanamicin bis zu einer Konzentration von ca. 50 µg/ml zugegeben.

***E. coli* Strang mit „Fis“-Protein-Bindestelle**

Dieser DNA-Strang enthält eine Bindestelle für das „Fis“-Protein (Faktor for inverse stimulation) und wurde uns freundlicherweise von G. Muskhelishvili überlassen

„knock-out“- Mutante des *E. coli* Strangs mit „Fis“-Protein-Bindestelle

Bei diesem *E. coli* Strang ist zwar die „Fis“-Protein-Bindestelle vorhanden, allerdings ist das Gen für die Expression von „Fis“ ausgeschaltet (knock-out). Auch dies ist uns freundlicherweise von G. Muskhelishvili überlassen worden.

2.1.6 Antikörper

Für immunologische Methoden wie z.B. ELISA wurden folgende Antikörper verwendet:

Anti-3α-HSD , aus Kaninchen	Herstellung: eigene Herstellung,
Anti-Kaninchen-Antikörper , aus Schweinen	Herstellung: DAKO, Denmark

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide und Plasmide

Oligonukleotide

p156 5'- TTC CCC TAG GGC CGC GGC CGC AGC – 3'

p300 5' - TTC CCC TAG GCA AGC AGG AGC TGG –3'

p500 5' - TTC CCC TAG GCT GGT CAA CCC CAG – 3'

p990 5'- TTC CCC TAG GCA GCC GCT TTG CGC TG – 3'

Die Oligonukleotide p156, p300, p500 und p990 wurden als Primer für die PCR-Amplifikation der p6-DNA eingesetzt, welche das Gen für die 3 α -HSD/CR besitzt

(Abb.8). Alle vier Primer enthielten die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Avr II* (fett unterlegt).

pLO 5′ - CAG CGG CCC CGC GCC –3′

Das Oligonukleotid pLO wurde in Kombination mit den oben genannten Oligonukleotiden eingesetzt für die Herstellung der verschiedenen Plasmide. Der Primer enthielt die Erkennungssequenz für die Schnittstelle *Mlu I* (fett unterlegt).

p42 5′ - CGC GAC GCG TTT GCA TGT AGC CTG G – 3′

pCla 5′ - CGC CAT CGC GTA TAT CG - 3′

Diese zwei Oligonukleotide wurden eingesetzt, um ein weiteres Plasmid durch Amplifikation der p6-DNA herzustellen. p42 enthält die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Mlu* (fett unterlegt).

Die so entstanden Plasmide sind schematisch in Abb.8 dargestellt. Die unterschiedlichen Oligonukleotide stehen kleingeschrieben als Nucleotidsequenzen an den Schnittstellen, welche mit A (*AvrII*), M (*MluI*), E (*EcoRI*), C (*ClaI*) gekennzeichnet sind. Die zwei Kreise (o) stehen für die beiden Operatoren OP1 und OP2. Die Verbindungslinie zwischen den Operatoren steht für die unterschiedlich langen Inserts. Die Pfeile stehen für die Gensequenzen der unterschiedlich kodierten Proteine und zeigen sowohl ihre Leserichtung als auch ihre Lokalisation auf der DNA an. *hsdA* kodiert für die 3 α -HSD/CR, *repA* für den Repressor A und *repB* für den Repressor B.

Material und Methoden

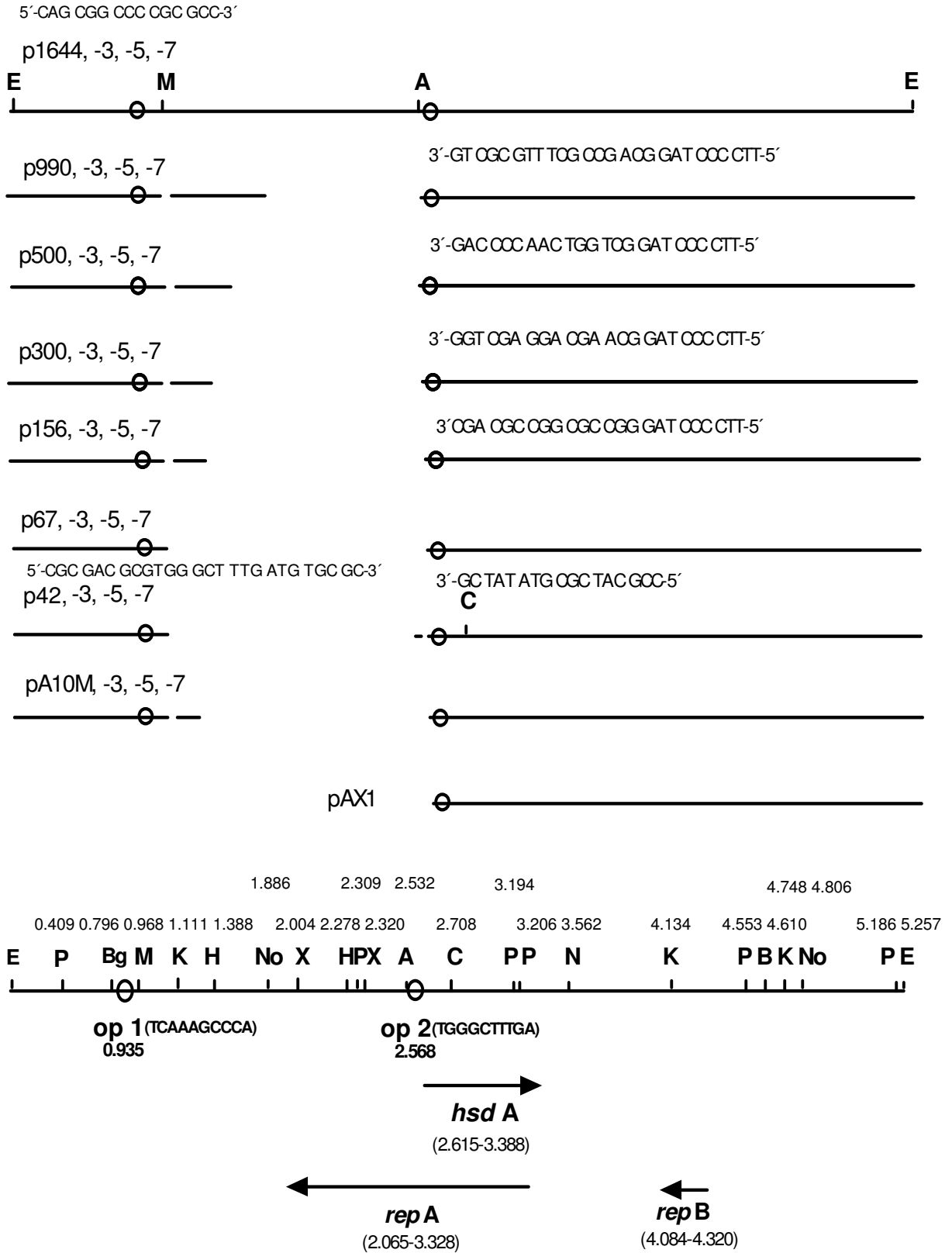


Abb. 8: Schematische Abbildung der unterschiedlichen Plasmide

2.1.8 Plasmide

Plasmide sind zirkuläre, extrachromosomale, autonome und selbstreplizierende DNA-Moleküle, die natürlicherweise in Bakterien und einigen anderen Organismen vorkommen. In veränderter Form werden Plasmide als Klonierungsvektor eingesetzt. Der pUC Vektor ist ein „high copy number“ Vektor für *E.coli*. Er ist 2.686 bp groß und besitzt eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin. Eine Restriktionskarte des Vektors ist in Abb. 9 dargestellt. Der pK18 Vektor (R.D. Pridmore 1987) enthält stattdessen eine Kanamycinresistenz und war ein Geschenk von Ciba-Geigy AG, Basel. Er besteht aus Teilen des pUC18 Vektors (bp 238-1565; Yanisch et al., 1985) und des pBRNeo-Vektors/1.33 kb (Dr.F.Asselberg). Eine Restriktionskarte von pK18 und pUC18/19 ist in Abb. 9 dargestellt.

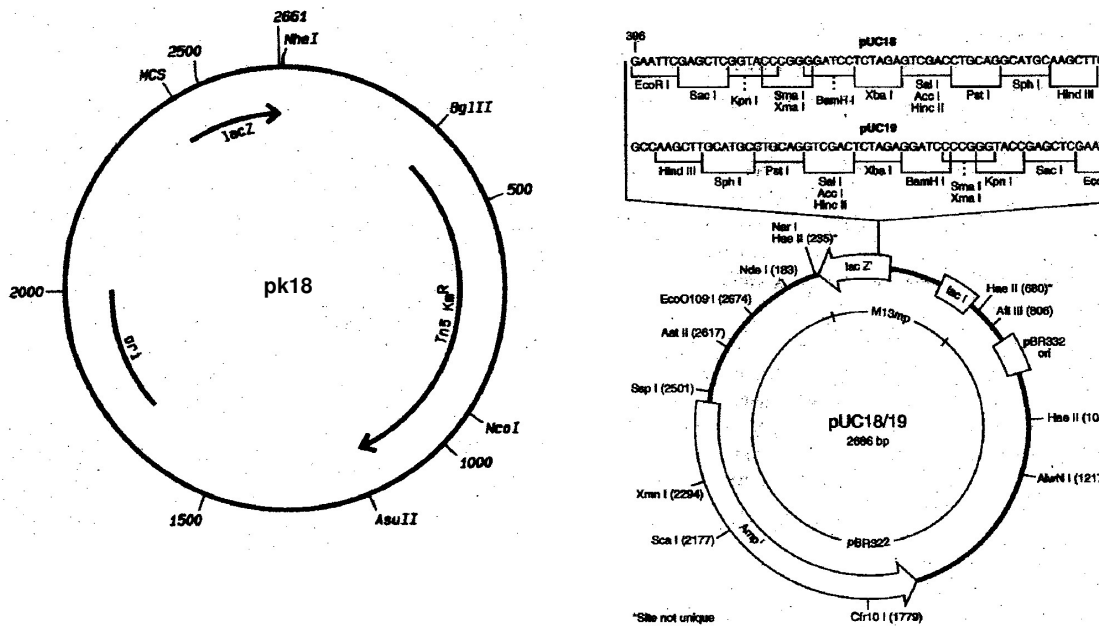


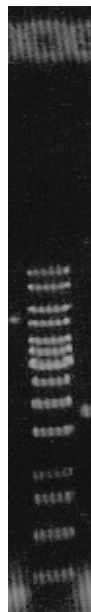
Abb. 9: Restriktionskarte von pK18 und pUC18/19

2.1.9 Marker

DNA-Ladder 1kb

MBI, Fermentas

Die DNA-Ladder dient als Größenstandart bei der Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gel-Elektrophorese und enthält 14 DNA-Fragmente, die eine annähernde Molekularmasse von 0.25 kb, 0.5 kb, 0.75 kb, 1.0 kb, 1.5 kb, 2.0 kb, 2.5 kb, 3.0 kb, 3.5 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 8 kb und 10 kb besitzen und in der folgenden Abbildung 10 dargestellt sind.



M

Abb. 10: Marker

Abb. 10 zeigt den Marker, aufgetragen auf einem Elektrophoresegel. Das kürzeste Fragment mit 0.25 kb ist am leichtesten und so mit am weitesten vom Auftragungsort entfernt, während das schwerste Fragment mit 10 kb am kürzesten vom Auftragungsort entfernt ist.

2.1.10 Puffer, Medien und Lösungen

Nährmedium für *E.coli* - Bakterienkulturen

SIN-Medium	Peptone	15.0 g
	Hefeextrakte	3.0 g
	Natriumchlorid	6.0 g
	D (+)-Glucose	1.0 g

Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNA

P1	50 mM	TrisCl
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNAse A
	pH 8.0	
P2	200 mM	NaOH
	1 %	SDS
P3	3.0 M	Kalium-Acetat
	pH 5.5	

Lösung zur Protein-Isolierung

PBS	8 g	NaCl
	1.44 g	Na ₂ HPO ₄
	0.24 g	KA ₂ PO ₄
	pH 7.4	l
TE-Puffer	100mM tris HCl (pH 7,4)	
	10mM EDTA (pH 8,0)	

Lösungen für Elektrophorese

TAE-Puffer	40 mM Tris/ Acetat, pH 8.0, 1mM EDTA
Ethidiumbromid	0.1 g EB / 100 ml H ₂ O

Lösungen für ELISA

Coating-Puffer (Na ₂ CO ₃)	Na ₂ CO ₃	8 g
	NaHCO ₃	2.93 g
	NaN ₃	0.2 g
	ph 9.6 in 1l	
Wasch-Puffer 10 x, ph 7.4	NaCl	80 g/l
	KH ₂ PO ₄	2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ (12H ₂ O)	29 g/l (15 g ohne H ₂ O)
	KCl	2 g/l
	Tween 20	5 ml/l

2.2 Methoden

2.2.1 Analyse von Nukleinsäuren anhand von PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Chain-Reaktion (PCR), lassen sich kleinste Mengen DNA innerhalb kurzer Zeit amplifizieren. Diese Methode ist dadurch gekennzeichnet, dass die DNA zyklisch denaturiert, mit Primern verbunden und mit DNA-Polymerase verlängert wird. Dadurch kann man eine DNA-Sequenz in kurzer Zeit mehr als 10⁶-mal vermehren.

Als erster Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA bei 95° C. Diesem folgt die Anlagerung („annealen“) von spezifischen, an den DNA-Bereich bindenden, Primern, bei niedriger Temperatur (40°C-60°C). Nach dem Binden der Primer findet die DNA-

Polymerisierung in Anwesenheit von Enzymen und Nukleotiden bei 72° C statt. Ist die Polymerisation am zu amplifizierenden DNA-Bereich abgeschlossen, findet eine erneute Denaturierung der neu entstandenen DNA-Doppelstränge bei 95° C statt. Somit liegen nun wieder Einzelstrang-DNA-Bereiche vor, an die sich mit Beginn des neuen Zyklus wieder die spezifischen Primer anlagern können und erneute Polymerisation erfolgen kann. Die PCR-Reaktion wurde in einem PCR-Thermocycler-Hybrid HB-OV-BM von MWG- Biotech durchgeführt.

2.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Standart-PCR-Ansatz zur Amplifikation und Identifizierung von DNA-Fragmenten:

Template-DNA	1 µl	(0.3 µl/ml)
Primer A	2 µl	(100 pmol)
Primer B	2 µl	(100 pmol)
dNTP	1 µl	(10 nmol, jeweils)
MgCl ₂	5 µl	(5 mM)
PCR-Puffer	5 µl	(10x)
Taq-Polymerase	1 µl	(1 U)
Aqua dest.	ad 50 µl auffüllen	

Die Reaktionsansätze wurden nach Zugabe aller Komponenten durch Schütteln gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend in den PCR-Cycler gestellt.

Es wurden folgende Programme durchlaufen:

	Programm 0		:Programm 1:
1.	95.0 °C, 3 min		95.0 °C, 3 min
2.	95.0 °C, 30 s	} x 25	95.0 °C, 30 s
3.	50.0 °C, 30 s		40.0 °C, 30 s
4.	72.0 °C, 30 s		72.0 °C, 1 min
5.	95.0 °C, 30 s		95.0 °C, 30 s
6.	50.0 °C, 30 s		40.0 °C, 30 s
7.	72.0 °C, 3 min		72.0 °C, 3 min
8.	4.0 °C, Pause		4.0 °C, Pause

2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegel

Wird ein DNA-Molekül mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten, so wird es in verschiedene Fragmente gespalten. Diese Fragmente lassen sich der Größe nach mit Hilfe der Gel-Elektrophorese auftrennen. Bei dieser Technik bringt man die gesplattene DNA an einem Ende eines Trärgels aus Polyacrylamid oder Agarose auf. Wird elektrischer Strom durch das Gel geschickt, wandert jedes Fragment mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichtes ist. Bei dieser Wanderung bilden sich mehrere Banden. Jede Bande entspricht einem Fragment von bestimmter Größe, die im Verlauf des Trärgels immer geringer wird. Die Länge eines bestimmten Fragmentes lässt sich durch die Eichung des Gels bestimmen. Dies geschieht, indem man parallel eine Kontrollsubstanz in einem Schlitz desselben Gels wandern lässt. Die Kontrollsubstanz besteht aus einer Mischung von Standard-Fragmenten bekannter Größe und wird oft als Marker bezeichnet. Die Wanderung der Markermoleküle definiert das Verhältnis zwischen Fragmentgröße und zurückgelegter Strecke für das betreffende Gel.

In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Fragmente verwendet man 0.7 % Gel für Fragmente bis zu einer Größe von 200 Basenpaaren. Für Fragmente kürzer als 200 Basenpaare verwendet man 2 % Agarosegel. Agaroselösungen der jeweiligen Konzentration werden in 1xTAE-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 60 °C ca. 0.5 cm in das Gelbett gegossen. Als Laufpuffer dient 1xTAE. Zum Beschweren der

Proben wird 1/10 Volumen Probenpuffer dazugegeben und zusammen mit dem Längenstandart aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt unter einer Spannung zwischen 70-150 mA. Um die Fragmente sichtbar zu machen wird das Gel 5 Minuten im 0.3 % Ethidiumbromidbad geschwenkt, danach 5 Minuten in H₂O. Da Ethidiumbromid mit der doppelsträngigen DNA interkaliert, werden im Gel aufgetrennte Banden im UV-Licht sichtbar.

2.2.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche die Fähigkeit besitzen, relativ kurze doppelsträngige DNA an einer bestimmten Stelle zu spalten. Jedes Restriktionsenzym hat ein bestimmtes Ziel im DNA-Doppelstrang, zumeist eine spezifische Sequenz von vier bis sechs Basen. Das Enzym schneidet die DNA immer dort, wo seine Erkennungssequenz auftritt. Unterschiedliche Restriktionsenzyme haben unterschiedliche Erkennungssequenzen und zahlreiche dieser Aktivitäten stehen heute, aus einer großen Vielzahl von Bakterien gewonnen, zur Verfügung.

Für die Reaktion wird die zu schneidende Menge an DNA (genomische DNA oder Vektor-DNA), die adäquate Enzymmenge, sowie 10-fach konzentrierter Reaktionspuffer eingesetzt. Der Reaktionsatz wird auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt und für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Meistens wird zu ca. 2 µg Probe, 5~10 U Enzym und 2 µl Puffer dazugegeben und dieser Ansatz dann mit 15 µl H₂O aufgefüllt.

2.2.5 Dephosphorilierung von 5'-Phosphat-Enden

Die Dephosphorilierung dient dazu, die Religation, der mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektormolekülen, zu verhindern. Zu diesem Zweck werden die 5'-Phosphatenden des geschnittenen Vektors durch die alkalische Phosphatase abgespalten. Durch die Dephosphorilierung der 5'-Phosphat-Enden ist eine Veresterung mit den freien 3'-Hydroxyl-Enden nicht mehr möglich.

Die mit Restriktionsenzymen geschnittene Vektor-DNA (0,2~1µg) wird mit 1U Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP) und 4 µl Alkalischer Phosphatase Puffer und 35 µl H₂O angesetzt. Anschließend wird das Gemisch zuerst 15 min bei 37° C, dann 5 min bei 65° C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt. Um die

DNA-Fragmente zu isolieren wird eine Ausfällung mit Phenol, Chloroform und Ethanol durchgeführt. Zu dem 200 µl Ansatz wird 150 µl Phenol zugegeben, gemischt und bei Zimmertemperatur 5 min inkubiert, anschließend bei 13,000 rpm 30 Sekunden zentrifugiert. Die Oberphase wird in einen neuen Eppendorf Cup abpipettiert und mit 150 µl Chloroform vermischt und bei 13,000 rpm wieder 30 Sekunden zentrifugiert. Die untere Phase wird verworfen, 150 µl Chloroform hinzugefügt und anschließend wieder zentrifugiert. Die untere Phase wird nun erneut verworfen und das verbliebene Volumen gemessen (theor. 200 µl) und das doppelte Volumen an 100 % Ethanol hinzugefügt. Nach dem Schütteln wird 10 min mit 13,000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Dann werden 500 µl 7 % Ethanol hinzugefügt, geschüttelt, 5 min bei 13,000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen und der Rest getrocknet. Anschließend werden 10 µl H₂O hinzugefügt.

