Umwelt-Genomik als Quelle für die Isolierung von neuen Operons und Genclustern aus mikrobiellen Konsortien

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Plamena Entcheva aus Gabrovo/Bulgarien

> > Göttingen 2001

D7 Referent: Prof. Dr. W. Liebl Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk Tag der mündliche Prüfung: 29.01.2002

Meiner Mutter Margarita gewidmet

Inhaltsverz	eichnis
IIIIIaito (CI L	eremino.

Inhaltsverzeichnis	<u> </u>
Inhaltsverzeichnis	Ι
Abkürzungen	VI
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	9
II.1. Organismen, Plasmide und Primer	9
II.2. Nährmedien und Zellanzucht	16
II.2.1. Nährmedien	16
II.2.1.1. Komplexmedien	16
II.2.1.2. Mineralmedien für die Biotinproduktion-Screening	18
II.2.2. Wachstumsbedingungen	22
II.2.2.1. Anzucht von Flüssigkulturen	22
II.2.2.2. Bestimmung der Zelldichte	22
II.2.3. Stammhaltung und Reinheitskontrolle	23
II.2.4. Zellernte	23
II.3. Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA	24
II.3.1. Behandlung von Geräten und Lösungen	24
II.3.2. Reinigung von Nukleinsäuren	24
II.3.2.1. Phenol/Chloroform Extraktion	24
II.3.2.2. Chloroform Extraktion	24
II.3.3. Fällung und Waschen von DNA	25
II.4. DNA-Isolierung	25
II.4.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus Standortproben	25
II.4.1.1. Reinigung der aus Umwelt isolierten DNA mit "Wizard TM Plus	
Minipreps DNA Purification System"	26
II.4.1.2. Reinigung der aus Umwelt isolierten DNA mit QIA Ex Kit	27
II.4.1.3. Dialyse von Gesamt-DNA	27

II.4.2. Isolierung von Gesamt-DNA aus Anreicherungskulturen	27
II.4.3. Isolierung chromosomaler DNA	28
II.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA	29
II.4.4.1. Minipräparation durch alkalische Lysis	29
II.4.4.2. Isolierung Plasmid-DNA aus Corynebacterium glutamicum	30
II.4.4.3. Adsorption an Silicagel	30
II.4.4.4. Anioneaustauschchromatographie	31
II.4.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
II.5. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	32
II.5.1. Standard-Agarosegelelektrophorese	32
II.5.2. Größenbestimung von Nukleinsäuren	33
II.6. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	33
II.7. Enzymatische Modifikation von DNA	33
II.7.1. Restriktionsspaltung	33
II.7.2. Herstellung von glatten Enden mit "Klenow-Fragment"	34
II.7.3. Ligation von DNA-Fragmanten	34
II.7.4. Nicht-radioaktive Markierung von DNA	35
II.8. Übertragung von DNA und Selektion rekombinanter Klone	36
II.8.1. Transduktion	36
II.8.1.1. Herstellung des "Freeze-Thaw" Lysates aus E. coli BHB 2688	36
II.8.1.2. Herstellung des Ultraschall-Lysates aus E. coli BHB 2690	37
II.8.1.3. Verpackung	38
II.8.1.4. Herstellung phagenkompetenter Zellen	39
II.8.1.5. Transduktion	39
II.8.1.5.1. Titerbestimmung	39
II.8.1.5.2. Transduktion im großen Maßstab	39
II.8.1.6. Selektion biotinproduzierender Cosmide	40
II.8.2. Transformation	40
II.8.2.1. Herstellung der hochkompetenten Zellen	40
II.8.2.2. Transformation	41

II.8.2.3. "Blau-Weiß" Selektion rekombinanter Klone	41
II.8.3. Konjugation	42
II.8.3.1. Anzucht des Rezipientenstammes	42
II.8.3.2. Anzucht des Donorstammes	43
II.8.3.3. Konjugation und Selektion der rekombinanten Klone	43
II.8.4. Elektroporation kompetenter Corynebacterium glutamicum-Zellen	43
II.8.4.1. Herstellung von hochkompetenten Zellen	43
II.8.4.2. Elektroporotion und Selektion	44
II.9. Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)	45
II.10. DNA-DNA-Hybridizierung	47
II.10.1. Transfer von DNA auf Membranen durch Vakuum-Blotting	48
II.10.2. Dotblot	49
II.10.3. Hybridisierung mit Dioxigenin-markierten Sonden	49
II.10.4. Detektion	50
II.10.4.1. Kolorimetrische Detektion	50
II.10.4.2. Nachweis auf Röntgenfilmen	51
II.11. Sequenzierung und Analyse der Sequenzdaten	51
II.12. Bestimmung von Biotinkonzentrationen in Kulturüberständen	52
II.12.1. Kompetitiver ELISA Test	52
II.12.2. Wachstumstests mit Lactobacillus plantarum ATCC 8014	54
II.13. Zellaufschluss und Herstellung von Extrakten für zweidimensionale Gele	54
II.14. Proteinbestimmung	56
II.15. 2-D Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	57
II.15.1. Denaturierende PAGE (SDS-PAGE)	57
II.15.2. Proteinfärbung der SDS-PAGE Proteingele	59
II.15.2.1. Coomassie-Färbung	59
II.15.2.2. Polychromatische Silberfärbung	59

Inhaltsverzeichnis	IV
II.16. Chemikalien und Enzyme	61
III. Experimente und Ergebnisse	62
III.1. Konstruktion von Umwelt-Genbanken aus mikrobiellen Konsortien	64
III.1.1. Anreicherungskulturen von verschiedenen Umwelt-Habitaten	64
III.1.2. Isolierung, Reinigung und Klonierung von Gesamt-DNA aus	
mikrobiellen Anreicherungen	71
III.2. Screening von Umwelt Cosmid-Genbanken auf bio ⁺ Cosmide	72
III.2.1. Biotinproduktion und Wachstumscharakteristika von Klonen mit	
bio-Cosmiden	72
III.2.2. DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen	76
III.2.3. Molekulare Analyse der identifizierten <i>bio</i> -Proteine auf dem pCosHE2	82
III.3. Konstruktion von rekombinanten biotinüberproduzierenden Mikroorganismen	86
III.3.1. Expression von bio-Konstrukten in E. coli-Stämmen	90
III.3.1.1. Bestimmung von Biotin in Kulturüberständen	90
III.3.1.2. Wachstumsparameter der E. coli-Stämme mit bio-Konstrukten	
in Mineralmedien	91
III.3.1.3. Fermentation von ausgewählten bio-Konstrukten	98
III.3.2. Expression von bio-Konstrukten in unterschiedlichen Bakterien	101
III.3.2.1. Expression von bio-Konstrukten unter dem Wildtyp Promotor	102
III.3.2.2. Konstruktion und Expression kontrollierbarer bio-Konstrukte	108
III.3.2.3.1. Funktionalitätskontrolle anhand von	
Komplementationsstudien	109
III.3.2.3.2. Expression von kontrollierbaren bio-Konstrukten in	
verschiedenen Bakterien	113
III.3.3. 2-D gelelektrophoretische Analyse von Proteinmuster	120
	104

IV. Diskussion	128
IV.1. Verbreitung und biotechnologisches Potential von prokaryotischen Mikroorganismen	128
IV.2. Biodiversitäts-Biotechnologie	130
IV.3. Sequenzanalyse der bio-Cosmide	135
IV.4. Konstruktion von biotinüberproduzierenden Bakterien	143
IV.4.1. Produktionsstämme und Produktionsraten	146
IV.4.2. Konstruktion rekombinanter, biotinproduzierender	
Rhizobium-Stämme	151
IV.4.3. 2-D gelelektrophoretische Analyse und Sequenzvergleiche	152
IV.5. Ausblick	153
V. Zusammenfassung	155
VI. Literaturverzeichnis	158

V

Abkürzungen

A.	Agrobacterium
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American type cilture colection
b	Basen
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalhumin
C	Corvnehacterium
°C	Grad Celsius
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
	circa
CS	Casamonosäuren
cfu	Klon hildende Finheiten (engl. colony forming units)
Cm	Chloramphanicol
DIC	Disavisanin
	Digoxigenin
	Dimethyloulfaxida
DMSU	
DNA	
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTB	Dethiobiotin
	Dithiothreitol
Е.	Escherichia, Erwinia
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (und andere)
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäss
g	Gramm
<i>G</i> .	Gluconobacter
Gram (+)	Grampositives Bakterium
Gram (-)	Gramnegatives Bakterium
i. d. R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl-B-d-thiogalactopyranosid
К.	Klebsiella
kb	Kilobasen
K _d	Dissoziationskonstante
Km	Kanamycin
1	Liter
L.	Lactobacillus
LB	Luria-Bertani (ein Nährmedium)
М	molar
MCS	Multi-Cloning-Site
mg	Milligramm
цg	Mikrogramm
min	Minute

mind.	mindestens
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	millimolar
ms	Millisekunde(n)
NBT	Nitroblau-Tetrazolin
ng	Nanogram
o.a.	oben aufgeführten
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl. open reading frame)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
pg	Pikogram
r	Resistenz
R.	Rhizobium, Ralstonia
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S.	Sinorhizobium
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl. Sodium-Docecylsulfat)
Sp	Spectinomycin
Std.	Stunden
t	Tonnen
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
W/V	Masseneinheit pro Volumeneinheit
Х.	Xanthomonas campestris
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-B-D-galactopyranosid

Symbole für Aminosäuren

А	Ala	Alanin	Μ	Met	Methionon
С	Cys	Cystein	Ν	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartatsäure	Р	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
Н	His	Histidin	Т	Thr	Threonin
Ι	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
Κ	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Luecin	Y	Tyr	Tyrosin

I. Einleitung

Biotin (Vitamin H) gehört zur Gruppe der essentiellen Vitamine (Eisenberg and Star, 1968) und findet Verwendung in einer Vielzahl von Lebensmitteln und Tierfutter. Es spielt eine Schlüsselrolle im Zellstoffwechsel als Cofaktor in unterschiedlichen Carboxylasen wobei die bekanntesten die Acetyl-CoA-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase sind. Biotin ermöglicht den Transfer von aktivem CO₂, als C1-Einheit, für Carboxylierungen, Decarboxylierungen und Transcarboxylierungen (Knowles, 1989). Diese Carboxylasen enthalten Biotin als eine kovalent gebundene prosthetische Gruppe, die über eine Amidbindung mit einer ε -Aminogruppe eines spezifischen Lysinrestes verknüpft ist. Weiterhin spielt Biotin eine wichtige Rolle in der Fettsäuresynthese. Die Acetyl-CoA-Carboxylase (Abb. 1), ein Schlüsselenzvm in diesem Syntheseweg, enthält Biotin als Cofaktor, welches wie bei der Biotin-Carboxylase, kovalent gebunden ist. Als Akzeptor der aktivierten CO₂-Gruppe funktioniert Acetyl-CoA und es entsteht Malonyl-CoA. Die aus E. coli isolierte Acetyl-CoA-Carboxylase besteht aus drei Untereinheiten. Biotin selbst ist dabei an ein 22 kD Protein gebunden, welches als Biotin-Carrier-Protein bezeichnet wird. Die Biotineinheit wird carboxyliert, wobei die Biotin-Carboxylase, die zweite Untereinheit des Proteins, eine Rolle spielt. Die bereits aktivierte CO₂-Gruppe wird von der Transcarboxylase, der dritten Untereinheit, auf Acetyl-CoA übertragen.

Industriell wird Biotin derzeit hauptsächlich in einer relativ kostenaufwendigen chemischen Synthese de novo in 14 Schritten hergestellt (Abb.2A und 2B; Goldberg and Sternbach, 1949; Kuzuhara et al., 1970). Als Ausgangssubstanz dienen Fumarat oder Manitol. Die chemische Biotinsynthese ist im Vergleich zur Synthese anderer aufwendigsten Vitaminsynthesen. Vitamine eine der teuersten und Die Weltjahresproduktion an Biotin beträgt ca. 10-20 Tonnen mit einem Gesamtmarktwert von ca. 320 Millionen Euro (Brown and Kamogawa, 1991). Der Preis von einem kg Biotin auf dem Weltmarkt beträgt zur Zeit ca. 8.000 Euro.

Biotinmangel kann bei Menschen und Tieren zu Erkrankungen wie z.B. Seborrhoea und Dermatitis führen. Der Tagesbedarf eines erwachsenen Menschen liegt bei 0,07 mg/kg Körpergewicht: <u>http://www.fda.gov/cvm/index/consumer/petfood.htm</u> (*Food and Drug Administration*).



Abb. 1: Schematische Darstellung der Aktivierung einer CO₂-Gruppe mit Hilfe der drei Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase. 1-Biotin-Carrier-Protein; 2-Biotin-Carboxylase; 3-Biotintranscarboxylase; 4-Lysin/Biotin Verbindung.

Aufgrund seiner Bedeutung als Vitamin für Mensch und Tier wird Biotin als Zusatz in Futtermitteln, Fruchtsäften, Hautcremes, etc. verwendet. Viele Mikroorganismen benötigen ebenfalls Biotin als Wachstumsfaktor (Brown and Kamogawa, 1991) (Abb. 3A). Eine Vielzahl von Bakterien sind in der Lage Biotin zu produzieren, wobei die Produktionsraten solcher Stämme zwischen 15 µg/l (Shaw et al., 1999) und 200 mg/l liegen (Sakurai et al., 1996). Diese Raten sind zu niedrig, um ein biotechnologisches Verfahren zu entwickeln. Es wurde ausgerechnet (Shaw et al., 1999), dass ein Biotinbiosynthese-Produktionsstamm in Höhe von ca. 1 g/l Biotin aufweisen muss, um eine kostengünstige Produktion zu etablieren. Auf Grund dieser Problematik ist Entwicklungsarbeit notwendig.



Abb. 2: Chemische Synthese von Biotin: (A) Nach Goldberg and Sternbach (1949), modifiziert; (B) Nach Kuzuhara et al. (1970), modifiziert. (a) Benzylamin, (b) Phosgen, (c) Essiganhydrid, (d) Zn, Essigsäure und Essiganhydrid, (e) H_2S , HCl, (f) $C_2H_5O(CH_2)_3MgBr$, (g) H_2 , Ni, (h) HBr, Essigsäure, (i) Silber *d*-Camphorsulfonate, (j) Isopropanol, (k) Natrium Diethylmalonat, (l) HBr. Die Pfeilen zeigen die möglicherweise umweltschädlichen Schritte der chemischen Biosynthesen.





Abb. 3: (A). Biotinbiosyntheseweg in bereits bekannten Gram-negativen und Grampositiven Bakterien; (B) Biotinbiosynthese-Operon von *E. coli*, sowie regulatorische Komponenten. BirA-Repressorprotein; *bioA*-7-Keto-8-Aminopelargonsäure Synthetase, *bioB*-Biotin-Synthetase, *bioF*-7,8-Diaminopelargonsäure Synthase, *bioC*-beteiligt an der Pimelyl-CoA Synthese, *bioD*-Dethiobiotinsynthetase.





Abb. 4: Biotinbiosynthesegene verschiedener Mikroorganismen. (A) Die Organisation der Biotinbiosynthesegene in verschiedenen Gram-positiven Bakterien; (B) in verschiedenen Gram-negativen Bakterien. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtungen der *bio*-Gene.

In allen Habitaten wie z.B. Boden, Meerwasser, Biofilmen, Teichen oder Intestinaltrakten, sind mikrobielle Biotin-Produzenten zu finden. Die Biotinbiosynthesegene liegen in der Regel in Operons vor (Serebriiskii et al., 1996; Abb. 4). Biotinbiosynthese ist bereits in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* detailliert untersucht worden (Bower et al., 1996a; Shiuan and Campbell, 1988). An der Biotinbiosynthese in *E. coli* sind sechs strukturelle Gene und ein regulatorisches Gen beteiligt (Abb. 3B). Fünf dieser Gene liegen in einem *bio*-Operon bei Minute 17,5 auf der genetischen Karte: *bioA*, *B*, *F*, *C*, *D* (Abb. 3B). Das *bioA*-Gen wird zusammen mit einem nicht weiter charakterisierten offenen Leserahmen (ORF) in eine Richtung transkribiert, während die *bioB-*, *bioF-*, *bioC-* und *bioD-*Gene in die andere Richtung abgelesen werden. Bei anderen *Enterobacteriaceae* wie z.B. *Serratia marcescens*, *Erwinia herbicola*, *Salmonella typhimurium* und *Citrobacter freundii* liegen die *bio-*Gene ebenfalls in einem Operon vor (Shiuan and Campbell, 1988; Wu et al., 1996; Abb. 4B). Dagegen sind die Gene für die Biotinproduktion in *Bacillus sphaericus* in zwei Operons (Gloeckler et al., 1990; Abb. 4A) organisiert.