2.2.6 Ligation

Die Ligation ist eine Methode, um aus einem Vektor und einem zu klonierendem DNA-Fragment ein rekombinantes DNA-Molekül zu konstruieren. Die Ligation von DNA-Fragmenten mit homologen Restriktionsenden erfolgt mit T4-DNA-Ligase. Der entsprechende Vektor und die Insert-DNA werden passend mit Restriktionsenzymen verdaut und nach Bedarf wurde die DNA dephosphoriert. Es erfolgt die Extraktion mit Phenol-Chloroform und die Fällung der DNA mittels Ethanol. Die Ligation erfolgt dann in entsprechenden Reaktionspuffern, wobei die Vektor-DNA im Verhältnis 1:1 oder 1:2 mit dem Insert-Vektor angesetzt wird. Für die Ligationsansätze werden 1 µl Insert und 1 µl Vektor mit 6 µl H₂O gemischt und anschließend 3 min auf 65° C erhitzt. Dann wird das Gemisch für 3 min auf Eis gelegt. Anschließend wird 1 µl (1U) T4-Ligase und 1 µl 10x Puffer hinzugegeben und dann mindestens 3, besser 5 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wird die Ligase 3 min bei 65° C inaktiviert und das Gemisch nochmals 3 min auf Eis gelegt.

2.2.7 Herstellung dauerkompetenter *E.coli*-Zellen

Bei der Herstellung von kompetenten *E.coli* Zellen wird 1 ml *E.coli* HB 101 Bakterien in 20 ml SIN-Medium für ca. 3 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Pellets (10 min/3.500 rpm) werden die Zellen in 15 ml 0.1 M CaCl aufgenommen, die Lösung wird anschliessend 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min/3.500 rpm) wird das Pellet in 5 ml 0.1 M CaCl resuspiert und 30 min auf Eis inkubiert.

2.2.8 Transformation

Bei der Transformation handelt es sich um eine Methode mit welcher zusätzliche DNA für neue Gene in Bakterienzellen eingeführt wird. Um die, in den Vektor klonierte, DNA zu amplifizieren, werden die Plasmide in kompetente Zellen transformiert.

100 µl der kompetenten Zellen wurde mit 1 µl des zu transformierenden Plasmids oder 10 µl der ligierten DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Bei dieser Inkubation lagert sich die Plasmid-DNA an die Außenseite der Zellen an. Durch einen Hitzeschock bei 42° C für 90 s wird die DNA durch die Zellmembran hindurch in die Bakterien aufgenommen. Nach erneuter Inkubation auf Eis für weitere 5 min folgt die Zugabe von 400 µl SIN-Medium. Der Ansatz wird 1 h bei 37° C/110 rpm inkubiert. Anschließend wird das Geschüttelte in ein Reagenzglas mit 3 ml SIN + Amp. gegeben und eine Nacht bei 37° C/180 rpm inkubiert. Wahlweise kann der Ansatz auch auf Agarplatten, welche vorher mit Antibiotika versetzt worden sind, ausgestrichen werden. Anschließend wird das Protein isoliert. (siehe Methode 4.5)

2.2.9 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Mini-Kulturen

(Birnboim and Doly, 1979)

Zur Kontrolle positiver Transformation im Anschluss an eine Klonierung (siehe Methode 4.2) dient die Mini-Präparation als schnelle Plasmidpräparationsmethode, die jedoch nur eine geringe Menge an DNA liefert.

Die über Nacht bei 37° C in 1 ml Medium gewachsene Kultur wird zur Hälfte in Eppendorfs gegeben und bei 13.000 rpm 30 s zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 50 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl P2-

Puffer und mehrmaligem vorsichtigen Schwenken erfolgt 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Durch diesen Schritt werden die Zellen aufgeschlossen. Durch die Zugabe von 50 µl P3-Puffer wird die Lösung wieder neutralisiert und bakterielle chromosomale DNA und Proteine ausgefällt. Es folgt eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für ca. 5 min. Der Überstand, welcher die DNA enthält, wird dekantiert und die Plasmid-DNA mit 350 µl 100% Ethanol präzipitiert, anschließend für 7 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes und Trocknens wird 10 µl TE-Puffer hinzugefügt und eine Elektrophorese durchgeführt um vorhandene DNA zu erkennen.

2.2.10 Präparation von Plasmid-DNA aus Midi-Kulturen

Durch die Midi-Präparation lässt sich besonders reine DNA in größeren Mengen herstellen, als bei der in 4.3 beschriebenen Methode. Das hierzu verwendete GenEluter Plasmid Midi-Prep Kit stammt von der Firma Sigma.

30 ml Medium + Ampicillin werden mit einigen µl einer Mini-Bakterien-Kultur beimpft und über Nacht bei 37° C/180 rpm im Schüttler inkubiert. Aus dem gesamten Volumen der Bakterienkultur werden die Zellen durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 3.500 rpm abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in 1.2 ml Resuspensionslösung resuspendiert und anschließend unter Zugabe von 1.2 ml Lysierungslösung aufgeschlossen. Nach 5 minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wird 1.6 ml Neutralisationslösung hinzugefügt, anschließend bei 4.500 rpm 15 min zentrifugiert und danach ca. 10 min auf Eis inkubiert. Dadurch wird sowohl die DNA als auch die Proteine sedimentiert. Der plasmidhaltige Überstand wird auf eine Siliconsäule gegeben. Die Matrix der Säule bindet die Plasmid DNA. Die Säule wird 5 min bei 4.000 rpm zentrifugiert und dann mit 2ml Waschlösung versetzt und bei 5.500 rpm 5 min zentrifugiert. Anschließend wird die Säule mit 3 ml der zweiten Waschlösung versetzt und weitere 5 min bei 5.500 rpm zentrifugiert. Die so in der Säule gereinigte Plasmid-DNA wird nun durch Zugabe von 1ml Eluierungslösung ausgelöst (bei 5.500 rpm/5 min).

2.2.11 Protein-Isolierung

Die über Nacht bei 37° C in 3 ml Medium+Ampicillin gewachsene Kultur wird bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 100 µl PBS wird das Sediment solange resuspendiert bis es vollständig vom Boden gelöst ist. Anschliessend wird 100 µl PBS, welche mit 2µl Lysozym versetzt worden ist, hinzugegeben und der Ansatz mit der Hand einige Male geschwenkt. Dieser Ansatz wird anfangs 30 min bei Zimmertemperatur, anschließend 30 min bei -20°C inkubiert. Diese Inkubation wird ca. 5-mal wiederholt und anschließend der Überstand 20 min abzentrifugieren (13.000 rpm) und in ein neues Eppendorf zu geben.

2.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung beruht darauf, dass ein Farbstoff die Proteine bindet und so das Extinktionsmaximum verschoben wird. Die Konzentration kann dann anhand einer Eichkurve errechnet werden.

a) Herstellung einer Eichkurve

Zur Erstellung einer Eichkurve werden verschiedene BSA-Konzentrationen unter den gleichen Bedingungen wie die zu bestimmende Proteinmenge gemessen. Es werden BSA (1 mg/ml) Mengen von 0, 5, 10, 15 und 20 µl verwendet und jeweils mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt.

b) Bestimmung der Konzentration der Proteinproben

2 µl des Protein Überstandes werden mit 18 µl H₂O vermischt um anschliesend 1 ml Roti-Quant/H₂O Gemisch (Verhältnis 1:4) hinzuzufügen. Nach 15-minütiger Inkubation wird die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen.

c) Konzentrationsausgleich der Proben auf 1 mg/ml verdünnt

Anhand der BSA Standardwerte wird die Steigung der Standardkurve ermittelt und diese mit dem Absorptionswert der Probe multipliziert. Von diesem Wert wird 1 subtrahiert und der so erhaltene Wert wird in PBS-Lösung bemessen und mit 100 µl Probe versetzt.

2.2.13 ELISA

Der ELISA (Enzym-linked immunosorbent assay) ist eine Methode um quantitativ die Menge an Protein oder Antigen zu messen, was mittels enzymmarkierter Sekundär-Antikörper geschieht. Zur Vorbereitung wird je 10 µl der zu bestimmenden Proteinkonzentration, welche vorher auf 1 mg/ml gebracht worden ist, mit 1 ml Coating Puffer (Na₂CO₃) (pH 9,4) in einem Eppendorf Gefäß verdünnt. Um 6 Standards zu bekommen, werden in 1 Eppendorf Cup 1.000 µl Coating Puffer (pH 9,4) und in 5 weitere je 500 µl Coating Puffer gegeben. 20 µl Standard 3α-HSD/CR werden zu den 1.000 µl hinzugefügt und anschließend 500 µl aus dieser Verdünnung abpipettiert und in ein Eppendorf mit 500 µl Coating Puffer gegeben. Nachdem der Ansatz gut durchgemischt worden ist werden wieder 500 µl abpipettiert und in das zweite Eppendorf mit 500 µl Coating Puffer gegeben. Das ganze wird in den verbliebenen 3 Eppendorfs mit je 500 µl Coating-Puffer fortgeführt, so dass am Ende 1.000 µl mit der höchsten Verdünnung im letzten verbleiben. Eine ELISA-Platte wird nun mit den Standards und Proben gefüllt, wobei jede Kavität mit je 200 µl gefüllt wird. Danach wird die gefüllte ELISA-Platte 30 min bei 37,0° C inkubiert. Dann werden die Kavitäten entleert und insgesamt 3-mal mit je 250 µl Waschpuffer (pH 7,4) gewaschen. Die Einwirkzeit des Waschpuffers sollte mind. 60 s betragen. Die Waschpufferreste der letzten Waschung sollten vollständig aus den Kavitäten entfernt werden. Hierzu wird die Platte mind. 3-mal kräftig, mit der Öffnung nach unten, auf einer saugfähigen Unterlage ausgeschlagen. Nun werden 200 µl 3α-HSD/CR-Antikörper 1.000fach verdünnt in die Kavitäten pipettiert und die Platten wieder eine halbe Stunde bei 37,0° C inkubiert. Danach wird die Platte wieder 3-mal gewaschen. Nun werden je 200 µl 1.000 fach verdünnte Antikörperimmunglobuline in die Kavitäten gefüllt und eine halbe Stunde bei 37,0° C inkubiert. Anschließend wird das ganze 4-mal gewaschen, wobei sehr darauf zu achten ist, dass der Waschpuffer vollständig entfernt wird. Nun wird in jede Kavität 100 µl ABTS-Lösung pipettiert

und 20 min bei 37,0° C inkubiert. Danach folgt die Messung der optischen Dichte aller Proben im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm (495 nm). Die Ergebnisse wertet man anhand einer Standardkurve aus, die man durch Auftragen der gemessenen optischen Dichte gegen die Standardwerte erhält.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte, wobei im ersten Teil erläutert wird, wie die verwendeten Inserts hergestellt wurden und wie deren Ligation in verschiedene Vektoren erfolgte, um anschliessend mittels Gel-Elektrophorese die erfolgte Transformation nachzuweisen. Die verschiedenen Inserts, welche durch PCR hergestellt wurden, hatten die Größe von 42 bp, 67 bp, 156 bp, 300 bp, 500 bp und 990 bp und wurden in jeweils 4 Vektoren eingebracht. Die Vektoren unterschieden sich lediglich in der Deletion von -7, -5, -3 oder -0 Basenpaaren. Dargestellt wird dieser Ergebnisteil mittels abfotografierter Elektrophoresegele.

Der zweite Abschnitt legt anhand von ELISA-Messungen dar, wie sich die unterschiedlichen Deletionen von -7, -5, -3, -0 und somit die Konformation der Operatoren zueinander auf die Expression von 3 α -HSD/CR auswirkt. Zur Darstellung dieses Ergebnisteils wurden Balkendiagramme gewählt, wobei auf der y-Achse die Menge an 3 α -HSD/CR und auf der x-Achse das jeweilige Plasmid aufgetragen ist.

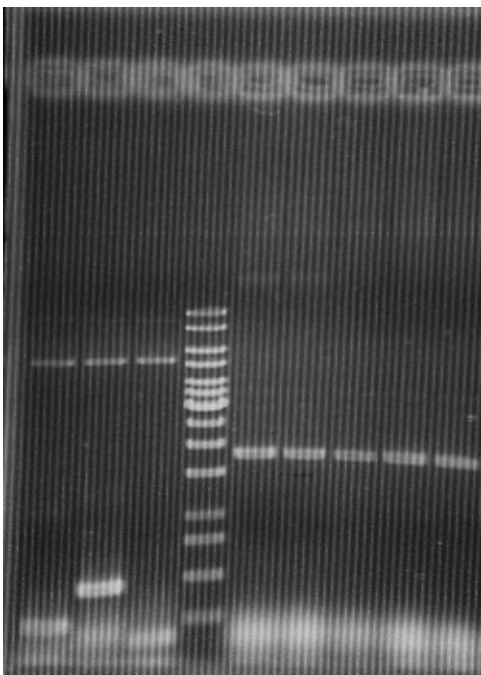
Im dritten Abschnitt wird die Auswirkung der unterschiedlichen Abstände der Operatoren (42 bp, 67 bp, 156 bp, 300 bp, 500 bp und 990 bp) zueinander auf die Expression von 3 α -HSD/CR untersucht. Auch hier wurden die Ergebnisse mittels ELISA-Messungen getroffen und anhand von Balkendiagrammen veranschaulicht.

Im vierten Teil wird beschrieben, wie sich das Vorhandensein einer bestimmten DNA-Sequenz, welche eine Bindungsstelle für ein „Fis- Protein“ enthält, auf die Expression der 3 α -HSD/CR in einerseits fis-positiven, andererseits fis-negativen Zellen auswirkt. Auch hier wurden zur Darstellung Balkendiagramme gewählt.

3.1 Herstellung der verschiedenen Plasmide und Darstellung mittels Gel-Elektrophorese

a) PCR

Nachdem schon in Vorarbeit zu meiner Doktorarbeit die zwei Operatoren an Stelle 935 und 2568 als Bestandteil eines *EcoRI* Fragmentes der *C. testosteroni*-DNA entdeckt worden waren, bestand meine Aufgabe zunächst darin, diesen Abstand von 1633 bp mittels PCR spezifisch zu amplifizieren und später wieder in den entsprechenden Vektor zu ligieren. Die Ergebnisse der PCR waren 42 bp, 67 bp, 156 bp, 300 bp, 500 bp und ein 990 bp große DNA-Moleküle. Das Auftragen der PCR-Produkte auf ein Agarosegel zusammen mit einem 10 kb Marker diente zur Kontrolle über den Erfolg der PCR und war damit eine essentielle Voraussetzung für eine erfolgreiche spätere Ligation. Als Beispiel sind in Abb. 11 PCR-Produkt 300, PCR-Produkt 500 und der 10 kb Marker nebeneinander aufgetragen.



1 2 3 M

Abb. 11: Elektrophorese mit PCR-Produkten und Marker

Spur 1= PCR-Produkt 300, Spur 2 = PCR-Produkt 500, M = Marker

a) Ligation

Die Integration des PCR-Produktes in den Vektor erfolgte erst nach Aufreinigung der DNA mittels Phenolextraktion und anschließendem Verdau mit *AvrII* und *MluI* in den Vektor p6R1, nachdem dieser mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut und danach dephosphoriliert worden ist. p6R1 wurde aus dem Grund als Vektor ausgewählt, dass das RepB Gen nicht mehr enthalten war und somit nur noch das Gen für RepA vorhanden war. Außerdem wurden bei dem Vektor zwischen den Schnittstellen *BglIII* und *MluI* Deletionen von -3, -5, und -7nt durchgeführt, was somit zu den entsprechenden Deletionen zwischen OP1 und *MluI* führte (siehe Abb. 12). Die dadurch entstandenen Plasmide p -0, p -3, p -5 und p -7 besaßen somit die Deletion von -0 nt, -3 nt, -5 nt und -7 nt zwischen den beiden Operatoren OP1 und OP2. So entstanden aus dem Vektor insgesamt vier verschiedene Plasmide. Die Inserts p42, p67, p156, p300, p500, p900, p1644 und pAFM wurden dann an den Schnitt-stellen *MluI* und *AvrI* in p -0, p -3, p -5 und p -7 subkloniert. Das Ergebnis waren 32 Mutanten welche in Abb. 12 schematisch dargestellt sind. Eine Überprüfung des Erfolges der angestrebten Ligation wurde kombiniert mit der Erfolgskontrolle der anschließenden Transformation.

Ergebnisse

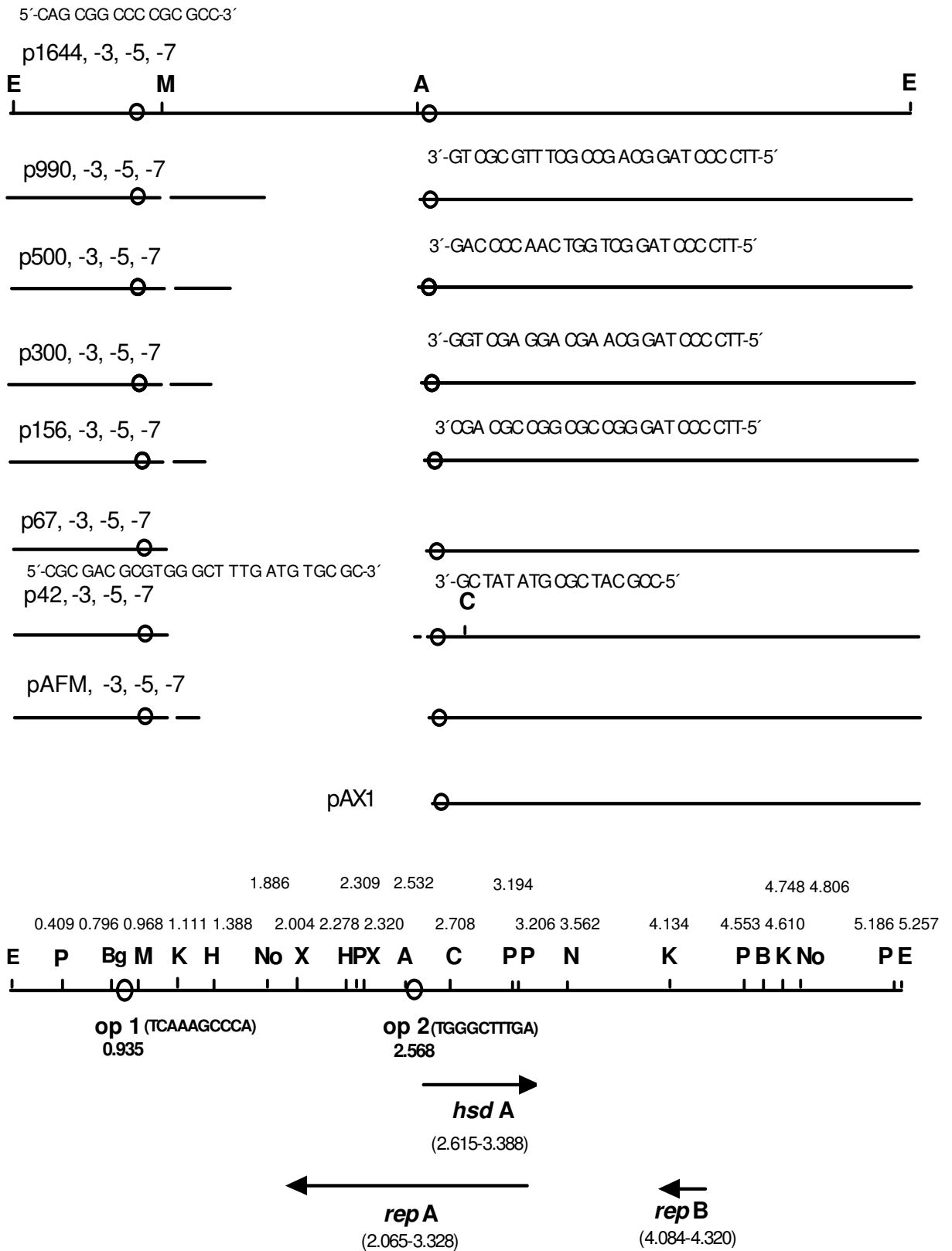


Abb. 12: Schematische Darstellung der Plasmide

Die Kreise stehen für die Operatoren, die Großbuchstaben für Schnittstellen (E = *Eo*RI, M = *Mlu*I, A = *Av*RI, Bg = *Bgl*I)

c) Transformation

Während jeder Transformation wurde nun der Vektor, welcher aus dem pUC18 Plasmid und dem *EcoRI*-Fragment der *C. testosteroni*-DNA bestand, in das Wirtsbakterium HB101, einem speziellen *E. coli* Stamm, mittels Hitzeschockverfahren eingeschleust. Vor der Transformation wurden die *E. coli* Zellen mit CaCl_2 kompetent gemacht. Durch das erfolgreiche Einbringen des Vektors in die HB101 Zellen verfügten die Bakterien nun über eine, durch das pUC18-Plasmid kodierte Resistenz gegen Ampicillin. Diese Tatsache konnte man sich bei der Selektion von Zellen, die den Vektor integriert hatten und solchen, die das nicht getan hatten, zu nutze machen. Die Zellen wurden daher nach der Transformation auf Agarplatten ausgestrichen, welche 80 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin enthielten. Am nächsten Tag wurden mit den Kolonien, die auf den Platten heranwuchsen, 1ml SIN-Medien plus Antibiotika angeimpft. Nach dem Heranwachsen der Kultur wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit *PstI* verdaut und abschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

Die erwarteten Banden orientierten sich an den für das erwähnte Enzym bekannten Schnittstellen im Plasmid. Entsprechend der Schnittstellen des Restriktionsenzymes ergaben sich folgende Bandengrößen beim Verdau von p6 mit *PstI* :

1. 2.756 bp
2. 1.896 bp
3. 1.348 bp
4. 886 bp
5. 632 bp
6. 409 bp

Die erwarteten Banden sind in Abb. 13 zu erkennen, wobei die durch den Pfeil markierten Banden diejenigen sind, die in ihrer Größe, bedingt durch die unterschiedlichen Inserts, variieren.