In *E. coli* wird Biotin vermutlich wie folgt synthetisiert (Abb. 3A): Pimeloyl-CoA \rightarrow 7-Keto-8-Aminopelargonsäure (KAPA) \rightarrow 7,8-Diaminopelargonsäure (DAPA) \rightarrow Dethiobiotin \rightarrow Biotin. Die Gene *bioF*, *bioA* und das *bioD* codieren für die KAPA-Synthetase, die DAPA-Aminotransferase und die Dethiobiotin-Synthetase. Das bioB-Gen ist an der Umwandlung von Dethiobiotin zu Biotin beteiligt. Das Genprodukt von bioC vermittelt vermutlich die Synthese von Pimeloyl-CoA in E. coli. Neben diesen Genen konnte in E. coli ein weiteres Gen, das bioH-Gen, identifiziert werden, das an der Biotinbiosynthese beteiligt ist und bei Minute 74 des E. coli Chromosoms vorliegt (O'Regan et al., 1989). Biotinbiosynthese wird durch BirA reguliert und in Abhängigkeit der Konzentration von ungebundenem Biotinyl-AMP reprimiert oder dereprimiert (Barker and Campbell, 1981; Cronan, 1989). Das birA Gen liegt bei 89 min auf der E. coli Karte (Barker and Campbell, 1981). Das bio-Operon ist negativ reguliert (Eisenberg, 1985). Die Synthese von Biotin und seinen Derivaten in der Zelle wird reprimiert sobald die Konzentration von Biotin im Medium steigt (Pai, 1972). Es erfolgt eine 59 % Inhibition der Synthese bei 1,5 ng/ml (6,2 nM) Biotin im Medium und eine 100 % Inhibition bei ca. 5,0 ng/ml (21 nM) Biotin (Barker and Campbell, 1980).

Obwohl funktionelle Biotinbiosynthesegene (*bio*-Gene, Abb. 3B, Abb. 4) in verschiedenen Mikroorganismen auf molekularbiologischem Niveau detailliert untersucht und einige biotinüberproduzierende Bakterienstämme konstruiert wurden, konnte bisher kein kostendeckendes biotechnologisches Verfahren für die Biotinbiosynthese entwickelt werden (Shaw et al., 1999). Dies liegt zum Teil an einer hohen Instabilität der zur Verfügung stehenden biotinüberproduzierenden

Bakterienstämme und an den hohen Produktionskosten. Problematisch sind toxische, inhibitorische Effekte sowie eine hohe Plasmidinstabilität bei Biotinüberproduktion (Ifuku et al., 1995; Sakurai et al., 1996; Streit and Phillips, 1996).

In der Umwelt existieren unbekannte Mikroorganismen deren Stoffwechsel-Möglichkeiten für die Industrie eine Quelle neuartiger Enzymaktivitäten und Synthesewege sind. Diese unentdeckten Gene stellen ein Reservoir an Information dar, dem sowohl eine immense wissenschaftliche als auch biotechnologische Bedeutung beigemessen werden muss. Neue Untersuchungen unterschiedlicher Umwelt-Habitate zeigten, dass vermutlich weniger als 0,5 % aller Mikroorganismen kultiviert worden sind (Amann et al., 1995) und somit für biotechnologische Verfahren zur Verfügung stehen. Man schätzt, dass alleine in einer Bodenprobe von 1 g bis zu 4.000 verschiedene bakterielle Genome zu identifizieren sind (Torsvik et al., 1990). Die Biotechnologie versucht zur Zeit dieses unbekannte Potential zu erschließen und zu nutzen. Dabei sind solche Enzyme von Interesse, die höhere Umsatzraten, "bessere" pH-Optima, größere Thermostabilität, bessere Löslichkeit oder erhöhte Substratspezifität aufweisen. Weiterhin wird nach Biosynthesewegen für neue Stoffgruppen mit antibakterieller Wirkung, sowie für andere Sekundärmetabolite mit biotechnologischem Potential gesucht. Somit geht von diesen bisher nicht-klassifizierten bzw. nicht-kultivierten Mikroorganismen, die beispielsweise in Biofilmen, marinen Schwämmen, Rhizosphären (Davey and O'Toole G, 2000) und in verschiedenen Boden- oder Wasserproben zu finden sind, ein großes Anwendungspotential aus. Um die Schwierigkeiten zu überwinden, die mit der Kultivierung der verschiedenen Bakterien verbunden sind, wurden diverse Methoden für die Identifizierung und Charakterisierung neuer Mikroorganismen entwickelt. Diese Techniken basieren auf *in situ* Hybridisierung und Mikroautoradiography (Lee et al., 1999), Konstruktion von Plasmid-Genbanken (Henne et al., 1999) und BAC-Genbanken (Rondon et al., 2000).

Das Ziel dieser Arbeit war es, bisher unbekannte Biotinbiosynthesegene aus kultivierbaren und nicht-kultivierbaren Mikroorganismen zu isolieren und in verschiedenen Bakterien zu exprimieren. Um das Ziel dieser Arbeit zu erreichen, wäre die direkte Isolierung von DNA aus Umweltproben und das Anlegen von Genbanken eine mögliche Vorgehensweise. Auf diese Art wurden bereits erfolgreich und mehrfach Plasmid-Genbanken zur Erschließung von Umweltproben angelegt und durchmustert (Henne et al., 1999). Da mit Hilfe dieser Technik jedoch in der

Regel nur geringe Fragmentgrößen erzielt wurden, war diese Methode nicht geeignet für die Isolierung von Operons und größeren Genclustern. Die Klonierung von großen DNA-Fragmenten direkt isoliert aus Bodenproben in den sog. *bacterial artificial chromosomes* (BACs) wurde bereits beschrieben (Rondon et al., 2000). Allerdings wurde diese Technik bisher nur für eine Bodenprobe erfolgreich angewandt. Diese Tatsache deutete daraufhin, dass Schwierigkeiten mit der Reinigung der DNA auftreten. Die, direkt aus der Umwelt isolierte, DNA kann nicht vollständig von den Huminsäuren und andere Verunreinigungen befreit werden, wodurch weitere Schritte inhibiert werden können (Entcheva et al., 2001).



Abb. 5: Isolierung von Biotin überproduzierenden Mikroorganismen aus Umweltproben/ Umwelt DNA-Bänken.

In der vorlegenden Arbeit wurden Cosmid-Genbanken aus Anreicherungskulturen angelegt und es wurde nach neuartigen Biotinbiosynthese-Operons *gescreent*. Um Probleme mit der Isolierung von verunreinigter DNA aus Bodenproben zu vermeiden, sollte eine Anreicherung unter Zusatz von Avidin und somit unter sehr stringenten Bedingungen durchgeführt werden (Abb. 5).

Letztlich wurden in dieser Arbeit *bio*-Gene aus Umwelt-Habitaten in DNA-Banken angereichert und diese in verschiedenen Wirten überexprimiert. (Abb. 5).

II. Material und Methoden

II.1. Organismen, Plasmide und Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide, Cosmide und Primer sind mit ihren relevanten phäno- oder genotypischen Eigenschaften sowie der Herkunft in den Tabellen 1-3 aufgeführt.