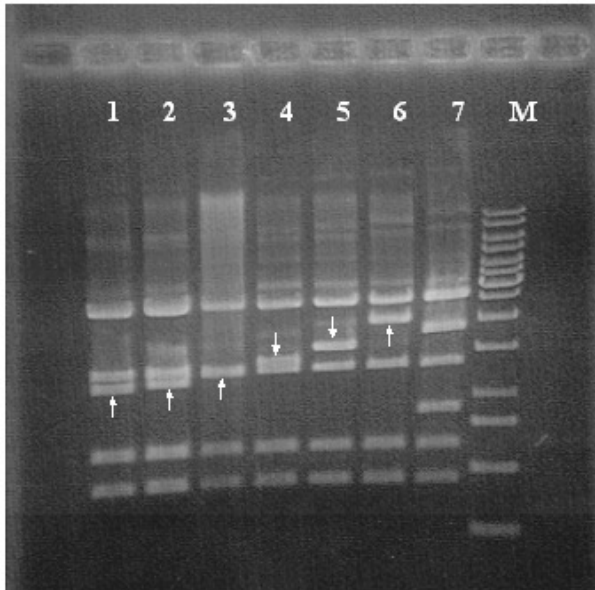


Abb. 13: Elektrophorese von verschiedenen Plasmiden nach Transformation und Verdau.

1= p42, 2= p67, 3=p156, 4=p300, 5= p500, 6= p990, 7= p6, M= Marker

Man kann auf der Abb. 13 deutlich erkennen, dass die Bande welche in der Gelelektrophorese eine unterschiedliche Position erreicht die zweit schwerste Bande (1.896 bp) von p6 ist. Bei dem kürzesten Plasmid (p42) legt sie den längsten Weg zurück, bei dem längsten Plasmid (p990) dagegen den kürzesten. Dies ist dadurch bedingt, dass der unterschiedliche Abstand zwischen den beiden Operatoren zu einer unterschiedlichen DNA-Länge und somit zu einem unterschiedlichen Molekulargewicht führt, was wiederum eine unterschiedliche Wandergeschwindigkeit verursacht und somit in unterschiedlichen Positionen der Bande resultiert. Bei p42 hat die verifizierte Bande ein Molekulargewicht zwischen 1.5 und 1.0 kb (10. und 11. Markerbande) und eine Länge zwischen 1.348 und 886 nt (3. und 4. Bande von p6). Bei p67, was nur geringfügig länger und schwerer ist als p42, liegt die Bande in dem gleichen Abschnitt. Bei p156 liegt die variable Bande ziemlich genau auf der dritten Bande von p6, was einer Länge von 1.348 nt gleichkommt, mit einem Gewicht zwischen ca. 1.5 und 1.0 kb. Bei p300 hat die Bande ein Gewicht von etwas weniger als 1.5 kb und hat die Länge von etwas über 1.348 nt. Bei p500 beträgt das Gewicht ca. 1,5 kb und die Länge liegt zwischen Bande zwei und drei von P6 und somit zwischen 1.348 und 1.896 nt. Bei dem

Ergebnisse

Plasmid p990 entspricht das Gewicht der Bande in etwa 2,0 kb und besitzt eine Länge zwischen 1.896 und 2.756 nt.

d) Darstellung der hergestellten Plasmide mittels Gel-Elektrophorese

Die folgenden Abbildungen zeigen die Plasmide p42, p67, p156, p300, p500 und p990 mit den jeweiligen Deletionen von -0, -3, -5 und -7 bp. Als Kontrolle wurde jeweils P6 oder p156 und ein Marker mit aufgetragen, um eine Richtgröße zu haben anhand derer die Richtigkeit des Plasmids erkannt werden konnte.

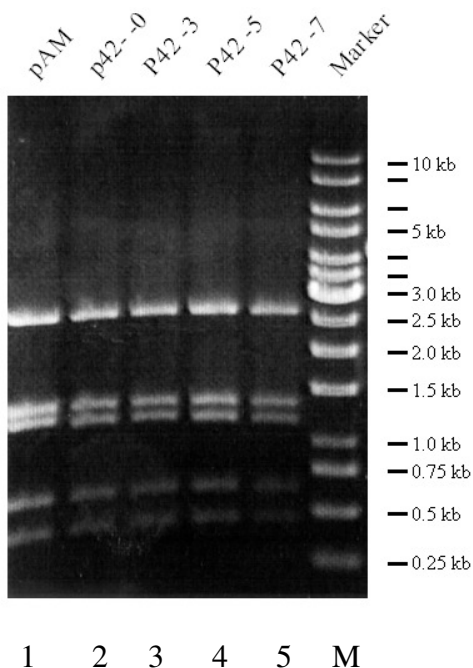


Abb. 14: Gel-Elektrophorese der mit *psfI* verdauten Plasmide P42 mit vier verschiedenen Deletionen.

Spur 1 = pAM, Spur 2 = p42 -0, Spur 3 = p42 -3, Spur 4 = p42 -5, Spur 5 = p42 -7, M = Marker

Auf diesem Gel erkennt man, dass die veränderte Bande, genau wie erwartet, bei allen vier Plasmiden (p42 -0, p42 -3, p42 -5 und p42 -7) ein Molekulargewicht zwischen 1.5 und 1.0 kb besitzt. Als Kontrolle wurde pAM verwendet, da die Länge zwischen den Operatoren auch 42 nt entspricht und somit das gleiche Molekulargewicht wie p42 besitzt.

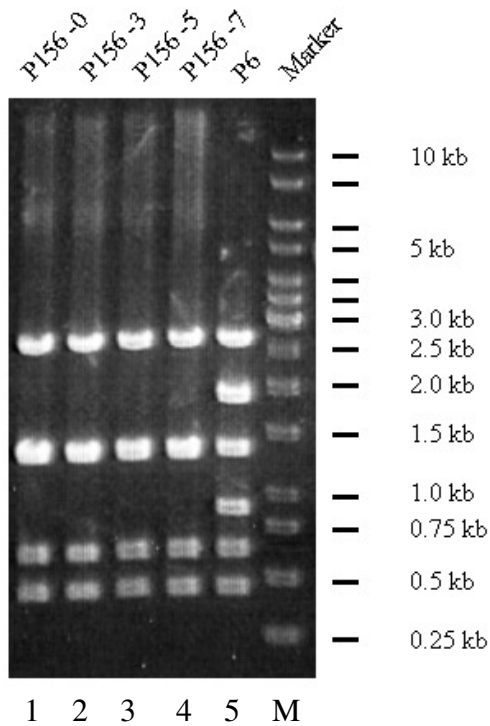


Abb. 15: Gel-Elektrophorese der mit *pstI* verdauten Plasmide P156 mit vier verschiedenen Deletionen.

Spur 1 = p156 -0, Spur 2 = p156 -3, Spur 3 = p156 -5, Spur 4 = p156 -7, Spur 5 = p6, M = Marker

Die veränderte Bande besitzt ein Molekulargewicht zwischen 1.5 und 1.0 kb und eine ungefähre Länge von 1.348 nt. Da alle vier Deletionen auf einer Höhe liegen, kann man davon ausgehen, dass bei allen die Ligation funktioniert hat.

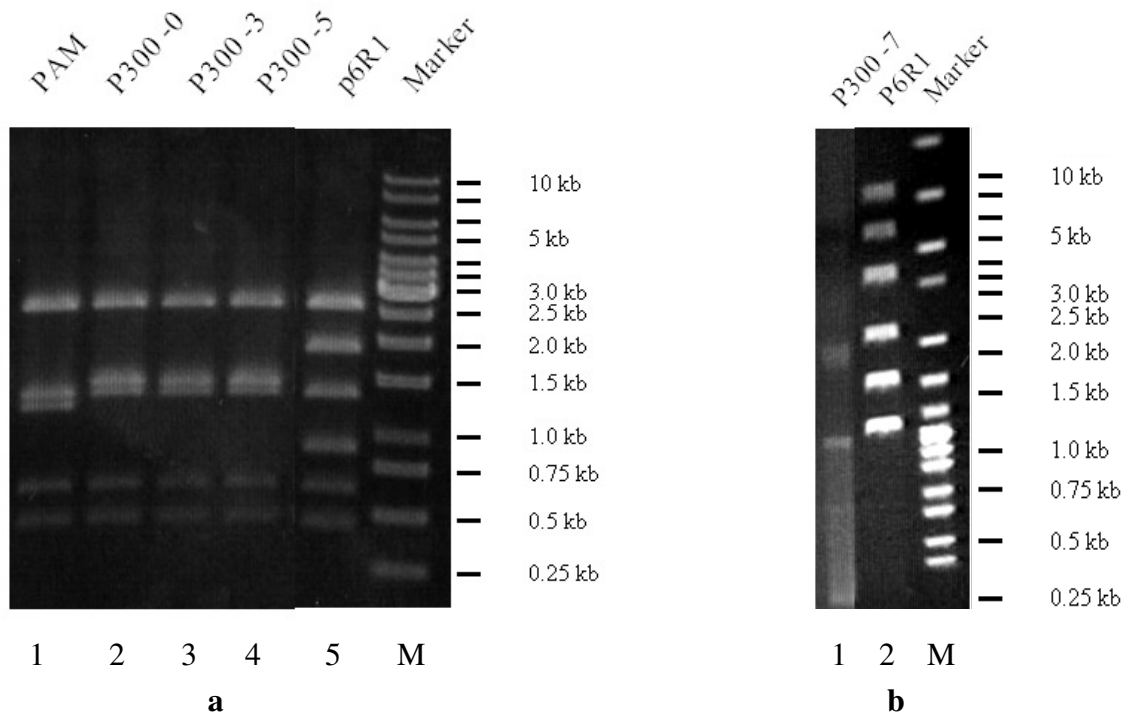


Abb. 16: Gel-Elektrophorese des mit *pstI* verdauten Plasmids P300 mit vier verschiedenen Deletionen.

Bild a) Spur 1 = pAM, Spur 2 = p300 -0, Spur 3 = p30 -3, Spur 4 = p300 -5, Spur 5 = p6R1, M = Marker Bild b) Spur 1 = p300 -7, Spur 2 = p6R1, M = Marker

Abb. 16 zeigt die Auftrennung des Plasmids p300. Das Gewicht der Veränderten Bande entspricht ungefähr 1.5 kb bzw. etwas weniger und die Länge liegt bei etwas mehr als 1.348 nt. Dies erkennt man daran. Dass die Bande in etwas auf der Höhe der dritten p6 Bande liegt und diese 1.348 nt groß ist. Auch hier liegen die vier unterschiedlichen Deletionen auf etwa einer Höhe.

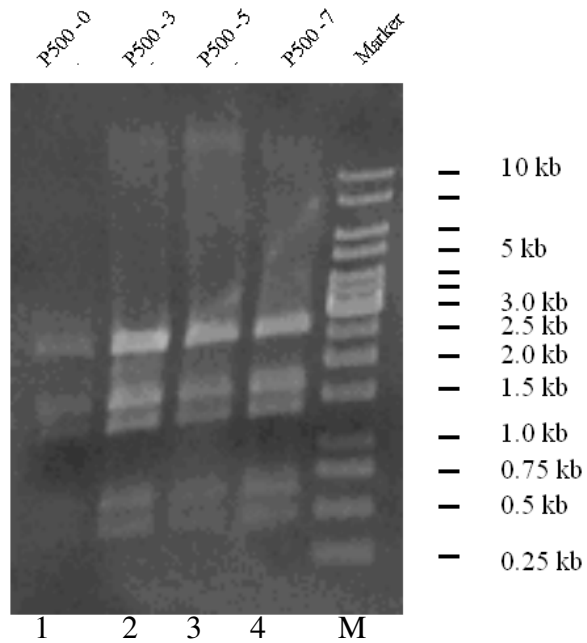


Abb. 17: Gel-Elektrophorese des mit *pstI* verdauten Plasmids P 500 mit vier verschiedenen Deletionen.

Spur 1 = p500 -0, Spur 2 = p500 -3, Spur 3 = p500 -5, Spur 4 = p500 -7, M = Marker

Auf Abb. 17 erkennt man die Auftrennung von p500 und seinen vier Deletionen. Auch hier zeigt sich das die Ligation erfolgreich war, da die Bande sich bei einem ungefähren Molekulargewicht von 1.5 kb liegt und auch hier die vier Deletionen keinen Unterschied aufweisen.

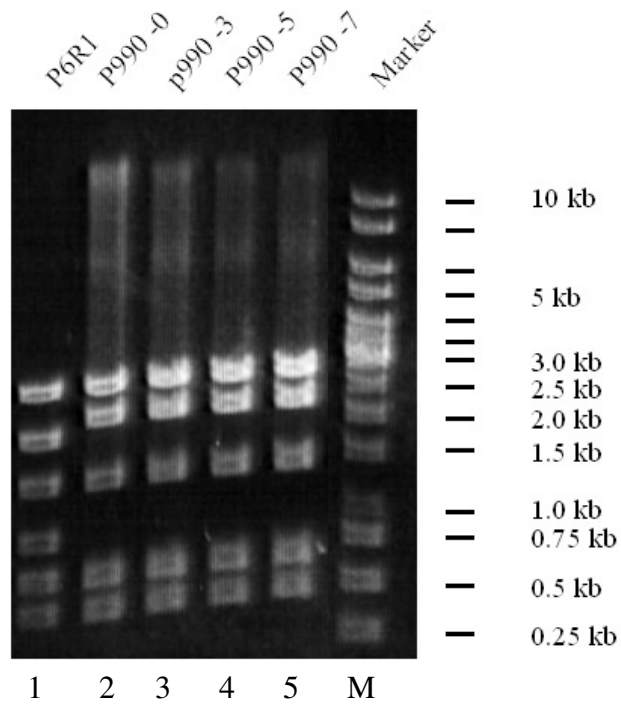


Abb. 18: Gel-Elektrophorese des mit *pstI* verdauten Plasmids p990 mit vier verschiedenen Deletionen.

Spur 1 = p6R1, Spur 2 = p990 -0, Spur 3 = p990 -3, Spur 4 = p990 -5, Spur 5 = p990 -7, M = Marker

Abb. 18 zeigt das verdaute Plasmid p990 mit seinen vier verschiedenen Deletionen. Da es das längste und somit schwerste Plasmid ist hat die veränderte Bande ein Molekulargewicht von etwas mehr als 2.0 kb. Die Länge liegt wie erwartet zwischen der ersten und zweiten Bande von p6 und somit zwischen 1.896 und 2.756 nt. Auch hier liegen die vier unterschiedlichen Plasmide auf etwa einer Höhe, was für eine erfolgreiche Ligation spricht.

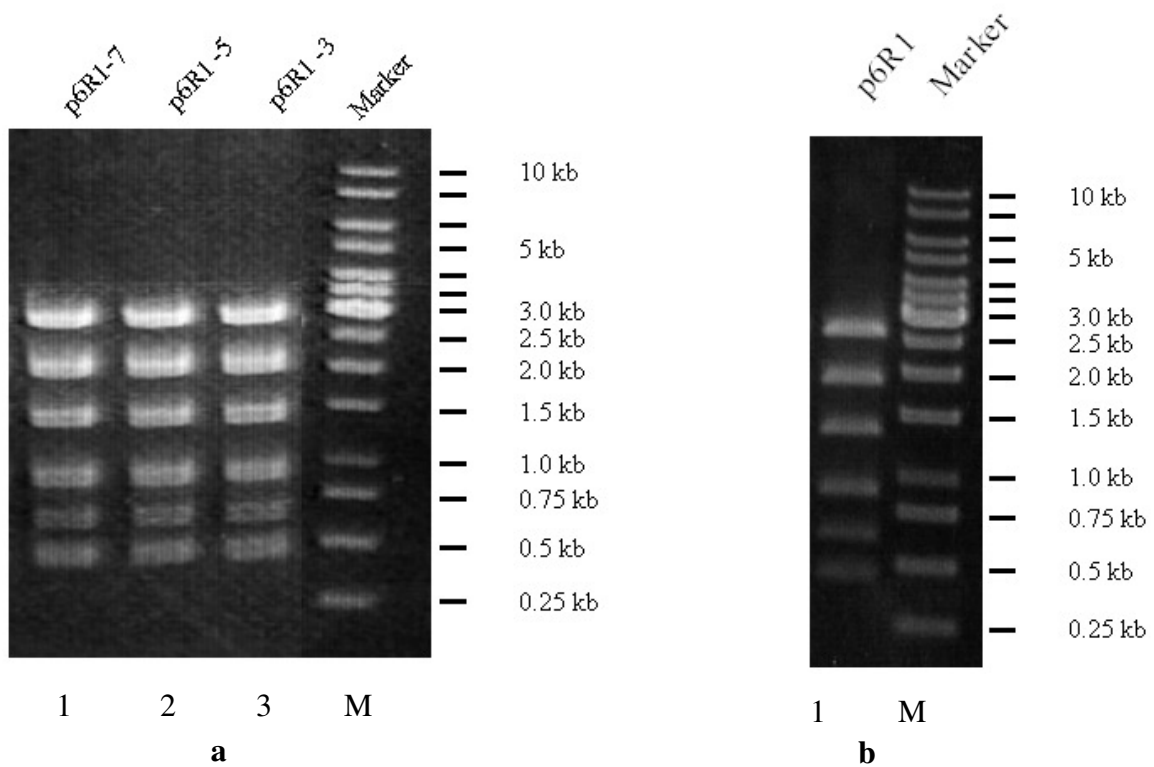


Abb. 19: Gel-Elektrophorese des mit *pstI* verdauten Plasmids p6R1 mit vier verschiedenen Deletionen.

Bild a) Spur 1 = p6R1 -7, Spur 2 = p6R1 -5, Spur 3 = p6R1 -3, M = Marker

Bild b) Spur 1 = p6R1, M = Marker

Auf Abb. 19 ist zu erkennen, dass die Auftrennung von p6R1 genau den Trennungsfragmenten von p6 entspricht. Die 6 Banden liegen bei einer Länge von 2.756, 1.896, 1.348, 886, 632 und 409 nt. Auch hier war die Ligation der vier verschiedenen Deletionen erfolgreich.

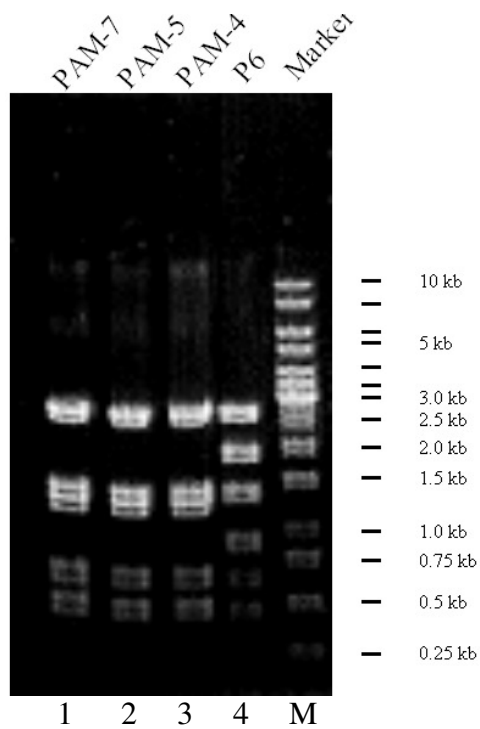


Abb. 20: Gel-Elektrophorese des mit *pstI* verdauten Plasmids pAM mit vier verschiedenen Deletionen.

Spur 1 = pAM -7, Spur2 = pAM -5, Spur 3 = pAM -3, Spur 4 = P6, M = Marker

Auf dieser Abbildung erkennt man, dass pAM was der Länge von p42 entspricht, erfolgreich ligiert wurde. Genau wie auf Abbildung 14 liegt die Bande zwischen 1.5 und 1.0 kb und hat eine Länge zwischen 1.348 und 886 nt.

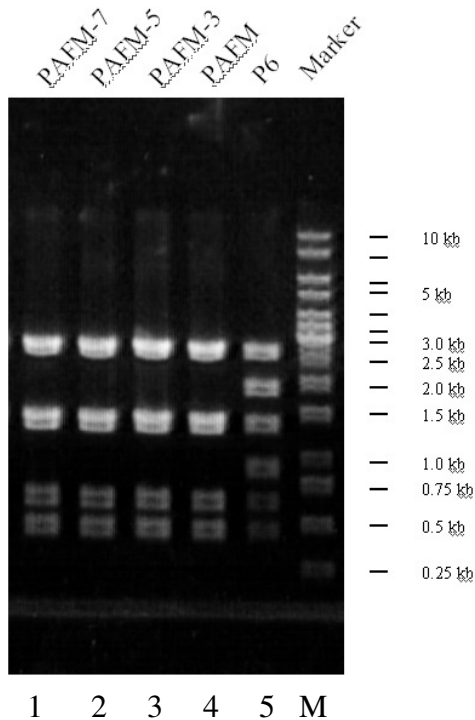


Abb. 21: Gel-Elektrophorese des mit *psfI* verdauten Plasmids pAFM mit vier verschiedenen Deletionen.

Spur 1 = pAFM -7, Spur 2 = pAFM -5, Spur 3 = pAFM -3, Spur 4 = pAFM, Spur 5 = p6, M = Marker

Auf Abb. 21 erkennt man die Auftrennung des verdauten Plasmids pAFM mit seinen vier Deletionen. PAFM setzt sich aus pAM, was p42 entspricht, und einem 110 nt großen Fragment zusammen, was insgesamt eine Länge von 152 nt ergibt und so mit dem Plasmid p156 vergleichbar ist. Genau wie bei p156 liegt die Bande zwischen 1.5 und 1.0 kb und hat eine Länge von ca. 1.348 nt.

Anhand der Abbildungen 14. - 21. kann man erkennen, ob die durchgeführten Ligationen erfolgreich waren. Dadurch dass p6 und ein Marker als Kontrolle mit verwendet wurden, erkennt man ob die Länge des hergestellten Plasmides richtig war. Die Deletionen von -3, -5 und -7nt dagegen sollten keine, in der Elektrophorese erkennbaren, Veränderungen hervorrufen, da sie das Molekulargewicht des variablen DNA-Abschnitts nur minimal verändern.

3.2 Änderung der Konformation der zwei Operatoren zueinander und Darstellung mittels ELISA

Wie oben beschrieben, wurden je vier Varianten von jedem Plasmid hergestellt, welche sich durch die Deletion von -0, -3, -5 und -7 bp unterschieden. Wie sich nun diese Deletionen auf die Expression von 3 α -HSD/CR auswirken, wurde anhand von ELISA-Messungen untersucht. Die Ergebnisse wurden in zwei Koordinatensystem aufgetragen, wobei auf der y-Achse die Menge an 3 α -HSD/CR und auf der x-Achse das jeweilige Plasmid mit den vier unterschiedlichen Varianten aufgetragen wurde.

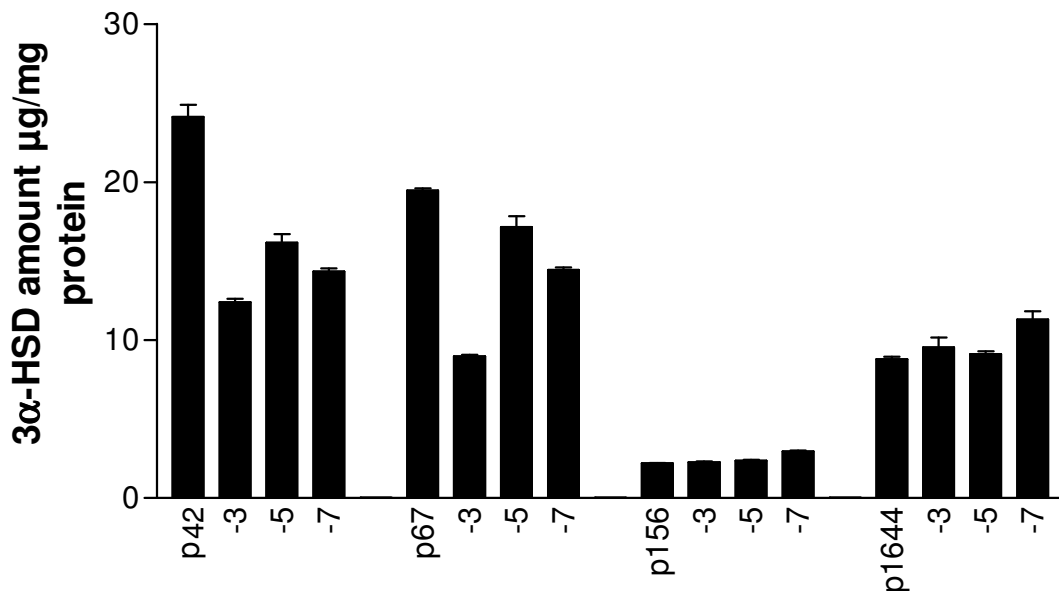


Abb. 22: Abbildung 22 zeigt die Expression von 3 α -HSD/CR bei den Plasmiden p42, p67, p156 und p1644 mit jeweils vier Deletionen, gemessen durch Elisa

Wie Abbildung 22 zeigt, liegt bei einem Abstand von 42 Basenpaaren die Menge an exprimierter 3 α -HSD/CR bei ca. 25 μ g/mg. Bei einer Deletion von 3 Basenpaaren und somit verbliebenen 39 bp als Abstand zwischen den Operatoren, beträgt die Menge an 3 α -HSD/CR nur noch ca. 11 μ g/mg. Bei einem Abstand von 67 bp liegt die Menge an 3 α -HSD/CR bei ca. 20 μ g/mg und somit im Vergleich zu der Deletion von -3 bp wesentlich höher. Bei den jeweiligen Deletionen von -5 bzw. -7 bp sinkt zwar auch die Menge an 3 α -HSD/CR, aber nicht so gravierend wie bei der Deletion von -3 bp. Die Messungen von p156 mit seinen vier Varianten zeigt, dass hier die Expression

insgesamt sehr niedrig ist, dass sich aber vor allem keine großen Unterschiede bei den vier Deletionsvarianten feststellen lassen. Auch bei der abgebildeten Messung von den vier p1644 Varianten ist zwar die Durchschnittsexpression höher als bei p156, aber auch hier zeigt sich in der gemessenen Menge kein großer Unterschied in den vier verschiedenen Deletionsvarianten.

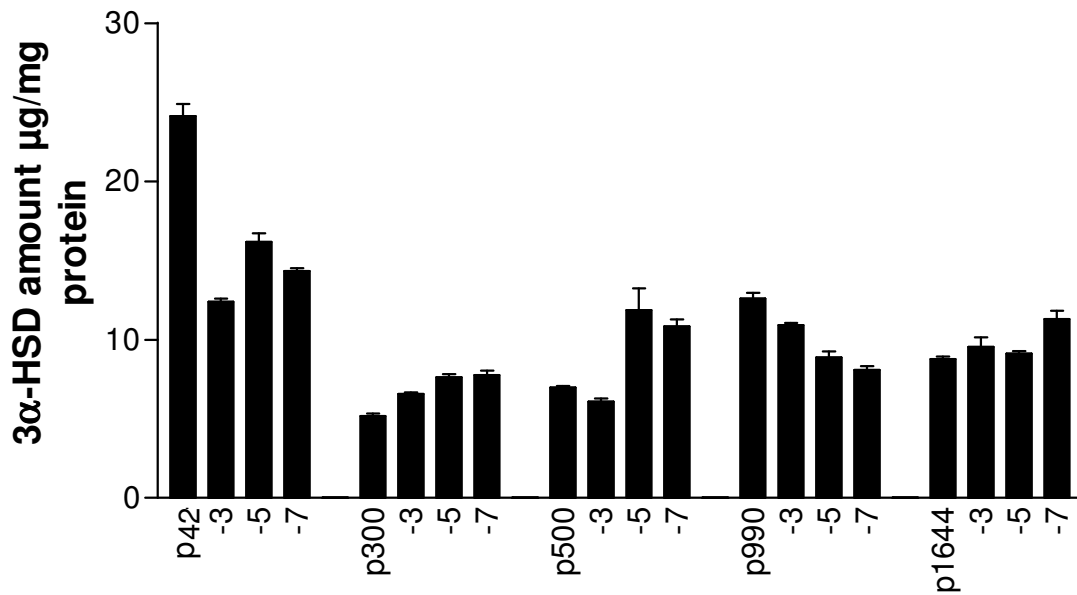


Abb. 23: Abbildung 23 zeigt die Expression von 3α-HSD/CR bei den Plasmiden p42, p300, p550, p990 und p1644 mit jeweils vier Deletionen, gemessen durch Elisa

Abbildung 23 zeigt, dass bei einem Abstand von 300 bp die Menge an exprimierter 3α-HSD/CR insgesamt sehr niedrig ist, bei ca. 6-8 µg/mg, aber auch die jeweiligen Deletionen nur geringen Einfluss auf die Expression nehmen. Bei einem Basenpaarabstand von 500 dagegen, liegt die exprimierte Menge zwar auch bei ca. 6-8 µg/mg, es lässt sich jedoch ein Unterschied zwischen p500, p500 -3 und p500 -5, p500 -7 erkennen. Bei einem Abstand von 990 Basenpaaren ist die Menge an exprimierter 3α-HSD/CR in etwa der Menge bei einem Abstand von 1644 bp gleich. Auch hier lässt sich kein signifikanter Unterschied, ähnlich wie bei 1644 bp, zwischen den einzelnen Deletionen erkennen.

3.3 Abstandsänderungen der Operatoren und deren Auswirkung, dargestellt mittels ELISA

In diesem Abschnitt der Arbeit ging es vor allem um Darstellung der Auswirkung, welche die Änderung des Operatorabstandes mit sich bringt. Um die gemessenen Werte in Relation zueinander zu setzen, wurden aus den jeweils vier Deletionen diejenigen herausgesucht, welche die niedrigsten Messwerte ergaben, um sie anschließend in einem gemeinsamen Koordinatensystem gegeneinander aufzutragen. Die niedrigsten Messwerte ergaben sich bei p42 -3 (p39), p76 -3 (p64), p156 -0 (p156), p300 -0 (p300), p500 -3 (p497), p990 -7(p983) und p1644 -0 (p1644). In Abb. 24 sind die Messwerte in einem gemeinsamen Koordinatensystem aufgetragen, wobei das kürzeste Plasmid ganz links steht, das längste ganz rechts.

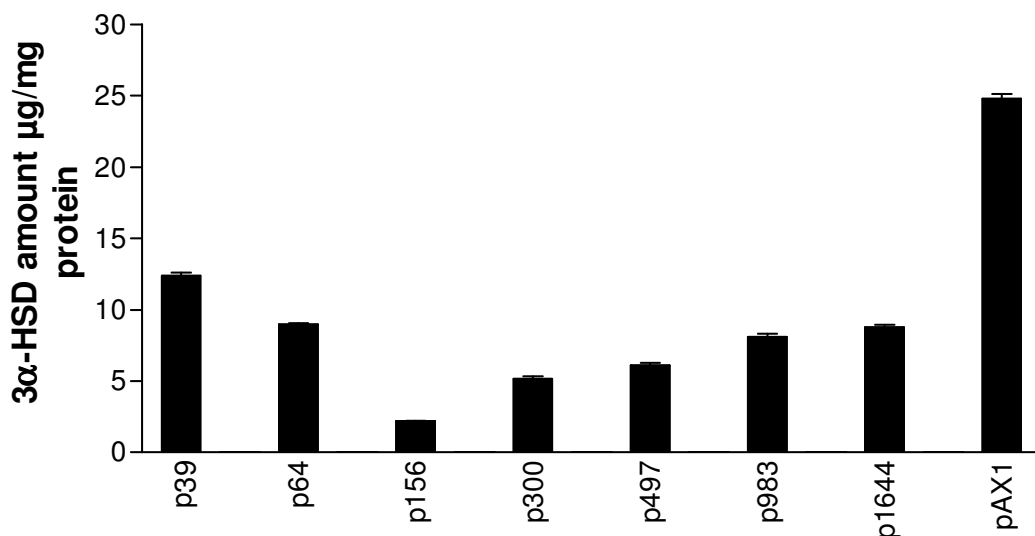


Abb. 24: Die Plasmide mit der geringsten Menge an 3α-HSD/CR

Die Abb. 24 macht deutlich, dass die Messwerte bei p156 ihr Minimum erreicht haben, jedoch sowohl in Richtung der kürzeren Plasmide, als auch in Richtung der längeren Plasmide zunehmen. Das absolute Minimum liegt bei p21 und beträgt 12,5µg 3α-HSD/CR pro mg Protein.

Die höchsten Messwerte ergaben sich bei p42 -0 (p42), p67 -0 (p67), p156 -7 (p149), p300 -7 (p293), p500 -5 (p495), p990 -0 (p990) und p1644 -7 (p1637).

Ergebnisse

In Abb. 25 sind die Messwerte wieder in einem gemeinsamen Koordinatensystem aufgetragen, wobei das kürzeste Plasmid wieder links, das größte wieder rechts aufgetragen wurde.

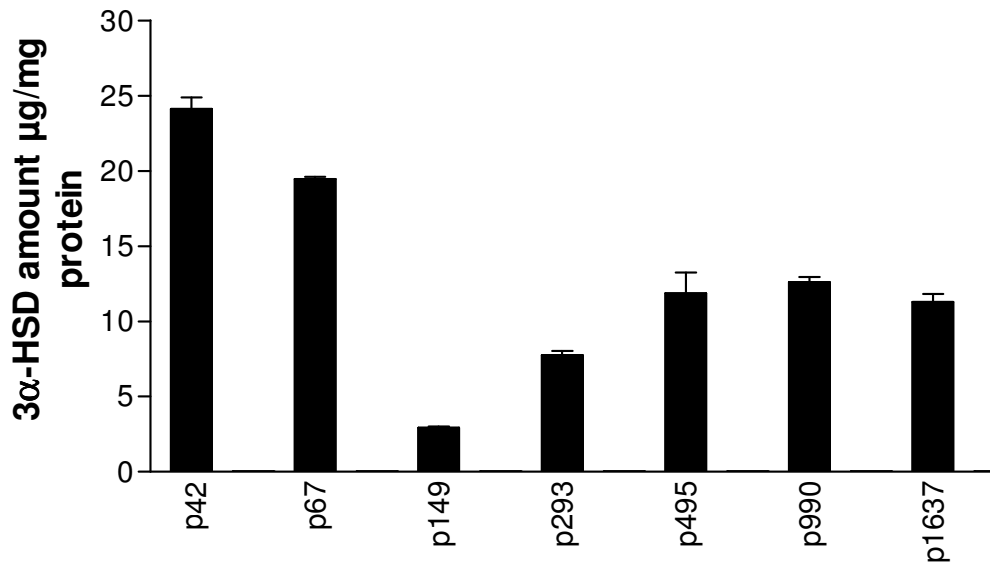


Abb. 25: Die Plasmide mit der höchsten Menge an 3 α -HSD/CR

In dieser Graphik (Abb. 25) zeigt sich ein ähnlicher Verlauf wie in der vorherigen Graphik (Abb. 24). Das Minimum liegt hier bei p149 und steigt zu beiden Seiten hin an. Das absolute Maximum ergab sich auch hier wieder bei dem kürzesten Plasmid p42, jedoch betrug hier die Menge an 3 α -HSD/CR ca. 25 μg pro Protein und war somit fast doppelt so hoch wie das Maximum p21 in Abb. 24.

3.4 Die Auswirkungen einer Fis-Protein-Bindestelle auf die Expression von 3 α -HSD/CR

In diesem Abschnitt wurde wieder die Aktivität der 3 α -HSD/CR Expression mittels ELISA gemessen, allerdings wurde ein verifizierter *E. coli* Strang verwendet, welcher eine „Fis“-Protein-Bindestelle enthielt und dessen knock-out Mutante. Beide Stränge sind uns freundlicherweise von G. Muskhelishvili (B. Schneider et al., 1999) überlassen worden.

Das „Fis“-Protein (Faktor für inverse stimulation) ist ein, von *E.coli* kontinuierlich produziertes Regulator-Protein, welches in die Genregulation des Bakteriums eingreift. Die Affinität des „Fis“-Proteins, sich an die DNA zu binden ist gewöhnlich nicht sehr stark und kann durch kompetitive Systeme unterdrückt werden.

Wie in Abb. 26 dargestellt ist, wurde ein 110 nt großes „Fis“-bindendes DNA-Fragment (B. Schneider et al., 1999) in p42 kloniert. Das so entstandene Plasmid wurde p6AFM bzw. pAFM benannt, der Abstand der beiden Operatoren betrug in diesem Plasmid somit 152 nt (42+110nt) und ähnelte somit dem Plasmid p156. Außerdem wurde das Plasmid pAX1 angefertigt, welches nur Operator 2 und nicht Operator 1 enthielt. Weiterhin wurden Deletionen von -3, -5 und -7 Basenpaaren durchgeführt und die so entstandenen Plasmide p6AFM -3, -5 und p6AFM -7 genannt.

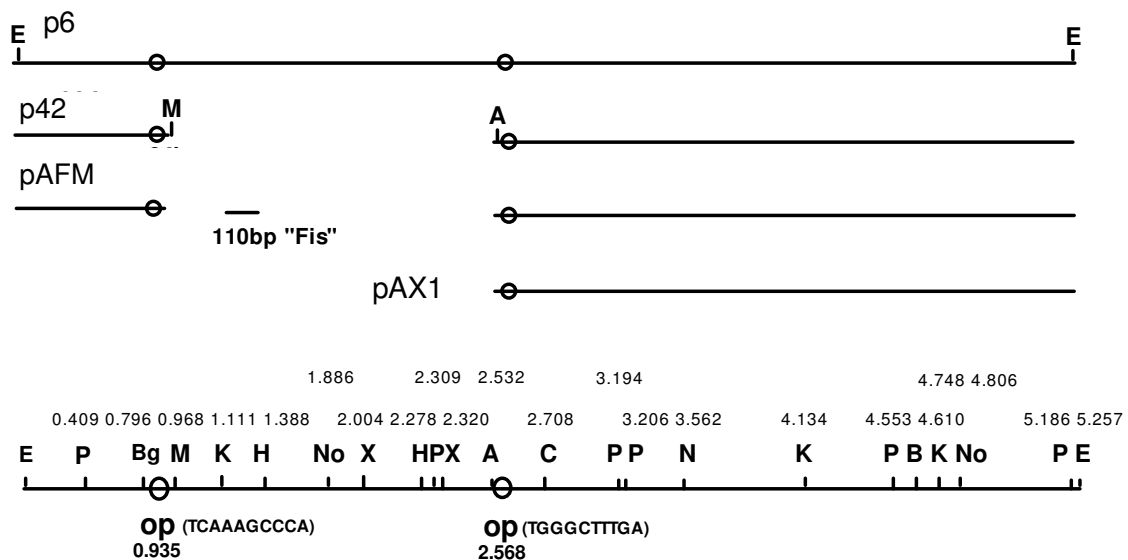


Abb. 26: Darstellung der Plasmide p42, p6AFM und pAX1

Anschließend wurden *E. coli* Zellen mit diesen vier unterschiedlichen Plasmiden und dem so genannten „fis“-Gen doppel-transformiert, was zu CSH50 wt (wild typ) Zellen führte. Dann wurden diese vier unterschiedlichen Plasmide ausserdem noch in „fis“-Gen (knock out) ausgeschaltete *E. coli* Zellen doppelt transformiert, was so genannte CSH50-Fis⁻ Zellen ergab.