Stamm	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz	
<i>E. coli</i> K-12	Wild Typ	(Berlyn, 1998)	
<i>E. coli</i> DH5α	$supE44$, Δlac U169(ϕ 80 lac Z Δ M15) $hsdR17$,	GibcoBRL	
	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1		
E. coli XL-1 blue	recA ⁻ , thi, hsdR1, supE44, relA1, lacF ['] , proAB,	(Bullock et al., 1987)	
	<i>lac</i> I ^q , <i>lacZ∆M15</i> , Tn10[Tet]		
E. coli JW1	ara, $\Delta(lac-proAB)$, rpsL, thi, $\Phi 80$, lacZ $\Delta M15$,	(Kolmar et al., 1990)	
	F' lac^{q} , $lacZ\Delta M15$, $proA^{+}B^{+}$		
<i>E. coli</i> ATCC 33767	K-12 Derivat: F-, Δ (<i>bio-uvrB</i>), <i>lacZam</i> , λ - Nam7, Nam53, cI857 Δ H1 (<i>cro-F-A-J-b2</i>), Δ <i>trp</i> . Sm ^r	ATCC	
E. coli VCS 257	DP50 Derivat: tonA53 dapD8 lacY1	(Sambrook et al., 1989)	
	$glnV44(supE44) \Delta(gal-uvrB)47 tyrT58$		
	(supF58) gyrA29 Δ(thyA57) hsdS3(rk-mk-)		
	mcrA		
<i>E. coli</i> BHB 2688	(N205 recA [λimm 434 cIts b2 red Eam Sam/ λ])	(Hohn, 1979)	
<i>E. coli</i> BHB 2690	(N205 recA [λimm434 cIts b2 red Dam	(Hohn, 1979)	
	Sam/λ])		
<i>E. coli</i> S17-1	<i>Sm^r</i> , <i>Tp^r</i> , <i>mod</i> ⁺ , <i>res</i> ⁻ , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> ⁻ , integriertes Plasmid RP4-Tc:: Mu-Km:: Tn7, <i>hsdR17</i>	(Simon, 1983)	
E. coli S17-1 ribBA	pSup 205 <i>ribBA</i>	D. A. Phillips	
<i>E. coli</i> R879	bioA ⁻ 24	E. coli-Stock Center;	
		Yeil	
<i>E. coli</i> R875	bioB ⁻ 17	E. coli-Stock Center;	
		Yeil	
<i>E. coli</i> R872	bioF103	E. coli-Stock Center;	
		Yeil	

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Stämme.

Fortsetzung Tab. 1

<i>E. coli</i> R876	bioC18	E. coli-Stock Center;
		Yeil
<i>E. coli</i> R877	bioD ⁻ 19	E. coli-Stock Center;
		Yeil
Sinorhizobium	Wild Typ, <i>Sm^r</i>	(Meade et al., 1982)
meliloti 1021		
S. meliloti GR4		W. Streit
Rhizobium etli		W. Streit
Xanthomonas	Wild Typ	DSMZ (Braunschweig)
campestris		
DSM1706		
Ralstonia euthropha	Cfx ⁺ , Hox ⁺ ; pHG1	ATCC 17699
H16		
Klebsiella planticola	Wild Typ	DSMZ (Braunschweig)
DSM 3069		
Corynebacterium	res ⁻ -Mutante von C. glutamicum AS019	(Liebl et al., 1989)
glutamicum R163		
Lactobacillus	Wild Typ	DSMZ (Braunschweig)
plantarum ATCC		
8014		

Bezeichnung der Phänotypen: Sm^r, Streptomycinresistenz; Km^r, Kanamycinresistenz; Genotypischebezeichnungen gemäß (Berlyn, 1998).

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz
nWE 15	Apr Neor) cos	Stratagene (Heidelberg)
pBluescriptSK/K	Ap^r , $lacPOZ^c$	Stratagene (Heidelberg)
S		
pK18mobsac	Km ^r , sacB, lacPOZ ^c ,mob ⁺	(Schafer et al., 1994)
pMCL210	Cm ^r , lacPOZ'	(Nakano et al., 1995)
pHSG399	Cm^r , $lacPOZ^{+}$	(Hashimoto-Gotoh et al., 1986)
pHSG396	Cm^r , $lacPOZ^{+}$	(Hashimoto-Gotoh et al., 1986)
pBBR1MCS-2	<i>Km^r</i> , <i>lacPOZ</i> , <i>mob</i> ⁺	(Kovach et al., 1995)

pWLQ2	Ap ^r , Km ^r , oripHM1519, tac Promotor,	(Liebl et al., 1992)
	lacI ^q	
pSup 205 ribBA	ribBA Gene	D.A. Phillips
pDR720	Ap ^r , trp Promotor	Pharmacia
pTZ19	Cm ^r , lacPOZ	Strategene
pCLiK5	Km ^r , rep, orf Gene für Replikation in	(Köthe, 2000)
	C. glutamicum	

Fortsetzung Tab. 2

Bezeichnung der Phänotypen: Sm^r, Streptomycinresistenz; Km^r, Kanamycinresistenz; Cm^r, Chloramphenicolresistenz; Ap^r, Ampicillinresistenz; Neo^r, Neomycinresistenz

Konstrukt	Vektor	Insert/Merkmahle
pHE1-1	pHSG399	Subklon von pCosHE1; 1 kb Fragment, mit <i>modC-bioA</i>
pHE1-2	pHSG399	Region Subklon von pCosHE1; 1,9 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Kpn</i> I Fragment, mit
pHE1-3	pHSG399	Subklon von pCosHE1; 900 bp <i>Pst</i> I Fragment, mit Teilen
pHE1-4	pHSG399	Subklon von pCosHE1; 1,4 kb <i>Pst</i> I Fragment, mit Teilen
pHE1-5	pHSG399	Subklon von pCosHE1; 2,5 kb <i>PstI</i> Fragment, mit <i>moaA</i> -
pHE1-6	pHSG399	Subklon von pCosHE1; 2,8 kb <i>Pst</i> I Fragment, mit Teilen
pHE2-1	pBSK+	Subklon von pCosHE2; 4,38 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I Fragment,
pFS1-1	pHSG399	Subklon von pCosFS1; 870 bp <i>Pst</i> I Fragment, mit Teilen
pFS1-2	pHSG399	Subklon von pCosFS1; 3,6 kb <i>Pst</i> I Fragment, mit Teilen
pAS1-1	pHSG399	Subklon von pCosAS1; 1,6 kb <i>Sma</i> I Fragment, mit <i>bioD</i>
pAS1-2	pHSG399	Subklon von pCosAS1; 2,8 kb <i>Sma</i> I Fragment, mit Teilen von <i>hutU</i> und komplettes <i>hutH</i> , <i>orf1</i>

Tab. 2B: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide.

Fortsetzung Tab. 2B

pAS1-3	pK18mobsacB	Subklon von pCosAS1; 700 bp <i>Pst</i> I Fragment, mit Teilen
		von <i>bioF</i> und <i>bioC</i> Sequnzen
pAS1-4	pHSG399	Subklon von pCosAS1; 1,3 kb SmaI Fragment, mit Teilen
		von <i>hutU</i> Gen
pAS1-5	pHSG399	Subklon von pCosAS1; 6 kb <i>Hin</i> dIII/SacI Fragment, mit
1	1	Teilen von <i>uvrB</i> Gen
pAS1-6	pK18mobsacB	Subklon von pCosAS1; 390 bp <i>Pst</i> I Fragment, mit Teilen
1	1	von <i>hutG</i> and <i>hutC</i> Genen
pCosHE1	pWE15	30 kb Fragment mit bio Genen isoliert aus mikrobiellen
		Konsortium
pCosHE2	pWE15	30 kb Fragment mit bio Genen isoliert aus mikrobiellen
		Konsortium
pCosAS1	pWE15	30 kb Fragment mit bio Genen isoliert aus mikrobiellen
-	-	Konsortium
pCosAS2	pWE15	30 kb Fragment mit bio Genen isoliert aus mikrobiellen
		Konsortium
pCosFS1	pWE15	30 kb Fragment mit bio Genen isoliert aus mikrobiellen
		Konsortium
pCosFS2	pWE15	30 kb Fragment mit bio Genen isoliert aus mikrobiellen
		Konsortium
pPESKbio	pBSSK+	6 kb Fragment in <i>Eco</i> RV, <i>bio</i> -Operon von pCosHE2
pPEBBRbio	pBBR1MCS-2	6 kb <i>Hin</i> dIII/ <i>Xba</i> I Fragment aus pPESKbio
pPEBBRbiocg	pBBR1MCS-2	6 kb <i>Hin</i> dIII/ <i>Xba</i> I Fragment aus pPESKbio, <i>ori</i> für <i>C</i> .
	-	glutamicum als XhoI Fragment
pPEPKbio	pK18mobsac	6 kb <i>Hin</i> dIII/XbaI Fragment aus pPESKbio
pPEXba	pBSSK+	<i>bioBFCD</i> in <i>Eco</i> RV
pPEKpn	pBSSK+	<i>bioAorf1</i> in <i>Eco</i> RV
pPEKbioAcm	pHSG399	bioAorf1 in als KpnI Fragment
pPEbiocm	pHSG399	bioBFCD als XbaI Fragment und bioAorf1 in als KpnI
		Fragment
pPEBDcm	pHSG399	<i>bioBFCD</i> als <i>Xba</i> I Fragment
pPEbio	pBSSK+	bioBFCD bioAorf1 aus pPEbiocm als HindIII/EcoRI
		Fragment
pPEBuD	pBSSK+	bioBFCD als XbaI Fragment mit deletierten bioF und
		bioC Genen als HindIII/EcoRI Fragment
pPEnodD1	pBSSK+	nodD1 Promotor in EcoRV
pPEnodD3	pBSSK+	nodD3 Promotor in EcoRV

Fortsetzung Tab. 2B

pPESKD1bio	pBSSK+	pPEbio::SalI/NcoI nodD1 Promotor
pPESKD3bio	pBSSK+	pPEbio::SalI/NcoI nodD3 Promotor
pPED1bio	pBBR1MCS-2	nodD1bio-Operon aus pPED1bio als SalI/EcoRI
		Fragment
pPED3bio	pBBR1MCS-2	nodD3bio-Operon aus pPED3bio als SalI/EcoRI
		Fragment
pPESKD1BuD	pBSSK+	pPEBuD::Sall/NcoI nodD1 Promotor
pPESKD3BuD	pBSSK+	pPEBuD::SalI/NcoI nodD3 Promotor
pPED1BuD	pBBR1MCS-2	nodD1bioBuD aus pPESKD1BuD als Sall/EcoRI
		Fragment
pPED3BuD	pBBR1MCS-2	nodD3bioBuD aus pPESKD3BuD als Sall/EcoRI
		Fragment
pPESDBuD	pBSSK+	pPEBuD::Shine-Dalgarno Sequenz von S. marcescens als
		Sall/NcoI Fragment
pPESDbio	pBSSK+	pPEbio::Shine-Dalgarno Sequenz von S. marcescens als
		Sall/NcoI Fragment,
pPEHSGSDBuD	pHSG399	SDbioBuD aus pPESDBuD als SalI/EcoRI Fragment
pPEHSGSDbio	pHSG399	SDbio-Operon aus pPESDbio als SalI/EcoRI Fragment
pPEtrpBuDcm	pHSG399	trp Promotor aus pDR720 als HindIII/SalI Fragment in
		pPEHSGSDBuD
pPEtrpbiocm	pHSG399	trp Promotor aus pDR720 als HindIII/SalI Fragment in
		pPEHSGSDbio
pPEtrpBuD	pBBR1MCS-2	<i>trpSDbioBuD</i> aus pPEtrpBuDcm als <i>Eco</i> RI Fragment
pPEtrpbior	pBBR1MCS-2	trpSDbio aus pPEtrpbiocm als EcoRI Fragment
pPEtrpbiof	pBBR1MCS-2	trpSDbio aus pPEtrpbiocm als EcoRI Fragment
pPEtaclac	pBSSK+	tac Promotor und lacI ^q Regulatorgen aus pWLQ2 in
		EcoRV
pPEtacbio	pBBR1MCS-2	<i>tac</i> Promotor und <i>lacI</i> ^q Regulatorgen aus <i>SDbio</i> aus
		pPEtaclac, SDbio aus pPEtrpbiof
pPEtrpAorf	pHSG399	trp Promotor als HindIII/SalI Fragment aus pDR720 in
		pPEKpn
pPEoriX	pBSSK+	ori für C. glutamicum aus pCLiK5 in EcoRV
pPEloop	pBBR1MCS-2	pPEtrpbiof mit entfernten möglichen Terminator
		zwischen <i>bioD</i> und <i>bioA</i>

Tab. 3: In dieser Arbeit verwend

Primer Name	Sequenz 5'-3'	Annieling Temperatur (°C)*	Beschreibung
1.42-F*	CAT CCA GCC AGG TCC ACA	61,4	<i>bioD</i> zum <i>bioC</i> auf
2. 42-R*	CTT GCC AGT ACT GCA ACG	61,4	<i>bioA</i> zum <i>bioB</i> auf
3. 42bioA	CCA GTA CTG CAA CGC CAT TTT	57,9	<i>bioA</i> zum <i>bioB</i> auf
4. 42bioC	TCC AGT ACC GTG GGT GTA TTT	57,9	<i>bioC</i> zum <i>bioF</i> auf
5. 42bioB*	CGG AGT TTT ACC GCA ATA TT	53,2	<i>bioB</i> zum <i>bioC</i> auf pCosHE2
6. 42bioF	TTA AAC TGG CAG CTT CCA GCA A	58,4	<i>bioF</i> zum <i>bioB</i> auf pCosHE2
7. 42endbioB	GTT TCG CCT AAG CCC ACA AT	57,3	<i>bioB</i> zum <i>bioA</i> auf pCosHE2
8. 42anfbioB	TTG ATG GAA GTT GAA CAG GT	53,2	<i>bioB</i> zum <i>bioF</i> auf pCosHE2
9. 42anfbioF	TTA TGA GCT GGC AGG AGA AAA T	56,5	<i>bioF</i> zum <i>bioC</i> auf pCosHE2
10. 42anfbioA	TAC AAT CAC CCG CAG CTT AAT	55,9	<i>bioA</i> zum <i>orf1</i> auf pCosHE2
11. 42endbioF	AAC GAT GTC ACT CAT TTG GC	55,3	Vom Ende <i>bioF</i> zum <i>bioC</i> auf pCosHE2
12. 1-6orf	GAT ATT GAA GTA CAG CTG CG	55,3	Primer walking aus
13. ErwbioA	ACG TGA TGT TTG ACG GCA TT	55,3	<i>bioA</i> zum <i>bio</i> Operon auf pCosHE1
14. ErwuvrB	TTC CAC CTC TTC GTC AAA CA	55,3	<i>uvrB</i> zum <i>bio</i> Operon auf pCosHE1
15. ErwbioA2	AAT GCC GTC AAA CAT CAC GT	55,3	<i>bioA</i> zum <i>bio</i> Operon
16. ErwuvrB2	TTC CAC CTC TTC GTC AAA CA	55,3	<i>uvrB</i> zum <i>bio</i> Operon auf pCosHE1
17. ErwbioB	TAA GGC GAA AAA CGC GGG CT	59,4	<i>bioB</i> zum <i>bio</i> Operon auf pCosHE1
18. 1/1-moaA	AGG TAG AAA GCT TTC GGC GAA	57,9	Primer walking auf
19. 1-1moaE	CAG TGC GGC AAC GTC TTT AAA	57,9	Primer walking auf pHE1-5
20. 1-1moaA2	AAG CGA TCG TCA AAG AGA ACC	57,9	Primer walking auf pHE1-5
21. 22PEr	AAT GTC GAT AAC CTC GCC GCG AA	62,4	Auf p22PE Subklon von
22. BGbioend	AGC TGA TAC TGC TGG TCG TCG TT	62,4	Auf pCosAS vom Ende bio Operon zur bio Gene
23. BGmitte	CAG AGA TCC ATC GCC GTC ACA AC	64,2	Auf pCosAS1 von der Mitte zum Ende <i>bio</i>
24. BGatt	CAC GAC AAA GCT TTT GGT GCC CG	64,2	Von λatt Sites zu den bio Gene auf pCosAS1