Abb. 27 zeigt die unterschiedlich exprimierte Menge an 3 α -HSD/CR, einerseits von Zellen welche das „Fis“-bindende DNA Fragment enthalten (pAFM), im Vergleich zu Zellen ohne dieses Fragment (p67), andererseits zeigt es wie sich das Vorhandensein (CSH50 wt) bzw. das Nicht-Vorhandensein (CSH50-Fis⁻) von dem „Fis“-Gen auf die Expression auswirkt.

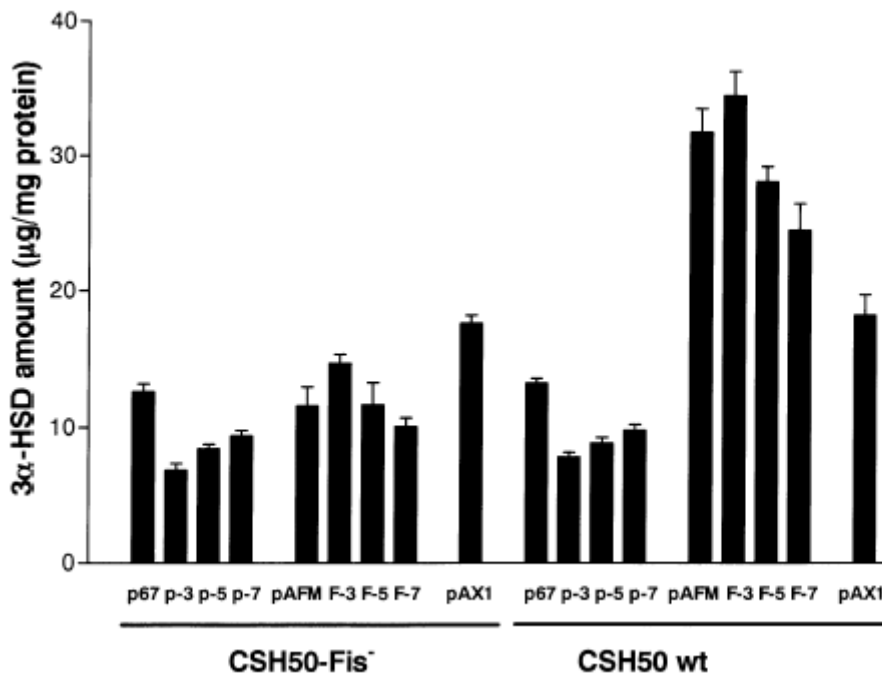


Abb. 27: Einfluss des „Fis“-Proteins auf die Expression von 3 α -HSD/CR in *E.coli*

In der Graphik wird deutlich, dass das Plasmid p67 und seine Deletionen -3, -5, und -7 eine ähnliche Menge 3 α -HSD/CR, sowohl in der CSH-Fis⁻ als auch in der CSH50 wt Zelle, exprimieren. Auch pAX1, in welchem OP1 nicht vorhanden ist und als Kontrolle verwendet wird, zeigt eine ähnliche Expression von 3 α -HSD/CR in beiden Zellgruppen. Außerdem lässt sich erkennen, dass in CSH50- Fis-Zellen mit ausgeschaltetem „Fis“-Gen die exprimierte 3 α -HSD/CR-Menge bei den p67 und den pAFM transformierten

Ergebnisse

Zellen ähnlich hoch ist, wobei sich schon eine Differenz zwischen z.B. p -3 und pAFM-3 erkennen lässt.

Ein weiterer auffälliger Aspekt der Graphik ist die hohe Menge an 3 α -HSD/CR, welche in den CSH50 wt Zellen mit dem Plasmid pAFM und seinen Deletionen produziert wurde, im Gegensatz zu Zellen in welche p67 transformiert worden ist.

Wie wir erwartet hatten, lagerte sich das „Fis“-Protein an das „Fis“-Protein bindende DNA-Fragment an, welches innerhalb der 110 nt Sequenz in dem Plasmid pAFM lag. Somit blockierte es die Bindung des RepA an die Operatorsequenz und es kam zu einer Derepression der *hsdA*-Transkription. Die Folge war ein Anstieg der exprimierten Menge an 3 α -HSD/CR.

Insgesamt konnte man aus den Ergebnissen schließen, dass innerhalb einer Gruppe der niedrigste Level an 3 α -HSD/CR einer optimalen Bindung des RepA an OP1 und OP2 entsprach, dem höchsten Level an 3 α -HSD/CR dagegen eine instabilere Bindung des RepA an die Operatoren zugrunde lag.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der weiteren Identifizierung von Regulationsmechanismen der 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus dem Bakterium *Comamonas testosteroni* ATCC 11996. Die 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ist das Schlüsselenzym bei der Degradation von komplexen Kohlenwasserstoffverbindungen und wird von verschiedenen Mikroorganismen, unter anderem von *Comamonas testosteroni*, exprimiert.

Das Enzym wird jedoch nicht, wie in der Einleitung genauer beschrieben, kontinuierlich produziert, sondern unterliegt einer so genannten Substratinduktion. Das bedeutet, nur bei Vorliegen eines Substrats, z.B. eines Steroids, kommt es zur Expression der 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und somit zu einem möglichen Abbau dieses Substrates.

Die Arbeitsgruppe, unter der Leitung von Prof. Edmund Maser, beschäftigt sich seit längerem mit der Thematik der „Molekularen Regulation der Verwertung von Bodensteroiden als Kohlenstoffquelle durch *Comamonas testosteroni*“. Im Rahmen dieses Projektes wurde in früheren Experimenten ein 5.257 kb *EcoR*I-Fragment aus chromosomaler DNA von *Comamonas testosteroni* isoliert (Möbus and Maser, 1998).

Dieses Fragment enthält sowohl die Gensequenzen für die 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, als auch die Gensequenzen für zwei Repressoren (*repA* und *repB*). Somit ist dieses DNA-Segment maßgeblich an der Steroiddegradation beteiligt und schien somit geeignet mehr über die Regulationsmechanismen des Steroidabbaus herauszufinden. Nachdem in früheren Arbeiten zwei Operatoren auf DNA-Ebene gefunden worden waren, kam die Frage auf, inwieweit sich der Abstand dieser zwei Operatoren auf die Genregulation auswirkt und inwieweit die Konformation der Operatoren die Regulation beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde das 5.257kb DNA-Fragment auf verschiedene Weisen verifiziert um mehr über die Zusammenhänge der Regulationsmechanismen herauszufinden.

4.1 Relevanz und Nutzen von Comamonas testosteroni in Medizin und Umwelttechnik

Die Frage warum gerade *Comamonas testosteroni* im Mittelpunkt intensiver Forschungsarbeiten steht, lässt sich dadurch erklären, dass es viele unterschiedliche Funktionen der komplexen Kohlenwasserstoffverbindungen in der Umwelt gibt und sie wichtige Rollen in Medizin und Umwelt einnehmen.

Im Bereich Umwelttechnik gewinnt die so genannte Bioremediation immer mehr an Bedeutung. Hierbei handelt es sich um die Nutzung des metabolischen Potentials von Mikroorganismen zur Reinigung von schadstoffbelasteten Umgebungen. Dies stellt eine Alternative zu physikalisch-chemischen Reinigungsmethoden dar.

Die stetig zunehmende Industrialisierung hat zur Freisetzung einer Vielzahl von umweltschädlichen Substanzen und damit zur Kontamination von aquatischen und terrestrischen Umgebungen geführt.

Inzwischen sind aufgrund intensiver Forschungsarbeiten Mikroorganismen isoliert worden, welche diese Substrate als Nahrungs- oder Energiequelle nutzen oder kometabolisch transformieren können.

Diese chemischen Substanzen, welche nicht natürlich in der Umwelt vorkommen und sich durch eine sehr lange Persistenz auszeichnen, werden als Xenobiotika bezeichnet. Als Beispiele für Xenobiotika sind polyaromatische, halogenierte, aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe, sowie Pestizide zu nennen, die in industriellen Fertigungsprozessen (pharmazeutische Chemie, Farbstoff- und Textilindustrie) als Bestandteil synthetischer Kunststoffe und in der Landwirtschaft eingesetzt werden (Dellweg et al. 1992, Rippen 1992). Xenobiotika werden nur sehr langsam abgebaut. Sowohl ihr Abbau als auch ihre Transformierbarkeit sind seit ca. 1970 Inhalt intensiver Forschung (Cerniglia 1984, van der Meer et al. 1992).

Wegen ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften sind Xenobiotika nicht oder nur schwer wasserlöslich. Dies vermindert ihre Bioverfügbarkeit und kann zu einer Akkumulation in lipophilen Bestandteilen von Lebewesen (Membranen und Fettgewebe) und nachfolgend zu einer Anreicherung in der Nahrungskette führen. Dadurch kann es zu einer Inaktivierung von essentiellen Enzymsystemen (z.B. Glykolyse oder Hämbiosynthese), zu Membraninteraktionen (Zusammenbruch von Transmembranen), sowie zur Interaktion mit Nukleinsäuren (Interkalierung und Bildung von DNA-Aggregaten mit nachfolgender Bildung von Mutationen) kommen

(Forth et al. 2001, Knippers 1997). Wenn diese Substanzen mit kommunalen und industriellen Abwässern in die Abwasserreinigungsanlagen geraten ist nicht nur ihr Abbau problematisch, sondern auch eine nachteilige Wirkung auf die beteiligten Mikroorganismen nicht auszuschließen. Dadurch kann es zur Beeinträchtigung von Nitrifikation und Denitrifikation der biologischen Phosphate sowie z.B. zur Verschlechterung des Absetzverhaltens von Belebtschlamm kommen.

Der Einsatz von Belebtschlamm zur Abwasserreinigung existiert seit Anfang des 20. Jahrhunderts (Gujer 1999). Weiterhin ist eine Feminisierung der Fauna zu beobachten, was sich beispielsweise in Verweiblichungsphänomenen bei männlichen Fischen widerspiegelt, welche u.a. durch natürliche und synthetische Steroide und Alkylphenole verursacht worden ist (Purdom et al., 1994; Harries et al., 1997).

Die Verschmutzung durch schwer abbaubare Xenobiotika fordert allerdings neue Verfahren, welche als Bioaugmentation bezeichnet werden. Bioaugmentation ist die gezielte Einführung von Mikroorganismen bzw. genetischer Information in eine mikrobielle Biozönose mit dem Ziel, vorhandene Prozessleistungen zu stabilisieren, zu beschleunigen oder neue Prozessleistungen zu etablieren.

Allerdings fordert die Nutzung der Bioaugmentation intensive Forschungsarbeiten um die elementaren Regulationsmechanismen zu erkennen und zu nutzen.

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft ist bekannt, dass die Gene für den Abbau von Xenobiotika häufig auf mobilen Elementen kodiert sind. Durch die Aufnahme solcher Elemente sind manche Bakterienstämme in der Lage, den Abbau eines Xenobiotikums zu „erlernen“. Infolge dessen könnte somit die gezielte Einführung von solchen katabolen Genen in eine xenobiotikabelastete Biozönose zur in situ genetischen Modifikation der Bakterien und damit zum nachfolgenden Abbau der Schadstoffe beitragen (Pepper et al. 2002, Springael 2003, Top et al. 2002).

Der Einsatz von *Comamonas testosteroni* in der Medizin ist ein weiterer wichtiger Aspekt, welcher das Bakterium für die Forschung bedeutsam macht.

Koronare Herzkrankheit (KHK), Herzinfarkt, Schlaganfall und die peripherer arterielle Verschlusskrankheit (pAM) zählen immer noch zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. Die bekanntesten Risikofaktoren für diese Erkrankungen sind Adipositas, Hypercholesterinämie, Lipidstoffwechselstörungen, Hypertonie und Diabetes mellitus. Sie alle führen durch unterschiedliche Pathomechanismen zu Athero- und Arteriosklerose und den damit verbundenen Folgeschäden.

In Studien ist nachgewiesen worden, dass eine Senkung des LDL-Cholesterins um 10 % die Letalität um ca. 20 % senkt (Yusuf et al., 1988) und somit ein wichtiger Therapieansatz für Herz-Kreislaufkrankheiten ist.

Die bisher eingesetzten Therapien wie z.B. Senkung des Cholesterinspiegels durch Clofibrinsäurederivate und Cholesterinsyntheseenzymhemmer (z.B. Lovastatin) sind nur einige Beispiele und zum Teil mit starken Nebenwirkungen verbunden und bei gewissen Vorerkrankungen sogar kontraindiziert. Bei den Statinen z.B. reichen die Nebenwirkungen von häufig auftretenden Erkrankungen wie Übelkeit, Durchfall oder Erbrechen über seltene Störungen wie Rhabdomyolyse und dem Lyell-Syndrom bis hin zu Todesfällen (Paoletti et Sirtori, 1997).

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft ist jedoch für einige Mikroorganismen ein kataboler Stoffwechsel von steroidal Verbindungen gesichert. So konnte bei Schweinen eine Senkung des Gesamtcholesterins durch das Bakterium *Lactobacillus reuteri* (De Smet, I., 1998) und durch *Lactobacillus casei* nachgewiesen werden (Bomba, A., 1998).

Insofern bietet auch *Comamonas testosteroni* einen möglichen Einsatz in der Therapie von Lipidstoffwechselstörungen und Hypercholesterinämien durch seinen Abbau steroidal Verbindungen.

4.2 Diskussion der Methodik

Nachdem in vorangegangenen Studien sowohl die Gensequenz für die 3 α -HSD/CR als auch für die zwei Repressor-Proteinen (RepA und RepB) und zwei Operatoren auf DNA-Ebene bekannt geworden waren, sollte in dieser Arbeit nun die Regulationsmechanismen bezüglich dieser Repressoren und Operatoren genauer untersucht werden. Der Abstand der Operatoren zu einander sollte verifiziert und seine Auswirkung auf die Expression der 3 α -HSD/CR gemessen werden.

Hierzu wurde mittels Restriktionsendonukleasen die DNA zwischen den Operatoren an bestimmten Stellen gespalten und anschließend durch Ligation in einen Vektor eingefügt um somit eine bestimmte Distanz zwischen den Operatoren zu schaffen.

Um eine in den Vektor klonierte DNA zu amplifizieren, wurden die verifizierten Plasmide in kompetente Zellen transformiert. Aus diesen Zellkulturen wurde anschließend eine größere Menge an reiner DNA hergestellt. Hierzu wurde der Gen Eluter Plasmid Midi-Prep von der Firma Sigma verwendet.

Diese gereinigte DNA wurde nun wieder in kompetente Zellen transformiert und anschließend eine Protein-Isolierung durchgeführt. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen und genau zu messen wurde die Methode ELISA verwendet.

Der ELISA (Enzym-linked immunosorbent assay) ist eine Methode, um quantitativ die Menge an Protein oder Antigen zu messen, was in unserem Fall mittels enzymmarkierter Sekundärantikörper geschah. Durch einen zugesetzten Farbindikator konnte somit die Menge an 3 α -HSD/CR ermittelt werden. Dies erfolgte durch die Messung der optischen Dichte der Proben im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405nm/495nm. Anschließend wurden die Ergebnisse anhand einer Standardkurve ausgewertet.

4.3 Diskussion zur Ausbildung einer Loop-Struktur

Unterschiedliche DNA-Multiprotein-Komplexe können in unterschiedliche DNA-Funktionen und Interaktionen wie z.B. Transkription, Replikation und Reparaturen der DNA eingreifen bzw. diese ausführen (Echols, 1990). Die meisten dieser Multiprotein-komplexe wirken, indem sie an topologisch unabhängige DNA-Domänen binden und diese Domänen so zueinander bringen, dass sich zwischen ihnen eine Schleife (Loop) ausbildet.

Vor allem bei Repressormolekülen kann man eine Dimerisierung bzw. Tetramerisierung feststellen, welche bewirkt, dass die DNA lokal zu einer Schleife (Loop) gebogen wird und somit die Wirkung des Repressors verstärkt.

Die Loop-Bildung kann, wie in Abb. 28 dargestellt ist, auf unterschiedliche Weisen ablaufen, jeweils mit dem Ziel zwei unabhängige Frequenzen der DNA räumlich näher zu einander zu bringen:

I) zwei gleiche oder ungleiche Proteine binden an verwandte DNA-Sequenzen und interagieren direkt untereinander (Irani et al., 1983; Dunn et al., 1984; Su et al., 1990; Roy et al., 1991; de Beer et al., 2002).

II) ein zweiseitiges Protein bindet gleichzeitig an zwei von einander unabhängige DNA-Sequenzen (Kramer et al., 1987; Nash, 1996).

III) wie in I), nur dass die zwei Proteine nicht miteinander, sondern über einen Adapter interagieren (Kallipolitis et al., 1997);

IV) die Loop-Bildung kann durch ein weiteres DNA-bindendes Protein unterstützt werden, dass sich z.B. an einer architektonisch kritischen Stelle der DNA anlagert

(Santero et al., 1992; Aki et al., 1996; Nash, 1996; Wassem et al., 2000; Thomas and Travers, 2001; de Beer et al., 2002).

V) der unter III) beschriebene Adapter hat gleichzeitig eine Funktion als Architekturprotein wie unter 4) beschrieben und unterstützt somit die Loop-Bildung zweifach (Cosma et al, 2001; Kar and Adhya, 2001).

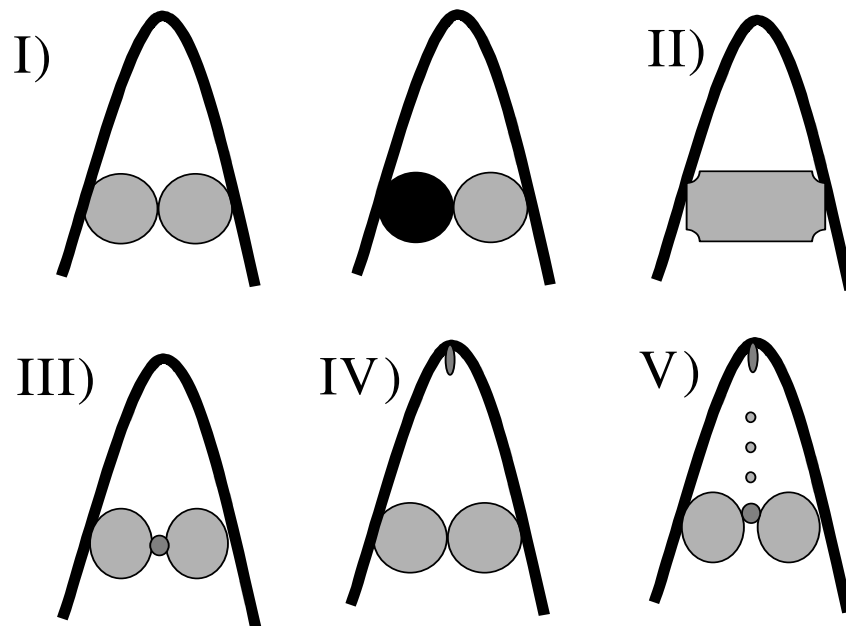


Abb. 28: Formen der Loop-Bildung verändert nach Semsey et al., 2002

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maser wurde anhand von „shift electrophoresis“ ein Repressor (RepA) isoliert, welcher gleichzeitig an OP1 und OP2 bindet (Xiong, Martin, Blum, Schäfers, Maser, 2001). In darauffolgenden Versuchen wurde Op1 und Op2 von p6 ausgeschnitten, was zur Folge hatte, dass die Expression der 3 α -HSD/CR zunahm (Xiong, Martin, Maser, 2003). Daraus lässt sich schließen, dass RepA zu Mechanismus I oder II der Loop-Bildung zählt.

Obwohl die Mechanismen der Loop-Bildung immer ähnlich sind, nämlich die räumliche Annäherung zweier unterschiedlicher DNA-Frequenzen, gibt es in den Anwendungen der Mechanismen verschiedener Organismen große Unterschiede. Ökonomischerweise kann durch eine Loop-Bildung, auch bei niedriger Proteinkonzentration, eine Wirkung

auf mehrere Zielsequenzen der DNA erreicht werden, wenn diese trotz eines großen Abstandes zusammentreten können.

Außerdem sind festgelegte Abstände zwischen den Zielsequenzen nicht zwingend festgelegt, so dass die Genregulation auf Transkriptionsebene flexibler ablaufen kann (Schleif, 1992).

Ein anderer Vorteil der Loop-Bildung besteht darin, dass Fluktuationen im Transkriptionsvorgang reduziert werden können und die Sensitivität auf eine ständig wechselnde Anzahl von regulatorisch wirkenden Proteinen gesenkt werden kann. Dies kann z.B. anhand des *lac*-Operons in *E. coli* gezeigt werden. Insgesamt kann durch diesen Mechanismus das Niveau der Repression angehoben werden (Jose and Leiber, 2003).

Ein anderes gut untersuchtes Beispiel ist die Ausbildung einer loop-Struktur bei *E. coli*, ausgelöst durch den Gal Repressorkomplex. Der Gal Repressorkomplex, welcher die Transkription des *gal* operons in *E. coli* unterdrückt, besteht aus zwei GalR Dimeren und bindet an zwei Operatoren, OE und OI. Die so gebildete Loop-Struktur besteht aus einem 113 bp großen DNA-Segment und beinhaltet den *gal* Promotorkomplex bestehend aus zwei Promotoren P1 und P2 (Irani et al., 1983; Majumdar and Adhya, 1984; Adhya et al., 1998). Außerdem fördert ein „histone-like-Protein“ die Komplexbildung (Lewis et al., 1999), durch Ausbildung einer Tetramerbildung.

Durch Deletion einer der Operatoren konnte festgestellt werden, dass die Ausbildung einer Loop-Struktur ausblieb, was sich durch die fehlende Repression nachweisen ließ (Semsey et al., 2002).

4.4 Diskussion der Ergebnisse des verifizierten Operator-Abstandes in *Comamonas testosteroni*

Wie in dem Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben, wurden Deletions-Mutanten hergestellt, welche in unterschiedlichen Abständen der Operatoren OP1 und OP2 zueinander resultierten. Da diese Region eine entscheidende Rolle in der *hsdA* Regulation spielt, konnten die Ergebnisse anhand der unterschiedlichen 3 α -HSD/CR-Expression gemessen werden.

Wie in der Abbildung 29 zu sehen ist, exprimieren die *E.coli* Zellen, welche mit p156 transformiert worden waren, den niedrigsten Level an 3 α -HSD/CR (ca. 3 μ g/mg Protein). Wenn das DNA-Fragment zwischen OP1 und OP2 jedoch kürzer ist, wie in dem Falle der mit p42 und p67 transformierten Zellen, steigt der Level der exprimierten 3 α -HSD/CR an (bei p42 durchschnittlich ca.15 μ g/mg Protein, bei p67 durchschnittlich ca. 11 μ g/mg Protein).

Auch wenn das DNA-Fragment zwischen den Operatoren länger ist, wie in dem Falle der mit p300, p500, p990 und p1644 transformierten Zellen, steigt die Expression von 3 α -HSD/CR (bei p300 durchschnittlich ca. 5 μ g/mg Protein, bei p500 durchschnittlich 8 μ g/mg Protein, bei p900 durchschnittlich ca. 9 μ g/mg Protein und bei p1623 auch durchschnittlich ca. 9 μ g/mg Protein).

Offensichtlich liegt somit die optimale Distanz zwischen den Operatoren um den RepA zu binden bei ungefähr 156 nt.

Die höchste Expression von 3 α -HSD/CR wurde bei dem kürzesten Abstand (p42) gemessen. Dies deutet darauf hin, dass die Distanz von 42 nt zwischen den zwei Operatoren nicht genügend Platz für die Bindung von RepA bietet (siehe Abb. 29).

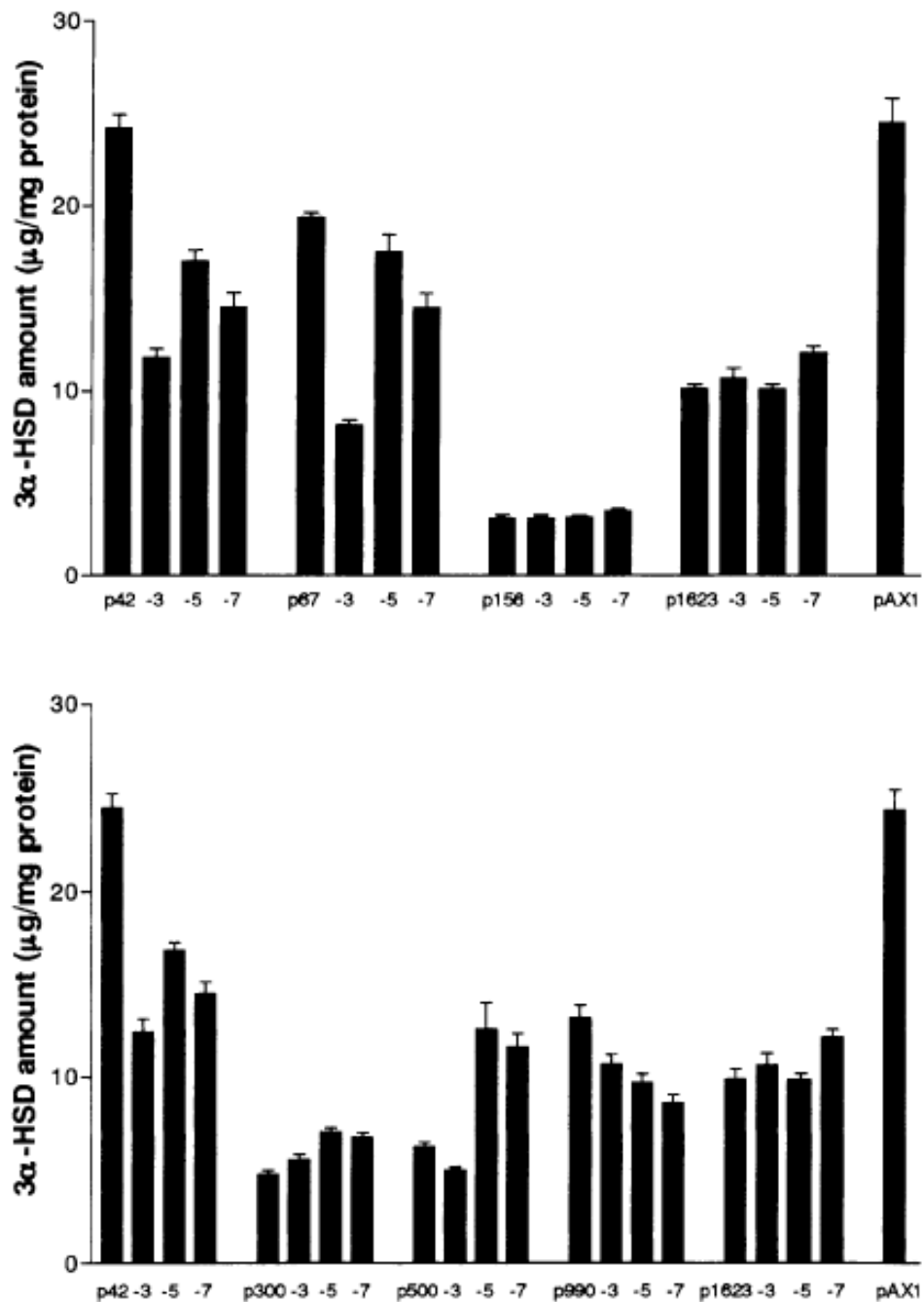


Abb. 29: ELISA der 3α-HSD/CR-Expression.

Die Zellen, welche mit p42 und p67 transformiert worden sind, zeigen den höchsten Level an 3α-HSD/CR. Zellen mit p156 zeigen den niedrigsten Level. Bei einer Distanz zwischen den Operatoren von 42 – 500 bp, verursacht die Deletion von -3, -5, und -7 nt eine unterschiedlich hohe Expression an 3-α-HSD/CR. Dies ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass eine Änderung der Konformation der zwei DNA Stränge die optimale Konfiguration der Operatoren zueinander beeinflusst.

4.5. Diskussion der Konformationsänderung der Operatoren zueinander

Eine weitere Methode welche Hinweise auf die Genregulation der 3 α -HSD/CR gibt, besteht in der zusätzlichen Deletion von jeweils -3, -5 und -7 nt in den unterschiedlichen Plasmiden.

Da die Deletion eines einzelnen DNA-Nukleotids zu einer Rotation des DNA-Stranges um ca. 35° führt, verursacht somit die Deletion von 10 Basenpaaren eine komplette Drehung der DNA um ca. 360°. Aus diesem Grund wurden somit jeweils 3 Nukleotide für eine viertel, 5 Nukleotide für eine halbe und 7 Nukleotide für eine dreiviertel Drehung deletiert (siehe Abb. 30). Da die Deletionen zwischen den zwei Operatoren OP1 und OP2 durchgeführt wurden, führt somit die Rotation der DNA zwischen den beiden Operatoren zu einer Konformationsänderung der Operatoren zueinander, wobei die stärkste Änderung bei einer Deletion von fünf Nukleotiden zu finden ist. Die Operatoren sind hier genau entgegengesetzt, um 180° gedreht, angeordnet.

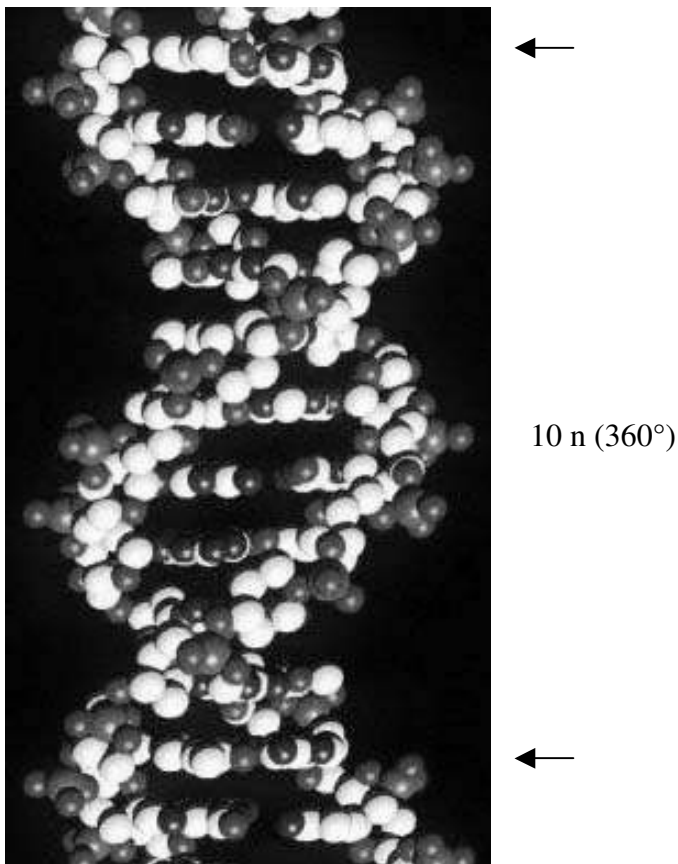


Abb. 30: DNA-Modell.

An dem Modell kann man erkennen, dass sich bei einer Deletion von 10 n, die DNA um 360° dreht.

Wie in Abb. 29 dargestellt ist, zeigen die einzelnen Deletionen bei dem „Wild typ“ p6 (1623kb zwischen OP1 und OP2) keine auffälligen Unterschiede. Anders ist es jedoch bei p47, p67 und p500 mit ihren einzelnen Deletionen.

Hier zeigen sich, wie in Abb. 26 zu sehen ist, signifikante Unterschiede in der Expression von 3α -HSD/CR. Offensichtlich hängt hier die optimale Bindung des RepA an die Operator Regionen nicht nur von der Entfernung, sondern auch von der optimalen Orientierung der Operatoren zueinander ab.

Wie in Abb. 31 zu sehen ist, ist die stabilste Konformation 'A' (p42, -3nt). Dieselbe Konformation, nur um 180° weiter gedreht (Form 'D', p42 -O nt), ist instabil für die Bindung von RepA und resultiert somit in einer hohen Expression der 3α -HSD/CR (siehe Abb. 29). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei einer kritischen Distanz von 42 -500 nt, die zusätzlichen Deletionen von -3, -5 und -7 nt zu einer Rotation des DNA-Stranges führen und somit die Orientierung der beiden Operatoren beeinflussen. Dies wiederum beeinflusst die Bindung von RepA.

Wie in Abb. 29 zu erkennen ist, führt z.B. die Deletion von -3, -5, und -7 nt bei p42 zu 42, 39, 37 und 35 nt zwischen OP1 und OP2. Die Distanz von 42 nt (p42) führt zu keiner signifikanten Repression von 3α -HSD/CR Expression, während bei einer Distanz von 39 nt (p42 -3) die Expression von 3α -HSD/CR stark unterdrückt wird. Die gleichen Ergebnisse lassen sich auch bei p67 beobachten.

Bei der p156 Mutante dagegen bestehen optimale Bindungsvoraussetzungen für RepA und somit beeinflussen die einzelnen Deletionen kaum die Expression der 3α -HSD (Abb. 31). Bei einem Operatorabstand kürzer als 156 bp wird eine niedrigere Repressoraktivität und somit höhere 3α -HSD Expression beobachtet.

Bei einem Operatorabstand länger als 156 bp wird möglicherweise eine „Loop“-Struktur zwischen OP1 und OP2 gebildet, wodurch die Operatoren in eine konstante Distanz und Orientierung zueinander gebracht werden. Aus diesem Grund beeinflusst ein großer Abstand zwischen OP1 und OP2 nicht die Bindungsaffinität von RepA.

Bei einem Abstand größer als 1623 nt haben die Deletionen von -3, -5 und -7 nt offensichtlich keinen Einfluss auf die Rotation der DNA- Stränge und somit auch nicht auf die Expression der hsdA.

Auf Zellen, welche mit RepB tragenden Plasmiden kotransformiert worden sind, haben die veränderten Operatorkonformationen keinen Einfluss auf die 3α -HSD/CR Expression, da RepB auf Translationsebene wirkt und dadurch nicht an die Operatoren bindet.

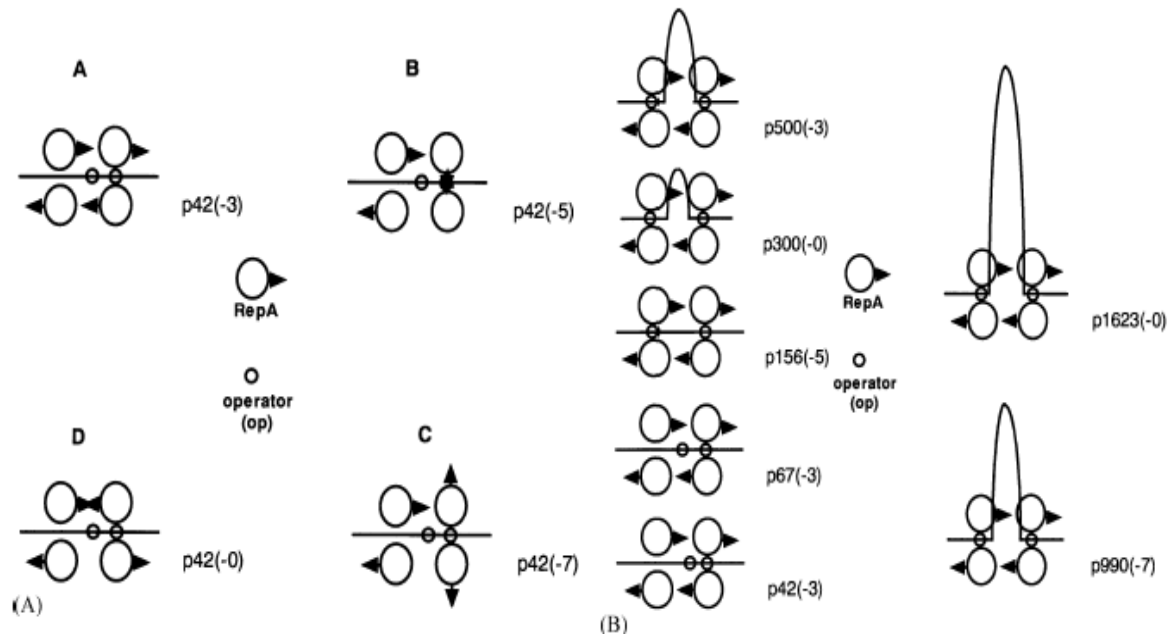


Abb. 31: Der Bindemechanismus von RepA an die zwei Operatoren.

Ein Basenpaarabstand von 156 ist der optimale Abstand für die Anlagerung von RepA. Wenn der Abstand zwischen den Operatoren kürzer ist als 156 bp, wird die Repressoranlagerung durch den limitierten Platz, welcher für das Repressormolekül zur Verfügung steht, beeinflusst (wie Beispiel p42 zeigt). In diesem Fall führen die -3, -5, -7 Deletionen zu unterschiedlicher 3 α -HSD/CR Expression. Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Konformation der DNA Stränge zurückzuführen, welches dadurch wiederum die optimale Orientierung des Repressors an die Operatoren ändert. Wenn der Abstand der Operatoren jedoch länger als 156 bp ist, besteht die Möglichkeit eine „Loop“-Struktur auszubilden und die einzelnen Deletionen von -3, -5 und -7 bp führen zu keiner signifikanten Änderung der 3 α -HSD/CR Expression.

4.6 Diskussion zur Bindung des Fis-Proteins

Der „Faktor für inverse stimulation“ (Fis) ist ein Seiten-spezifisches DNA-bindendes Protein, welches als Regulator in die Genexpression von *Escherichia coli* eingreift (Betemier et al., 1994; Dorman and Deighan, 2003; Finkel and Johnson, 1992; Muskhelishvili and Travers, 2003). Die rRNA Gene haben mehrere Fis-Bindungsstellen, wobei sich eine in einer „upstream Activator Sequenz“ (UAS) befindet. (Hirvonen et al. 2001). Wenn FIS an UAS gebunden ist steht das Fis-Protein in Verbindung zu einer carboxyl-terminalen Domäne, einer α -Untereinheit der RNA-Polymerase und aktiviert somit die Transkription (Hirvonen et al. 2001; Ross et al., 1990; Zhi et al., 2003).

Das Fis-Protein kann aber auch als Repressor wirken. Es hemmt den Promotor, welcher für die Transkription seiner eigenen Gene verantwortlich ist (Walker et al., 1990), außerdem hemmt es die *gyrA* und *gyrB* Gene, welche für die DNA-Gyrase codieren (Schneider et al., 1999). FIS aktiviert auch eine der *topA* Promotoren, welcher für Topoisomerase I codiert (Weinstein-Fischer et al., 2000), somit ist sein Einfluss auf die Transkription zusammenhängend mit der Topologie der chromosomalen DNA.

In meiner Arbeit lässt der Einbau des Fis-bindenden DNA-Fragments zwischen Op1 und Op2 1 die Expression der 3α -HSD/CR deutlich ansteigen (siehe Abb. 26 und 27). In Fis-Protein negativen Zellen dagegen, führt die Bindung von RepA zu einer abnehmenden 3α -HSD/CR Expression. Somit verhindert in Fis-Protein positiven Zellen das Fis-Protein offensichtlich die Bindung des RepA und ermöglicht dadurch die Transkription von *hdsA*. Dies macht deutlich, dass die Bindungsaffinität des Fis-Proteins eindeutig höher ist, als die des RepA und somit die Bindung des RepA verhindert, was in einem Anstieg der 3α -HSD/CR resultiert.

4.7 Genregulation in Bakterien im Allgemeinen

Bakterien können flexibel auf Veränderungen ihres Lebensraums und ihres Nahrungsangebots reagieren. Um dies zu gewährleisten werden nicht alle Enzyme aller Stoffwechselwege konstant produziert, sondern nur bei Vorhandensein eines bestimmten Substrates. Diese substratabhängige Synthese eines Enzyms heißt Induktion und ist bei der Genregulation von Bakterien weit verbreitet.

Häufig unterliegen die Gene in Bakterien einer negativen Kontrolle, d.h. dass ein Repressorprotein die Expression eines Gens durch Bindung an einen Operator unterbindet. Es wird verhindert, dass die RNA-Polymerase den richtigen Promotor findet. Ebenso sind bakterielle Gene ökonomischerweise häufig in Clustern organisiert, wie z.B. beim *lac*-Operon. Hier besteht ein Cluster aus drei Genen (*lacZYA*), die der Verstoffwechslung von Laktose in *E. coli* dienen. Die Transkription dieser drei Gene wird durch ein Repressorprotein bestimmt, das vom Gen *lacI* produziert wird. Dieses Gen hat eine unabhängige Transkription mit eigenen regulatorischen Sequenzen. Das Repressorprotein ist ein Tetramer, bestehend aus vier identischen Untereinheiten. Es bindet an eine cis-agierende Sequenz, den Operator, welcher zwischen dem Promotor und den Strukturgenen liegt.