Fortsetzung	Tab.	3
-		

25. BGmitte2	AGA GAT CCA TCG CCG TCA	59.8	Auf pCosAS1 von der
	CAA		Mitte zum Ende <i>bio</i>
			Operon
26 BGatt2	CAC GAC AAA GCT TTT GGT	573	Von λ att Sites zu den
20. 20.	GC	0,,0	bio Gene auf pCosAS1
27 1/3-4FrwhioB	TTT GAA GCG CAG CAG ATC	573	bioB zum bioE auf
27. 175 HEI WORDD	CA	57,5	pCosAS1: ca Akh PCR
			Fragmont
1/2 $4EmethicE$		(0)	Flagment
28. 1/3-4ErwbloF	GGT CA	60,6	bloF zum bloB auf
	UUT CA		pCosAS1; ca. 4kb PCR
			Fragment
29. 1/3-4bioBmitte	AAT IGT CGG CTT AIG CGA	58,4	Primer walking auf dem
	AACG		4kb PCR Fragment
30. 1/3-4bioBend	ATT CAG TCC CAG CTT GCG	59,8	Primer walking auf dem
	GAA		4kb PCR Fragment
31. P1/3orf	CAA AGA AGC GGT CGT CAT	57,3	Primer walking auf
	CA		pAS1-2
32. P1/3hutU	CGT GAT TCA GGC CCT GAT	59,4	Primer walking auf
	TG	,	pAS1-2
33. Erwbioprom	ATT TTC ATC GCC ACT TCC AC	55.3	Primer walking auf
bb. Enteropreni		00,0	nAS1-2
34 Frwmitte	CGC GAA ACT GGT CGA TCA	573	Primer walking auf
54. El Winitte	AA	57,5	nAS1_2
25 SarbiaCD		58.0	pASI-2 Von bioCD rum unuR
55. ServioCD	CTG GC	38,9	von <i>bloCD</i> zum <i>uvrB</i>
2(0 D		50.0	aui pCosFS1
36. SeruvrB		58,9	Vom <i>uvrB</i> zu <i>bioCD</i> auf
			pCosFS1
37. HA7-elsD	TGA ACG AAG TTG GCG GTA	57,9	Primer walking auf
	IIG		pFS1-2
38. HA7-elsF	GCA AAA GTT TGG CCT GTA	57,9	Primer walking auf
	CGA		pFS1-2
39. 18HA7aB	ATG GAA ACC TGC ATG ACC	59,8	Vom <i>bioB</i> auf Subklon
	CTG		18 zum <i>bioF</i> auf
			Subklon pFS1-1
40. M7HA7aF	CTG GCG AAA TCG CTG AAT	58,4	Vom <i>bioF</i> auf Subklon
	ATT C	,	pFS1-1 zum <i>bioB</i>
41. bioAkpn	GGG GGT ACC AGT CGA TTA	72	Anfang vom <i>bioA</i> mit
···· ·····	TGA CAA CGG ACG ATC		KnnI Schnittstelle
42 orfKnk	GGG GGT ACC TTT AAG TGA	69.5	Ende vom <i>orfl</i> mit <i>Kpn</i> I
12. omtepk	TAC CAG ATG GCA TTG	0,5	Schnittstelle
13 1-6hioBYha	GGG GGT CTA GAA GCC CCA	>75	Anfang hioR mit Yhal
45. 1-0010DA0a	TGG CTC ACC GCC CAC	-15	Sabrittatalla
11 1 ChiaDVha	GGG GGT CTA GAA TGG CTA	717	Endo yom higD mit
44. I-0010DA0a	CAA CAA GGC AAG GTT TAT G	/1,/	
15 10 40 1			Abai Schnittstelle
45. nodD3Sal		>/5	Antang vom <i>nodD3</i>
	CUI GAG AAA AIC ACC		Promotor (5'-Ende) mit
			Sall Schnittstelle
46. nodD3Nco	GGG GGC CAT GGG GCT TCT	>75	Ende vom <i>nodD3</i>
	CUT ATC CAT AGT TGA AAG		Promotor (3'-Ende) mit
	GIU		NcoI Schnittstelle
47. D1Sal	GGG GGT CGA CTA AGA ACT	71,7	Anfang vom <i>nodD1</i>
	CCA GTG TGT TGT TTC TTC		Promotor (5'-Ende) mit
			Sall Schnittstelle

Fortsetzung Tab. 3

48.	D1Nco	GGG GGC CAT GGG GCT TCT	>75	Ende vom nodD1
		CCA TGA TCG TTA TCC AAA		Promotor (3'-Ende) mit
		CAA TC		NcoI Schnittstelle
49.	SD-Sal	TCG ACG GCG ACA CTT TTT	70,8	S. marcescens Shine-
		CGT TTT GGA GAC GC		Dalgarno Sequenz mit
				SalI Schnittstelle
50.	SD-Nco	CAT GGC GCT TCC AAA ACG	70,8	S. marcescens Shine-
		AAA AAG TGT CGC CG		Dalgarno Sequenz mit
				NcoI Schnittstelle
51.	trp Hind	GGA AGC TTA CTC CCC ATC	63,7	5'-Ende von <i>trp</i>
		CCC		Promotor pDR720
52.	ori1xhoS	GGG GGC TCG AGG ATC CCC	>75	3`-Ende von <i>ori</i> für Cg
		GGC CGC GCA AAG TCC CGC		mit XhoI Schnittstelle
52	ari).uhaV		N75	5) Ende von ewifür Co
55.	OTIZATION	CGG TCA AGC CAA GCG C	-15	<i>S</i> -Elide voli <i>Ori</i> fui Cg
54	taoprSal	GGG GGC TGC AGG TCG ACG	<u>\75</u>	tac Promotor mit Sall
54.	taepisai	GAT CCC CGG GAA TTC TG	-15	Schnittstelle (3'-Ende)
55	tacRHind	GGG GGA AGC TTT CAA ACA	73.0	tac Repressor lacl ^q
55.	acivitina	TGA GAA GTC GCT TGC GG	75,0	Gen mit HindIII
				Schnittstelle
56	tacRSal	GGG GGC AGC TGT CAA ACA	72.1	tac Repressor lacI ^q
20.	luvitsui	TGA GAA GTC GCT TG	, 2, 1	Gen mit Sall
				Schnittstelle
57.	taclaSal	GGG GGT CGA CCA TGA GAA	74.3	tac Repressor. $lacI^q$
		GTC GCT TGC GGT AAT C	-)-	Gen. mit SalI
				Schnittstelle
58.	PromBXba	GGG GGT CTA GAT CGT CCG	71,8	Promotor von <i>bioB</i>
		TTG TCA AAA TCG ACT TG	ŕ	pCosHE2 mit XbaI
				Schnittstelle
59.	bioAloop	GTT GTA GCC ATT CTG GAG	70,6	<i>bioD-bioA</i> loop auf
	-	GTC GAT TAT GAC AAC GG		pPEtrpSDbiof
60.	bioAatg	GGT AGG AGT CGA TTA TGA	71,8	<i>bioD-bioA</i> loop auf
		CAA CGG ACG ATC TTG CC		pPEtrpSDbiof

II.2. Nährmedien und Zellanzucht

II.2.1. Nährmedien

II.2.1.1. Komplexmedium

Als Komplexmedium für *E. coli* wurde LB-Medium (Sambrook et al., 1989; modifiziert) verwendet.

LB-Medium (Luria-Bertani-Broth)

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	5	g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000	ml

Zur Herstellung fester Nährmedien wurde dem Medium vor dem Autoklavieren Agar in einer Endkonzentration von 1,5 % (w/v) zugesetzt. Indikatorplatten zur Selektion rekombinanter Klone (s. II.8.2.3.) enthielten zusätzlich 0,1 mM IPTG und 0,002 % X-Gal.