Mittlerweile sind über 100 Promotoren in *E. coli* sequenziert und charakterisiert worden. Einige kurze Sequenzen sind stark konserviert, da sie wichtige Funktionen übernehmen. Es existieren in einem bakteriellen Promotor vier hochkonservierte DNA-Abschnitte: der Startpunkt, die -10 Sequenz, die -35 Sequenz und die Distanz zwischen den beiden. Der Startpunkt der Transkription ist ein Nukleotid, meist Purin, dessen Lage in der Sequenz mit +1 angegeben wird.

In Bakterien und einigen Einzellern hängt die Synthese spezifischer Enzyme von dem Auftreten ihrer Substrate im Medium ab. Dieser Mechanismus wird Induktion genannt und kann in kürzester Zeit in der jeweiligen Zelle ablaufen. Wenn z.B. zu *E.coli* β -Galactoside hinzugegeben wird, wird die β -Galactosidase innerhalb weniger Minuten in hoher Anzahl exprimiert.

Die bakteriellen Repressoren sind meist Homodimere und anhand von Röntgenstrukturanalysen konnte die dreidimensionale Struktur mehrerer bakterieller Repressoren aufgeklärt werden und wie sie an spezifische Operator-DNA gebunden sind (Lewis, 1996).

Geht man davon aus, dass die meisten dimeren Repressoren symmetrisch sind, so kommt es nicht unerwartet, dass die meisten Operatoren kurze, umgekehrte Sequenzwiederholungen (inverted repeats) darstellen (Lewis, 1996, Galan, 2003). Man kann sich den Operator also als zwei Halbelemente vorstellen, von denen jedes ein Monomer des dimeren Repressorproteins bindet.

Bei vielen dimeren Repressoren ragt eine α -Helix in die große Furche der DNA-Helix. Diese α -Helix bezeichnet man als Erkennungshelix (sequenz-reading-Helix), da die meisten Aminosäureseitenketten, welche mit der DNA in Kontakt treten, von dieser

Helix stammen. Im Allgemeinen bildet ein einziges Repressormolekül zu wenige Wechselwirkungen aus, um sich stabil mit der DNA zu verbinden. Ein Repressordimer bildet jedoch doppelt so viele Wechselwirkungen wie das Monomer, so dass sich der Repressor auf diese Weise mit höherer Affinität an die Operatorsequenz binden kann. Die Erkennungshelix, die aus der Oberfläche des bakteriellen Repressors herausragt und durch das Eindringen in die große Furche der DNA die DNA-Sequenz erkennt, wird normalerweise in der Proteinstruktur teilweise durch hydrophobe Wechselwirkungen mit einer zweiten α -Helix stabilisiert. Dieses in sich rückläufige Strukturelement, das sich bei zahlreichen bakteriellen Repressoren findet, bezeichnet man als „helix-turn-helix-motif“ (Kimsey, 2003).

Das oben beschriebene *lac*-Operon in *Escherichia coli* ist eines der am besten untersuchten regulatorischen Systeme in Prokaryonten. Das Operon besteht neben seinen regulierenden Elementen aus Gensequenzen für drei spezifische Enzyme, die in der Zelle synthetisiert werden und die im Lactosestoffwechsel des Bakteriums unerlässlich sind. Ihre Synthese unterliegt einer negativen Kontrolle durch das Substrat selbst.

1966 isolierten Benno Müller-Hill und Walter Gilbert den *lac*-Repressor des *lac*-Operons in *Escherichia coli* unter Ausnutzung seiner Eigenschaft ^{14}C -markiertes IPTG zu binden und zeigten damit, dass es sich bei dem Repressor um ein Protein handelt (Gilbert, Müller-Hill, 1966). Der *lac*-Repressor konkurriert dabei mit der RNA-Polymerase um die Bindungsstelle am *lac*-Operon (Gilbert et al., 1975). Der *lac*-Repressor ist ein Homotetramer, der in Abwesenheit des Induktors unspezifisch an die Duplex-DNA binden kann, jedoch mit ungleich höherer Affinität an die spezifischen *lac*-Operatorsequenzen. Er besteht aus vier Domänen: dem aminoterminalen Kopfstück, welches für die Operatorbindung verantwortlich ist, einem Scharnierstück, welches das Kopfstück mit dem Kernstück verbindet, dem Kernstück, welches für die Bindung des Induktors und die Dimerformation zuständig ist und der carboxyterminalen Helix, die für die Tetramerformation verantwortlich ist. Die Struktur des Kernstücks und des carboxyterminalen Endstücks wurde 1995 entdeckt (Friedman et al. 1995).

Bei der bakteriellen Genregulation findet man häufig mehr als eine einzelne Operatorsequenz (Kimsey, 2003, Galan, 2003, Lewis, 1996).

Bei *Escherichia coli* z.B. findet man drei Operatorregionen: O1 als Hauptoperatorsequenz, O2 und O3 als zusätzliche Operatoren, insgesamt im Abstand von 500 bp (Lewis, 1996).

Der Repressor-Operator-Komplex kann mit Hilfe mehrerer Operatoren stabiler ausgebildet werden. Dabei binden zwei Untereinheiten des Repressortetramers an O1, O2 oder O3, die zwei übrigen Untereinheiten können dann an einen der zwei anderen Operatoren, unter Ausbildung eines DNA-Loop, binden.

Die zusätzlichen Operatoren sind also besonders bei niedrigen Konzentrationen des Repressorproteins und bei räumlicher Nähe zum Hauptoperator im Falle des *lac*-Operons wirksam (Müller-Hill, 1998). In der Kristallographie konnte gesehen werden, dass ein Repressor-Tetramer synergistisch mit einem Hilfsprotein (CAP, catabolite gene activator protein) wirkt (Lewis, 1996).

Auch bei dem Bakterium *Comamonas testosteroni* konnten diese bekannten Mechanismen der Genregulation nachgewiesen werden. So wird die 3 α -HSD/CR beispielsweise nur bei Vorliegen eines Steroids exprimiert und entspricht somit dem Regulationsmechanismus des Lactosestoffwechsels in *Escherichia coli*, der Substratinduktion. Auch die Bindung eines Repressors in *Comamonas testosteroni* ähnelt dem Mechanismus des *lac*-Repressors, das dimere Repressorprotein bindet gleichzeitig an zwei Operatoreinheiten und die dazwischen liegende DNA bildet dadurch eine Schleife (Loop) aus. Durch diese stabile Bindung des Repressors an die DNA wird die Expression der 3 α -HSD/CR unterdrückt.

5 Zusammenfassung

Schon lange ist der Steroidmetabolismus in Bakterien der Inhalt intensiver Forschung. Das Bakterium *Comamonas testosteroni* bietet sich ideal als Organismus für Forschung auf diesem Gebiet an. Es handelt sich hierbei um ein gram-negatives, aerobes Stäbchen aus der Familie der *Comamonaceae*, welches Steroide metabolisieren kann. Sowohl die für den Abbau notwendigen Enzyme als auch die Transport- und Bindeproteine werden jedoch nicht kontinuierlich produziert, sondern unterliegen einer sogenannten Substratinduktion. Das bedeutet, dass nur beim Vorliegen eines bestimmten Substrates die für den Abbau notwendigen Enzyme und Proteine exprimiert werden. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig bekannt, obwohl einige, für den Abbau notwendige Enzyme identifiziert worden sind. Bei dem Schlüsselenzym des Steroidabbaus handelt es sich um die sogenannte 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase, welche die Spaltung des B-Ringes katalysiert und damit den weiteren Abbau des Steroids ermöglicht. Nachdem das Gen für die 3α -HSD/CR (*hsdA*) identifiziert worden war, konnten zwei Repressorgene, *repA* und *repB*, lokalisiert werden, welche sowohl in die Transkription als auch Translation des Gens eingreifen. Außerdem konnten zwei Operatoren, OP1 und OP2, mit einem Abstand von 1.644 kb, identifiziert werden. RepA bindet an diese beiden Operatoren und blockiert somit die Transkription der *hsdA*.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, wie der Abstand der beiden Operatoren die Expression der 3α -HSD/CR beeinflusst. Hierzu benutzten wir *E. coli* Zellen, welche mit Plasmiden transformiert wurden und somit unterschiedliche Deletionen zwischen den beiden Operatoren besaßen. Wir stellten die Theorie auf, dass sich eine Schleife (Loop) zwischen den beiden Operatoren ausbildet und sie dadurch in die optimale Position für die Bindung des RepA bringt. Dieser Mechanismus wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass sich bei einer Verkürzung des Operatorenabstandes die Menge an exprimierter 3α -HSD/CR erhöhte. Zusätzlich zu den Abstandsänderungen wurden noch Deletionen von jeweils -3, -5, und -7 nt durchgeführt was zur Rotation der DNA und damit zu unterschiedlichen Anordnungen der zwei Operatoren zueinander führte. Unsere Ergebnisse zeigten, dass bei einem kurzen Abstand zwischen den zwei Operatoren der Einfluß der -3, -5 und -7 Deletionen wesentlich größer ist und die Expression der 3α -HSD/CR somit stärker beeinflusst wird.

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand darin, zu untersuchen ob und in welchem Ausmaß die Bindung eines „Fis“-Proteins die Expression der 3 α -HSD/CR beeinflusst. „Fis“ bedeutet Faktor für inverse Stimulation und wird häufig zur Erforschung komplexer Genregulation hinzugezogen. Das DNA-bindende Protein wird kontinuierlich in *E. coli* exprimiert, wobei die Bindungsaffinität des „Fis“-Proteins an seine entsprechende Bindungsstelle relativ gering ist und somit durch entsprechende Systeme leicht unterdrückt werden kann. Wir klonierten das 110 nt große „fis“-bindende Element in das DNA-Stück zwischen den beiden Operatoren, nachdem vorher ein entsprechend großes Stück herausgeschnitten wurde. Auch von diesem Plasmid wurden wieder -3, -5, und -7 Deletionen angefertigt. Anschließend wurden die hergestellten Plasmide in *E. coli* Zellen transformiert, einerseits in „Fis“-Gen enthaltende, andererseits in „Fis“-Gen knock-out Mutanten. Unsere Ergebnisse ergaben, dass sowohl die „Fis“-Wildtyp, als auch die „Fis“-knock-out Mutanten eine höhere Expression der 3 α -HSD/CR ergaben. Dies bestätigte unsere Erwartungen, dass das „Fis“-Protein die Bindung des RepA an die beiden Operatoren blockiert und somit die Expression der 3 α -HSD/CR ansteigt.

Alle Versuche wurden mit gängigen Labormethoden durchgeführt, wobei als Wirtsbakterium *E. coli* HB101 und als Vektor für die hergestellten Plasmide pUC18 bzw. pK18 verwendet wurde. Mittels Ligation wurden die durch Restriktionsendonukleasen hergestellte DNA-Fragmente in den Vektor eingebracht und anschließend in *E. coli* Zellen transformiert. Die exprimierte Menge an 3 α -HSD/CR wurde mittels ELISA gemessen.

Die Regulationsmechanismen des Steroidmetabolismus sind auch weiterhin Inhalt aktueller Experimente der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser und werden somit weiterhin dazu beitragen, die Regulation der 3 α -HSD/CR zu verstehen und weiter aufzudecken. Diese Ergebnisse können einerseits für therapeutische Konsequenzen in der Medizin andererseits für ökologische Zwecke verwenden. In Bezug auf die Medizin spielen dabei Cholesterinsenkende Organismen eine Große Rolle, während von ökologischen Gesichtspunkten aus gesehen sicherlich die Bereinigung kontaminierter Umwelt eine große Rolle spielt.

6 Literaturverzeichnis

Adhya S., Geanacopoulos M., Lewis D.E., Roy S., Aki T. (1998): Transcription regulation by repressosome and by RNA polymerase contact. *Quant Biol.* **63** 1-9

Aki T., Choy H.E., Adhya S. (1996): Histone-like protein HU as a specific transcriptional regulator: co-factor role in repression of gal transcription by Gal repressor. *Genes Cells* **1** 179-188

Barbaro D.J., Mackowiak P.A., Barth S.S., Southern P.M. (1987): *Pseudomonas testosteroni* infections: eighteen recent cases and a review of the literature. *Rev. Inf. Dis.* **9** 124-129.

Bortolini O., Medici A., Poli S. (1997): Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Steroids* **62** 564-577

Beer de T. et al. (2002): Insights into specific DNA recognition during the assembly of a viral genome packaging machine. *Mol. Cell* **9** 981-991

Bergeron J., Ahmad D., Barriault D., Larose A., Sylvestre M. (1994): Identification and mapping of the gene translation products involved in the first steps of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl/chlorophenyl biodegradation pathway. *Can J. Microbiol.* **40** 743-753

Bertemier M., Galas D.J., Chandler M. (1994): Interaction of Fis protein with DNA: bending and specificity of binding. *Biochemie* **76**, 958-967.

Bomba A., Gancarcikova S., Nemcova R., Herich R., Kastel R., Depta A., Demeterova M., Ledeck V., Zitan R. (1998): The effect of lactic acid bacteria on intestinal metabolism and metabolic profile in gnotobiotic pigs. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* **105** (10) 384-9

Boyer J., Baron D.N., Talalay P. (1965): Purification and properties of a 3- α -hydroxysteroid dehydrogenase from *C. testosteroni*. *Biochemistry* **4** 1825-1833

Carr N.G., Craig I.W. (1970): Phytochemistry and phylogeny (Ed. Harborne, J.N.), Academic Press, London

Cerniglia, C.E. (1984): Mikrobial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. Adv Appl Microbiol **30** 31-71

Cheng K.C., White P.C., Qin K.N. (1991): Molecular cloning and expression of rat liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. Mol. Endocrinol. **5** 823-828

Cosma M.P., Panizza S., Nasmyth K. (2001): Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. Mol. Cell **7** 1213-1220

Coulter A.W., Talalay P. (1968): Studies on the microbiological degradation of steroid ring A. Biol. Chem. **243** 3238-3247

Deepak D., Khare A., Khare M.P. (1989): Plant pregnanes. Phytochemistry **28** 3255-3262

Dellweg H, Schmid R.D., Trommer W.E. (1992): Römpp Lexikon Biotechnologie. Stuttgart-New York: Thieme Verlag. 882 pp

De Smet I., De Boever P., Verstrat W. (1998): Cholesterol lowering in pigs through enhanced bile salt hydrolase activity. Br. J. Nutr. **79** 185-194.

Dorman C.J., Deighan P. (2003): Regulation of gene expression by histone-like Proteins in bacteria. Curr. Opin. Genet. Dev. **13** 179-184

Drobnic K., Krizajj I., Gubensek F., Komel R. (1993): Improved purification of steroid 1,2-dehydrogenase from *Nocardia opaca* and partial characterization of its cloned gene sequence. Biochem. Biophys. Res. Com **190** 509-515

Dunn T.M., Hahn S., Ogden S., Schleif R.F. (1984): An operator at -280 base pairs that is required for repression of araBAD operon promoter: addition of DNA helical

turns between the operator and promoter cyclically hinders repression. Proc. Natl Acad. Sci. USA **81** 5017-5020

Echols H. (1990): Nucleoprotein structures initiating DNA replication transcription and site-specific recombination. J. Biol. Chem. **265** 14697-14700

Eltis L.S., Bolion J.T. (1996): Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. J. Bacteriol. **178** 5930-5937

Finkel S.E., Johnson R.C. (1992): The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. Mol. Mikrobiol. **6** 3257-3265

Friedman A.M., Fischmann T.O., Steitz T.A. (1995): Crystal structure of lac repressor core tetramer and its implications for DNA looping. Science **268 (5218)** 1721-7

Forth W., Rummel W., Henschler D., Starke K., Förstermann U. (2001): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Verlag Urban und Fischer. 1280 Seiten

Galan B., Kolb A., Sanz J.M., Garcia J.L., Prieto M.A. (2003): Molecular determinants of the hpa regulatory system of *Escherichia coli*: the HpaR repressor. Nucleic Acids Res. **31** 6598-609

Garcia Valdes E., Cozar E., Rotger E., Lalucat J., Ursing J. (1988): New naphthalene-degrading marine *Pseudomonas* strains, Appl. Envir. Microbiol. **54** 2478-2485

Geuns J.M.C. (1977): Steroid hormones and plant growth and development. Phytochemistry **17** 1-14

Gibson D.T., Wang K.C., Sih C.J., Whitlock H. (1966): Mechanism of steroids oxidation by microorganisms. On the mechanism of ring A cleavage in the degradation of 9, 10- seco steroids by microorganisms, J. Biol. Chem. **241** 551-559

Gilardi G. L. (1985): Chapter 30, *Pseudomonas*. In: Lette E. H., Balows A., Hausler W. J., Shadomy H. J. (ed), Manual of clinical microbiology, S. 350-372. 4th edition. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.

Gilbert W., Müller-Hill B. (1966): Isolation of the lac-Repressor. Proc. Nat. Aca. Sci. **56** 1891-1898

Gilbert W., Gralla J., Majors J., Maxam A. (1975): Lactose operator sequences and the action of the Lac-Repressor. Protein-ligand Interactions. Edited by Sund H., Blauer G., Berlin, de Gruyter, 193-206

Gujer W.(1999): Siedlungswasserwirtschaft. Berlin Heidelberg: Springer Verlag. 410

Harayama S., Kok M., Neidle E.L. (1992): Functional and evolutionary relationship among diverse dioxygenases. Annu. Rev. Microbiol. **46** 565-601

Harayama S., Reikik M. (1989): Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. J. Biol. Chem. **264** 15328-15333

Harries J. E., Sheahan D. A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J. P., Tyler T., Zaman N. (1997): Estrogenic activities in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. Env. Toxicol. Chem. **16** 534-542

Heftmann E. (1975): Functions of steroids in plants. Phytochemistry **14** 891-90

Hirvonen C.A., Ross W., Wozniak C.E., Marasco E., Anthony J.R. et al. (2001): Contributions of UP elements and the transcription factor FIS expression from the seven rrn P1 promoters in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183** 6305-6314

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994): Bergy's manual of determinative bacteriology (Ed. Hensyl W.R.) Williams and Wilkins, Baltimore

Hyun-Sook Choi, Kwan-sun K., Jeong W.P., Young H.J., Younghoon L. (2004): Effects of Fis Protein on rnpB Transkription in *Escherichia coli*. *Mol. Cells*. **19**, 239-245

Irani M., Orosz L., Adhya S. (1983): A control element within a structural gene: the gal operon of *Escherichia coli*. *Cell* **32** 783-788

Jez J.M., Bennett M.J., Schlegel B.P., Lewis M., Penning T.M. (1997): Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem.* **326** 625-636

Jianming H., Nagpal P., Vitart V., McMorris T.C., Chory J. (1996): A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis. *Science* **272**, 398-401

Jose, V.; Leiber, S. (2003): DNA Looping and Physical Constraints on Transcription Regulation. *JBC* **331** (5) 981-989

Jörnvall H., von Bahr-Lindström H., Jany K.D., Ulmer W., Fröschle M. (1984): Extended superfamily of short alcohol-polyol-sugar dehydrogenases: Structural similarities between glucose ribitol dehydrogenases. *FEBS Lett.* **165** 190-196

Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzales-Duarte R., Jeffery J., Ghosh D. (1995): Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR). *Biochem.* **34** 6003-6013

Kallipolitis B.H., Norregaard-Madsen M., Valentin-Hansen P. (1997): Protein-protein communication: structural model of the repression complex formed by CytR and the global regulator CRP. *Cell* **89** 1101-1109

Kannenbergh E.L., Perzl M., Müller P., Härtner T., Poralla K. (1996): Hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* and other plant-associated bacteria and cloning of the *Bradyrhizobium japonicum* squalene-hopene cyclase gene. *Plant and soil* **186** 107-112

Kar S., Adhya S. (2001): Recruitment of HU by piggyback: a special role of GalR in repressosome assembly. *Genes Dev.* **15** 2273-2281

Karlson P. (1983): Why are so many hormones steroids? Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. **364** 1067-1087

Kieslich K. (1986): Production of drugs by microbial biosynthesis and biotransformation. Drug Res. **36** 888-892

Kimsey H.H., Waldor M.K. (2003): The CTXphi repressor RstR binds DNA cooperatively to form tetrameric repressor-operator complexes. J. Biol.Chem. **279** 2640-7

Knippers R. (1997): Molekular Genetik. Stuttgart- New York: Georg Thieme Verlag. 508 Seiten

Kramer H., Niemoller M., Amouyal M., Revet B., von Wilcken-Bergmann B., Mueller-Hill B. (1987): Lac repressor forms loops with linear DNA carrying two suitably placed lac operons. EMBO J. **6** 1481-1491

Lefebvre Y., Schulz R., Groman E.V., Watanabe M. (1979): Localisation of 3-beta- and 17-beta- hydroxysteroid dehydrogenase in *Pseudomonas testosteroni*. J. Steroid Biochem. **10** 523-528

Leppik R.A. (1989): Steroid catechol degradation: Disecoandrosterone intermediates accumulate by *Pseudomonas* transposon mutant strains. J. Gen. Microbiol. **135** 1979-1988

Leppik R.A., Sinden D.J. (1987): *Pseudomonas* mutant strains that accumulate androstane and seco- androstane intermediates from bile acids. Biochem.Jl. **243** 15-21

Levy H.R., Talalay P. (1959): Bacterial oxidation of steroids. II. Studies on the enzymes mechanism of the ring A dehydrogenation. J. Biol. Chem. **234** 2014-2021

Lewis M., Chang G., Horton N.C., Kercher M. A., Pace H.C., Schumacher M.A., Brennan R.G., Lu P. (1996): Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. Science 1247-1254

Lewis D.M.A., Geanacopoulos M., Adhya S. (1999): Roles of HU and DNA supercoiling in transcription repression: specialized nucleoprotein repression complex at gal promoters in *Escherichia coli*. *Mol. Mikrobiol.* **31** 451-462

Locher H.H., Leisinger T., Cook A.M. (1989): Degradation of p-toluenesulphonic acid via sidechain oxidation, desulphonation and meta ring cleavage in *Pseudomonas (Comamonas) testosteroni* T-2. *J. Gen. Microbiol.* **135** 1969-1978

MacDonald I.A., Jellett J.F., Mahony D.E., Holdeman L.V. (1979): Bile salt 3-alpha- and 12-alpha-hydroxysteroid dehydrogease from *Eubacterium lentum* and related organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **37** 992-1000

MacDonald I.A., Meier E.C., Mahony D.E., Costain G.A. (1976): 3-alpha-, 7-alpha- and 12-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activities from *Clostridium perfringens*. *Biochem. Biophys. Acta* **450** 142-153

Mackenzie A.S., Brassell S.C., Eglinton G., Maxwell J.R. (1982): Chemical fossils: The geological fate of steroids. *Science* **217** 491-504

Majumdar A, Adhya S. (1984): Demonstration of two operator elements in gal: in vitro repressor binding studies. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **81** 6100-6104

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (1997): Brock biology of microorganisms. Prentice-Hall International, London

Marcus P.I., Talalay P. (1956): Induction and purification of alpha- and beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* **218** 661-674

Maser E. (1995): Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. The pluripotency of several hydroxysteroid dehydrogenases. *Biochem. Pharmacol.* **49** 421-440

Maser E., Oppermann U.C., Bannenberg G., Netter K.J. (1992): Functional and immunological relationships between metyrapone reductase from mouse liver microsomes and 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*.