TY-Medium für den Anzucht von Rhizobien und Xanthomonas campestris

(Sambrook et al.	, 1989)	
Trypton	5	g
Hefeextrakt	3	g
CaCl ₂	0,2	g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000	ml

BHIS-Regenerationsmedium für die Elektroporation von C. glutamicum

a) 2 x BHI-Medium: Brain Heart Infusion H ₂ O _{bidest.}	3,7 ad 50	g ml
b) 2 x Sorbit: D-Sorbit H ₂ O _{bidest.}	9,3 ad 50	g ml
c) MgSO ₄	1	М

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden Lösungen

a) und b) zusammengegeben und 2 ml Lösung c) zugefügt.

LBHIS-Platten	für die	Elektro	poration	von C.	gl	<i>utamicum</i>
					0	

a) 2 x LBHI-Agar:		
Brain Heart Infusion	18,5	g
Bacto TM Pepton	5	g
Hefeextrakt	2,5	g
NaCl	5	g
H ₂ O _{bidest.}	ad 500	ml
b) 2 x Sorbit:		
D-Sorbit	93	g
H ₂ O _{bidest.}	ad 500	ml
c) MgSO ₄	1	М

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurden Lösungen a) und b) zusammengegeben und 20 ml Lösung c) zugefügt.

II.2.1.2. Mineralmedien für das Biotinproduktions-Screening

Um die komplementierenden Cosmidklone und *bio*⁺Konstrukte auf die Fähigkeit zur Biotinproduktion zu untersuchen, wurden diese auf M9-Mineralmedium angezogen und auf CA Agarplaten ausplattiert.

M9-Mineralmedium (Sambrook et al.	<u>, 1989; modifiziert</u>)
Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O	6	g
KH ₂ PO ₄	3	g
NaCl	0,5	g
NH ₄ Cl	1	g
Casamino Säuren (Difco)	2	g
H ₂ O MilliQ	1000	ml
pH 7,4		

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium durch folgende, getrennt sterilisierte Komponenten vervollständigt:

1 M MgSO ₄	1	ml
Glukose	2	g
1 M CaCl ₂	0,1	ml
H ₂ O MilliQ	10	ml
Thiamin Stammlösung	0,05	g/ml
Tryptophan Stammlösung	50	mМ

Thiamin und Tryptophan wurden bei Bedarf in einer Endkonzentration von 5 mg/ml bzw. 1,5 mM dem Medium beigefügt.

Glycerol	20	g
Casaminosäuren (Vitamin frei)	10	g
K ₂ HPO ₄	2	g
KH ₂ PO ₄	1	g
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,5	g
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,01	g
$MnSO_4x4-6H_2O$	0,01	g
ThiaminexHCl	0,1	mg
Agarose	15	g
H ₂ O MilliQ	1000	ml

CA-Agar (Ohsawa et al., 1989)

Die verschiedenen *Rhizobium* Stämme wurden auf biotinfreien Mineralmedien angezogen und bei Bedarf wurden definierte Mengen Biotin zugegeben.

GTS-Minimal	medium-Stammlösungen	<u>(Kiss, 1979)</u>
Lägung 1	200 m 1/1	Lägung /

Lösung 1	200 ml / 1:		Lösung 4	1 ml / l:	
K ₂ HPO ₄ x3H ₂ O NaCl TrisHCl	0,655 5,0 15	g g	FeCl ₃ x6H ₂ O H ₂ O MilliQ	2,7 ad 100	mg ml
Na-Succinate (NH ₄) ₂ SO ₄	15 10	g g	Lösung 5	10 ml / l:	
H ₂ O MilliQ pH 7,5 Alternative Sticl	ad 1000	ml	Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O CoCl ₂ H ₂ BO ₂	24,2 11,9 300	mg mg mg
Glutamin (Gln)	5 oder 25	mМ	MnSO ₄ xH ₂ O ZnSO ₄	183 28,7	mg mg
Lösung 2	1 ml / 1:		CuSO ₄ x5H ₂ O H ₂ O MilliQ	12,5 ad 100	mg ml
MgSO ₄ x7H ₂ O H ₂ O MilliQ	24,6 ad 100	g ml	Lösung 6		
Lösung 3	10 ml / l:		Biotin H ₂ O MilliQ a	2 nd 1000	mg ml
CaCl ₂ x2H ₂ O H ₂ O MilliQ	1,45 ad 100	g ml	Endkonzentration		
			Lösung 7	10 ml/l:	
			Glukose H2O MilliQ	20 ad 100	g ml

GB-Medium (Birch et al., 1995)

<u>A. Hauptteil:</u>		
L-Glutamic SäurexH ₂ O Betain CaCl ₂ MgCl ₂ x6H ₂ O K ₂ SO ₄ H ₂ O MilliQ	31,25 12,5 0,2 1,0 1,25 ad 1,25	g g g g g 1
B. SLF Mikroelementenlösung:		
KOH EDTA Na ₂ xH ₂ O ZnSO ₄ x7H ₂ O MnCl ₂ x4H ₂ O H ₃ BO ₃ CoCl ₂ x6H ₂ O CuCl ₂ x2H ₂ O NiCl ₂ x6H ₂ O Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O H ₂ O MilliQ sterilfiltrieren	15 100 9 4 2,7 1,8 1,5 0,18 0,2 ad 1000	g g g g g g g g g g ml
<u>C. Fe-EDTA Lösung:</u>		
FeSO ₄ x7H ₂ O KOH EDTANa ₂ x2H ₂ O H ₂ O MilliQ sterilfiltrieren	20 10 50 ad 1000	g g ml
D. Standart Vitamin Lösung: (10x)		
Pyridoxal hydrochlorid Riboflavin Nicotinamid Thiaminchloridehydrochlorid Pantothen Säure 4-Aminobenzoe Säure Folsäure Vitamin B12 Biotin (bei Bedarf) H ₂ O MilliQ	10 5 5 5 5 2 5 2 100 10	mg mg mg mg mg mg mg mg mg mg
sterilfiltrieren		

Nach dem Autoklavieren von Lösung A wurden 1,25 ml SLF und 1,87 ml Fe-EDTA Lösung in 1,25 l steril zugegeben. Vor Anzucht der Zellen wurden 0,518 ml/l von Lösung D zugegeben.

BMC-Mineralmedium für das Screening der Biotinproduktion in C. glutamicum

a) Spurenelementelösu	ng: 15 min bei	121 °C autoklavieren	2 ml/l
(NH4) ₆ Mo ₇ O ₂₄ xH ₂ O ZnSO ₄ x7H ₂ O CuSO ₄ x5H ₂ O MnCl ₂ x4H ₂ O FeCl ₃ x6H ₂ O H ₂ O MilliQ	20 44 5 3,6 435 ad 500	mg mg mg mg ml	
b) 200x Mg-Fe-Mn-Lö	sung: 15 min l	bei 121 °C autoklavieren	5 ml/l
MgSO ₄ x7H2O FeSO ₄ x7H2O MnSO ₄ xH2O NaCl H ₂ O MilliQ	8 400 40 0,5 ad 100	g mg mg g ml	
c) Thiamin-Lösung (ge	sättigt): sterilf	iltrieren	1 ml/l
bei –20 °C lagern			
Thiamin/HCl H ₂ O MilliQ	500 10	mg ml	
d) Catechol-Lösung: st	erilfiltrieren		1 ml/l
bei –20 °C lagern			
Catechol 10^{-2} M 110 r	ng/100 ml H ₂ C	D _{bidest.}	
e) CaCl ₂ -Lösung: 15 m	in bei 121 °C	autoklavieren	50 µl/l
CaCl ₂	1	М	
f) Zuckerlösung: 20 %	(w/v) in H ₂ O _b	_{idest.} , sterilfiltrieren	50 ml/l
Saccharose H ₂ O MilliQ	20 100	g ml	
f) 10x M9: 15 min bei	121 °C autokla	avieren	100 ml/l
Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaCl NH ₄ Cl H ₂ O MilliQ pH 7,2	60 30 5 10 1000	g g g ml	

Zur Selektion der Resistenzmarker, die in verschiedenen Stämmen oder Plasmiden enthalten waren, wurden dem autoklavierten und auf 55 °C abgekühlten Medium Antibiotika nach den Angaben von Sambrook (Sambrook et al., 1989) zugesetzt. Nachstehend sind die jeweiligen Endkonzentrationen aufgeführt. Die Antibiotika wurden in H₂O_{bidest.} oder Ethanol in 500x bis 1000x Konzentration angesetzt, sterilfiltriert und in Aliquots bei –20 °C aufbewahrt.