FEBS Lett. **297** 196-200

Maser E., Xiong G., Grimm C., Ficner R., Reuter K. (2001): 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl-reductase from *Comamonas testosteroni*: Biological significance, three-dimensional structure and gene regulation. Chem. Biol. Inter. **130-132** 707-722

Meer van der J.R., de Vos W.M., Harayama S., Zehnder A.J. (1992): Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol. **56** (4) 677-94

Möbus E., Jahn M., Schmid R., Jahn D., Maser E. (1997): Testosterone-regulated expression of the enzymes involved in steroid and hydrocarbon catabolism in *Comamonas testosteroni*, J. Bacteriol. **179** 5951-5955

Möbus E., Maser E. (1998): Molecular cloning, overexpression and characterization of steroid-inducible 3 α -hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonylreductase from *Comamonas testosteroni*, J. Biol. Chem. **273** 30888-30896

Molnar I., Choi K.P., Yamashita M., Murooka Y. (1995): Molecular cloning, expression in *Streptomyces lividans*, and analysis of a gene cluster from *Arthrobacter simplex* encoding 3-ketosteroid-dehydrogenase, 3-ketosteroid-isomerase and a hypothetical regulatory protein. Mol. Microbiol. **15** 895-905

Müller-Hill B. (1998): Some repressors of bacterial transcription, Curr. Opin. Microbiol. **1** 145-151

Müller-Hill B. (1998): The function of auxiliary operators, Molec. Microbiol. **29** 13-18

Muskhelishvili G., and Travers A. (2003): Transcription factors as a topological homeostat. Front. Biosci. **8** d279-285

Nash H.A. (1996): The *E. coli* HU and IHF proteins; accessory factors for complex protein-DNA assemblies. R. G. Landes Company, Georgetown, TX, 149-179

Oppermann U.C.T. (1995): Funktionelle and strukturelle Homologien einer evolutionären konservierten Klasse von Carbonyl-Reduktasen und Steroid-Dehydrogenasen. Dissertation, Tectum Verlag, Marburg

Oppermann U.C.T., Belai I., Maser E. (1996): Antibiotic resistance and enhanced insecticide catabolism as consequences of steroid induction in the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **58** 217-223

Oppermann U.C.T., Maser E.(1996): Characterization of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonylreductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*, Eur. J. Biochem. **241** 744-749

Oppermann U.C.T., Filling C., Berndt K.D., Persson B., Benach J., Ladenstein R., Jörnvall H. (1997): Active site directed mutagenesis of 3 β -/17 β -hydroxysteroid dehydrogenase establishes differential effects on short-chain dehydrogenase/reductase reactions. Biochemistry **36** 34-40

Oppermann U.C.T., Netter K.J., Maser E. (1993): Carbonyl reduction by 3 α -HSD from *Comamonas testosteroni*- new properties and its relationship to the SCAD family. Adv. Exp. Med. Biol. **328** 379-390

Oppermann U.C.T., Netter K.J., Maser E. (1995): Cloning and primary structure of murine 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenase/microsomal Carbonyl reductase. Eur. J. Biochem. **227** 202-208

Ourisson G., Rohmer M., Poralla K. (1987): Procaryotic hopanoids and other sterol surrogates. Ann. Rev. Microbiol. **41** 301-333

Pepper I.L., Gentry T.J., Newby D.T., Roane T.M., Josephson K.L. (2002): The role of cell bioaugmentation and gene bioaugmentation in the remediation of co-contaminated soils. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 6 943-6

Persson B., Krook M., Jörnvall H. (1991): Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes.

Eur. J. Biochem. 200 537-543

Plesiat P., Nikaido H. (1992): Outer membranes of gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Mol. Microbiol.* 6 1323-1333

Pousette A. and Carlström K. (1984): Partial characterisation of an androgen-induced androgen-binding protein in *Pseudomonas testosteroni*. *A. Chem. Scan. B* 40 433-438

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

Purdom C. E., Hardiman P. H., Bye V. J., Eno N. C., Tyler C. R., Sumpter J.P. (1994): Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology* 8 275

Redmont J.W., Batley M., Djordjevic R.W., Innes R.W., Kuempel P.L., Rolfe B.G. (1986): Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323 632-635

Rippen G. (1992): *Handbuch Umweltchemikalien*. Landsberg am Lech: ecomed Verlag

Rogan W.J. (1982): PCBs and cola-colored babies, Japan, 1968 and Taiwan, 1979. *Teratology* 26 259-261

Ross W., Thompson J.F., Newlands J.T., Gourse R.L. (1990): *E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *vivo*. *EMBO* 9 3733-3742

Roy A.L., Meisterernst M., Pognonec P., Roeder R.G. (1991): Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* **394** 245-248

Russell D.W. (1996): Green light for steroid hormones. *Science* **272** 370-371

Santero E., Hoover T.R., North A.K., Berger D.K., Porter S C., Kustu S. (1992): Role of integration host factor in stimulating transcription from the σ^{54} -dependent nifH promoter. *J. Mol. Biol.* **227** 602-620

Santodonato J. (1997): Review of the esrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carciogeneti. *Chemosphere* **34** 835-848

Sawhney B.L. (1986): Chemistry and properties of PCB in relation to environmental effects, S47-67. In J. S. Waid (ed.): *PCB and the environment*, Vol. 1 CRC Press, Boca Raton

Schleif R. (1992): DNA looping. *Annu Rev. Biochem* **61** 199-223

Schneider R., Travers A., Muskhelishvili G. (1997): FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherischia coli*. *Mol. Mikrobiol.* **26** 519-530

Schneider R., Travers A., Kutateladze T., Muskhelishvili G., (1999): A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*, *Mol.Microbiol.***35** 953-964

Schubert K., Rose G., Tümmeler R., Ikekawa N. (1964): Sterine in *Escherichia coli*. *Hoppe-Seyler`s Z. Physiol.Chem.* **339** 293-296

Schubert K. (1967): Neue Aspekte der Biosynthese, des Stoffwechsels und des Abbaues von Steroiden in Mikroorganismen. *Z. Chem.* **7** 289-297

Semsey S., Geanacopoulos M., Dale E.A., Lewis and Sankar A. (2002): Operator bound GalR dimer close DNA loops by direct interaction: tetramerization and inducer binding. *The EMBO Journal* Vol. 21 No.16 4349-4356

Shikita M. und Talalay P. (1979): Preparation of highly purified 3 α - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. *Anal. Biochem.* **95** 286-292

Sonnenwirth A.C. (1970): Bacteriemia with and without meningitis due to *Yersinia enterocolitica*, *Edwardsiella tarda*, *Comamonas terrigena* and *Pseudomonas maltophilia*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **174** 488-502

Springael D., Top E.M. (2004): Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends Microbiol* **12** 53-8

Stackebrandt E., Murray R.G.E., Trüper H.G. (1988): Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Sys. Bacteriol.* **38** 321-325

Stonecipher K.G., Jensen H.G., Kastl P R., Faulkner A., Rowsey J.J. (1991): Ocular infections with *Comamonas acidovorans*. *Am. J. Ophthalmol.* **112** 46-49

Su W., Porter S., Kustu S., Echols H. (1990): DNA looping and enhancer activity, association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc. Natl Acad. Sci.USA* **87** 5504-5508

Suzuki K., Ueda S., Sugiyama M., Imamura S. (1993): Cloning and expression of a *Pseudomonas* 3-alpha- hydroxysteroid dehydrogenase- encoding gene in *Escherichia coli*. *Gene* **130** 137-140

Talalay P., Dobson M.M., Tapley D.E. (1952): Oxidative degradation of testosterone by adaptive enzymes. *Nature* **170** 620-621

Talalay P. und Wang V. (1955): Enzymatic isomeration of 5-3-ketosteroids. *Biochem. Biophys. Acta* **18** 300-301

Talalay P., Marcus P.I. (1956): Specificity, kinetics, inhibition of alpha- and beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J.Biol. Chem.* **218** 675-691

Tamaoka J., HA D.M., Komagata K. (1987): Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. Nov. and *Comamonas testosteroni* comb. Nov. with an emended description of the genus *Comamonas*. *Int. J. Bacteriol.* **37** 52-59

Thomas J.E., Carrol R., Po L., Watanabe M. (1989): Isolation and characterization of a 50 kDa testosterone binding protein from *Pseudomonas testosteroni*. *J.Steroid. Biochem.* **32** 27-34

Thomas J.O., Travers A.A. (2001): HMG1 and 2 and related árcitectural´ DNA-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **26** 167-174

Tomkins G.M. (1956): A mammalian 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *J.Biol.Chem.* **218** 437-447

Top E.M., Springael D., Boon N. (2002): Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *FEMS Microbiol Ecol* **42** 199-208

Tschesche R., Wulff G. (1965): Über die antimikrobielle Wirksamkeit von Saponinen. *Z. Naturforschg.***20** 543-546

Uwajima T., Takayama K., Terada O. (1978).: Production, purification and crystallization of 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Agril. Biol. Chem.* **42** 1577-1583

Vischer E., Wettstein A. (1958): Enzymatic transformations of steroids by microorganisms. *Adv. Enzymol* **20** 237-282

Wacker A., Drews J., Pratt W.B., Laurent H., Petzold K. (1965): Enzyminduktion mit Steroiden bei *Pseudomonas testosteroni*. *Z. Naturforschg.* **20b** 547-553

Wang K.C., Sih C.J. (1963): Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. IV. Seco intermediates. *Biochemistry* **2** 1238-1243

Wassem R., deSose E.M., Yates M.G., Pedrosa F.D., Buck M. (2000): Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent nifA promoter. *Mol. Microbiol.* **35** 756-764

Watanabe M., Phillips K., Watanabe H. (1973): Induction of steroid-binding activity in *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem* **4** 623-632

Watanabe M., Po L. (1974): Testosterone uptake by membrane vesicles of *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **4** 623-632

Watanabe M., Watanabe H. (1974): Periplasmatic steroid-binding proteins and steroid transforming enzymes of *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **5** 439-446

Wettermark M.H., Taylor J.R., Rogers M.L., Heath H.E. (1979): Metabolism of carbohydrate derivatives by *Pseudomonas acidovorans*. *J. Bacteriol.* **138** 418-424

Xiong G., Martin H.J., Blum A., Schäfers C., Maser E. (2001): A model on the regulation of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase expression in *Comamonas testosteroni*, *Chem. Biol. Interact.* **130-132** 723-736

Xiong G., Maser E. (2001): Regulation of the steroid-inducible 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase Gene in *Comamonas testosteroni*, *J. Biol. Chem.* **276** 9961-9970

Xiong G., Martin H., Maser E. (2003): Characterization and recombinant expression of the translational repressor RepB of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*, Chem. Biol Interact. **143-144** 425-433

Yusuf S., Wittes J., Friedman L. (1988): Overview of results of randomized clinical trials in heart disease. II. Unstable angina, heart failure, primary prevention with aspirin, and risk factors modification. J. Amer. Med. Ass. **260** 2259-2263

7 Anhang

Curriculum vitae

Angaben zur Person

Name, Vorname	Markowetz, Stefanie Bernadette
Geburtsdatum	04.11.1977
Geburtsort	Brüssel/Belgien
Familienstand	ledig
Konfession	römisch-katholisch
Nationalität	deutsch

Schulische Ausbildung

1983 - 1988	Grundschule Großseelheim
1988 - 1994	Gymnasium, Stiftsschule St.Johann, Amöneburg
1994 - 1995	Putney school, Vermont, USA
1995 - 1997	Stiftsschule, St. Johann, Amöneburg mit Abschluss des Abiturs

Universitäre Ausbildung

1998 - 2002	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
2002 - 2004	Studium und Erlangung der Approbation an der Technischen Universität München.
2003 - 2004	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Rechts der Isar in München, dem Deutschen Herzzentrum in München, sowie an der NYU medical school in New York
seit 2001	Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. E. Maser

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Prof. Dr. R. Arnold, Prof. Dr. Bach, Prof. Dr. phil. Dr. med. habil. H.-D. Basler, Prof. Dr. P. J. Barth, Prof. Dr. med. E. Baum, PD Dr. H. Becker, Prof. Dr. Y. Cetin, PD Dr. Christiansen, Prof. Dr. Dr. J. Daut, Prof. Dr. M. Eilers, Prof. Dr. med. L. Gotzen, Prof. Dr. med. Griss, PD Dr. med. L. Hesse, Prof. Dr. R. Hofmann, Prof. Dr. H. Jungclas, Prof. Dr. H.F. Kern, Prof. Dr. med. H.-D. Klenk, Prof. Dr. J. C. Krieg, Prof. Dr. E. Lammel, Prof. Dr. R. Lang, Prof. Dr. R. Moll, Prof. Dr. R. Mutters, Prof. Dr. W. H. Oertel, Prof. Dr. med. H. Renz, Prof. Dr. H. Schäfer, Prof. Dr. G. Suske, Dr. R. Westermann, Prof. Dr. med. H. Wulf

Meine akademischen Lehrer in München waren:

Prof. Dr. W. Arnold, Dr. B. Brunner, Prof. Dr. B. Conrad, Prof. Dr. Hans Förstl, Prof. Dr. med. H. Greim, Prof. Dr. E. Kochs, Prof. Dr. F. Mader, Prof. Dr. med. M. Mertz, Prof. Dr. Nowak, Prof. Dr. J. Peters, Prof. Dr. med. Dr. phil J. Ring, Prof. Dr. A. Schömig, Prof. Dr. J. R. Siewert

Meine akademischen Lehrer in New York, USA waren:

Prof. Dr. Blum, Dr. Gamagaris

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Maser für die Überlassung des Themas sowie die kompetente und stets motivierende Unterstützung. Besondere Betonung verdient in diesem Zusammenhang der extrem freundliche Umgangston und das gute Klima innerhalb der Arbeitsgruppe, was neben dem Engagement jedes Einzelnen im besonderen auf die kollegiale Leitung der Gruppe durch Herrn Prof. Dr. E. Maser zurückzuführen ist.

Unerlässlich für die Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit war mein Betreuer Herr Dr. G. Xiong, welchem ich ganz besonders dankbar bin für die freundliche und kompetente Unterstützung und welcher mir einen Einstieg in die Molekulargenetik ermöglichte und bei allen Fragen und Problemen hilfreich zur Seite stand.

Außerdem bedanke ich mich ausdrücklich bei allen Mitarbeitern der gesamten Arbeitsgruppe, ohne die ich sicherlich das eine oder andere Mal den Mut und mein Durchhaltevermögen verloren hätte. Auch fachlich halfen sie mir immer weiter und unterstützten mich nach allen Möglichkeiten.

Zuletzt möchte ich mich an die Menschen wenden, denen ich eher im menschlichen als im wissenschaftlichen Sinne danken möchte. Als erstes meiner Familie, welche mir die Möglichkeit gegeben haben meinen Weg zu gehen und mich stets in allen meinen Vorhaben unterstützten und ohne die ich sicherlich niemals so weit gekommen wäre. Außerdem meinen Freundinnen und Freunden, im insbesondere Frau Dr. C. Kliebe, Frau Dr. J. Cleuziou und PD. Dr. W. Eichinger, welche entweder mit gutem Beispiel vorgegangen waren und mit ihrer fertigen Dissertation mein schlechtes Gewissen weckten oder sich in der gleichen Lage wie ich befanden und mir bei dem täglichen Gang ins Labor oder die Bibliothek Beistand leisteten.

Publikationen

Originalpublikationen

G. Xiong, Stefanie Markowetz, Edmund Maser (2003): Regulation of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*: function and relationship of two operators. *Chemico-Biological Interaction* 143-144 (2003) pp 411-423

Poster/ Kongreßbeiträge

S. Markowetz, G.Xiong,E. Maser

The function of two Operator-Sequences in regulation of 3 α -hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonylreductase in *Comamonas testosteroni*

43. Spring Meeting, Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie. March 12-14, 2002 Mainz pp122

„Abstract“

Comamonas testosteroni (*C. testosteroni*) 3 α -hydroxysteroid-dehydrogenase/carbonyl reductase (3 α -HSD/CR) is a key enzyme in the degradation of steroid compounds in soil, and may therefore play a significant role in the bioremediation of hormonally active substances in the environment. We previously reported the isolation of the 3 α -HSD/CR gene (*hsdA*) from *C. testosteroni* and two repressor genes, *repA* and *repB*, for *hsdA* transcriptional and translational regulation, respectively. In this work, we found that the expression of 3 α -HSD/CR is closely connected to the distance between two 10 bp operator elements (OP1 and OP2) to which the RepA protein binds and therefore blocks the transcription of *hsdA*. The two 10 bp palindromic operator sequences are located upstream of *hsdA* (at 0.935kb and at 2.568 kb on an *EcoRI* fragment) and are separated by 1.644 kb. In order to elucidate how the distance between OP1 and OP2 influences the repression of *hsdA* expression, we used *E. coli* cells transformed with plasmids carrying a set of deletions between OP1 and OP2. Our theory that a “loop-structure” between the two operators is formed, which strongly influences *hsdA* transcriptional regulation, was proved by the increasing amounts of 3 α -HSD/CR expression when the distance between the operators was too small to form the “loop” structure. Moreover, additional -3, -5 and -7 nt deletions in each construct, known to result in DNA rotations and leading to altered orientations between the two operator sequences, reveal strong influences on *hsdA* expression the shorter the distance between the operator sequences, reveal strong influences on *hsdA* expression the shorter the distance between the operators was. Our results demonstrate that a *cis*-regulating “stem-loop” operator system is an important determinante in the regulation of the 3 α -HSD/CR gene in *C. testosteroni*.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Funktion zweier Operator-Sequenzen in der Regulation der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase von *Comamonas testosteroni*“ im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Maser und Betreuung durch Herrn Dr. G. Xiong ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde im Journal *Chemico-Biological Interactions* 2003 veröffentlicht.

München, im März 2006

Stefanie Markowetz