<u>E. coli</u>

Kanamycin Ampicillin Chloramphenice	(pBBR1MCS-2, pK18mobsacB) (pBSSK+, pWE15) ol (pMCL210, pHSG399/396)	30 50 50	μg/ml μg/ml μg/ml
Streptomycin	25	µg/ml	
<u>Rhizobien</u>			
Kanamycin		240	µg/ml
Streptomycin		500	µg/ml
Rifampicin		30	µg/ml
Tetracyclin		5-10	μg/m

II.2.2. Wachstumsbedingungen

II.2.2.1. Anzucht von Flüssigkulturen

Die Anzucht von Flüssigkulturen erfolgte in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben, mit 10–30 % Kulturvolumen. Kulturen von *E. coli* wurden bei 37 °C, Kulturen von Rhizobien und *C. glutamicum* bei 30 °C unter Schütteln angezogen. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien, Hauptkulturen mit 1 % (v/v) einer Vorkultur beimpft.

II.2.2.2. Bestimmung der Zelldichte

Das Wachstum der Kulturen wurde anhand der optischen Dichte (OD) bestimmt. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer (Pharmacia Biotech Ultrospec[®] 3000-

Fotometer) in 1 ml Küvetten (d=1 cm) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Zellsuspensionen wurden so verdünnt, dass eine gemessene OD von 0,3 nicht überschritten wurde.

II.2.3. Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Ständig benötigte Stämme wurden auf Selektionsplatten kultiviert und bis 8 Wochen bei 4 °C gelagert. Zur Dauerkonservierung wurden Glycerinkulturen (GK) nach Yanisch-Perron et al. (1985) angelegt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium (s. II.2.1.1) angeimpft und inkubiert. Zuvor wurde das Vorhandensein der gewünschten Plasmide durch Anzucht der Zellen auf selektiven Medien sowie Isolierung und Restriktion des Plasmids überprüft. Ein Aliquot der Flüssigkultur wurde 1:1 mit 87 % (w/v) sterilem Glycerin vermischt und bei –70 °C gelagert. Stichproben wurden unter dem Mikroskop auf die Einheitlichkeit der Zellen hin überprüft. Falls es notwendig war, wurden die Stämme auf Mineralmedium (ohne Biotin) angezogen und wie beschrieben als GK aufbewahrt. Vorkulturen konnten dann mit einer Impfoese oder 20-50 µl der entsprechenden Stammkultur beimpft werden.

Die Pools aus den Genbanken wurden auf folgende Weise hergestellt:

1-3 ml LB-Medium wurden der ÜN gewachsenen Platte zugegeben und bis zu 30 min geschwenkt. Danach wurden Aliquots 1:1 mit 87 % (w/v) sterilem Glycerin vermischt und bei -70 °C aufbewahrt.

II.2.4. Zellernte

Bei kleineren Volumina von bis zu 5 ml wurden die Zellen in einer Kühlzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus) pelletiert (4 °C, 2 min, 13 000 Upm). Die Ernte größerer Volumina erfolgte in einer Sorvall-Zentrifuge (Sorvall RC5C, DuPont de Nemours, Bad Homburg) in SS 34, GSA oder GS3 Polyallomerröhrchen (4 °C, 10 bis 30 min, 2 000-13 000 Upm).

II.3. Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA

II.3.1. Behandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden zur Inaktivierung von Nukleasen bei 121 °C 20 min autoklaviert. Nicht hitzestabile Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gespült, Lösungen sterilfiltriert und Arbeitsflächen mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt.

II.3.2. Reinigung von Nukleinsäuren

II.3.2.1. Phenol/Chloroform-Extraktion

Proteine und andere Zellbestandteile wurden aus DNA-Lösungen mit Chloroform oder Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1, v/v/v) entfernt. Chloroform bewirkt eine Denaturierung der Proteine, Isoamylalkohol reduziert evtl. Schäumen durch die denaturierten Proteine, erleichtert die Trennung und stabilisiert die Phasen zentrifugierten Lösung. Die Aufreinigung mit Phenol/Chloroform/ der Isoamylalkohol erfolgte nach der Zugabe von einem Vol. dieses Gemisches, welches bis zur Bildung einer homogenen Emulsion geschwenkt wurde. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt (5 min bei 13 000 Upm). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) so oft wiederholt, bis kein Präzipitat mehr in der Interphase sichtbar war.

II.3.2.2. Chloroform-Extraktion

Bei der Aufreinigung mit Chloroform wurde 1 Vol. Chloroform zur DNA-Lösung gegeben und diese geschwenkt bis sich eine weiße Emulsion bildete. Dann wurde die Lösung 5 min zentrifugiert.

II.3.3. Fällung und Waschen von DNA

Die Konzentrierung von DNA erfolgte durch Fällung mit Ethanol (96 % v/v) oder Isopropanol. Zu der wässrigen Oberphase (s. II.3.2.) wurde 2,5 Vol. Ethanol (96 % v/v) bzw. 0,7 Vol. Isopropanol zugegeben. Die Fällung der DNA erfolgte durch 10minütige Inkubation bei -70 °C und anschließender 20minütiger Zentrifugation (4 °C, 13 000 Upm). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (4 °C, 5 min, 13 000 Upm), getrocknet und in dem gewünschten Volumen $H_2O_{bidest.}$ oder TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer

Tris-Cl,pH 8,0	10	mМ
EDTA	1	mМ

II.4. DNA-Isolierung

II.4.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus Standortproben (Zhou et al., 1996; Entcheva et al., 2001)

Diese Methode der DNA-Isolierung basiert auf der direkten Lyse der Zellen, damit diese vor dem Aufschluss nicht von den Bodenpartikeln abgetrennt werden müssen. Die im Boden frei vorliegende DNA wird dadurch auch isoliert.

Zur DNA-Isolierung wurden 50 g Umweltprobe (Boden oder Pferdeexkremente) mit 135 ml DNA-Extraktionpuffer (DEP) und 1 ml Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 37 °C geschüttelt (240 Upm). Nach der Zugabe von 15 ml 20 % (v/v) SDS wurde diese Suspension für 2 Std. bei 65 °C inkubiert und dabei alle 15 min vorsichtig geschüttelt. Zur Trennung der gelösten DNA von Bodenpartikeln wurde das Gemisch zentrifugiert (10 min, 6 000 Upm, RT) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde noch zweimal mit je 45 ml DEP und 5 ml 20 % (v/v) SDS suspendiert und nach einer Inkubation für 10 min bei 65 °C wie schon beschrieben zentrifugiert.

Zur DNA-Extraktion wurden die gesammelten Überstände mit 1 Vol. Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1, v/v) gemischt und zentrifugiert (10 min, 5 000 Upm, RT). Die DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol und Inkubation für 1 h bei RT gefällt. Nach der Zentrifugation (7 500 Upm, 20 min, RT) wurde das Pellet mit eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 2 bis 3 ml sterilem $H_2O_{bidest.}$ aufgenommen. Falls notwendig wurde eine Dialyse gegen 1x TE-Puffer (s. II.3.3.) bei 4 °C ÜN durchgeführt.

DNA-Extraktionspuffer (DEP)

Tris	100	mМ
Na ₂ -EDTA	100	mМ
Na ₂ HPO ₄	100	mМ
NaCl	1,5	Μ
CTAB	1	%
pH 8,0		

II.4.1.1. Reinigung der aus Umweltproben isolierten DNA mit "WizardTM *Plus* Minipreps DNA Purification System"

Bei der verwendeten Methode zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Umweltproben (s. II.4.1.) wurden Huminsäuren mitgefällt. Diese inhibieren die nachfolgenden Klonierungsschritte wie Restriktionsverdau oder Ligation. Durch Reinigung mit dem "WizardTM *Plus* Miniprep DNA Purification System" (Promega Deutschland GmbH, Mannheim) konnten die Huminsäuren zum größten Teil abgetrennt werden. Dabei ging ein großer Teil der DNA verloren. Die Reinigung erfolgte nacheinander über zwei Wizard-Minisäulen. Dazu wurden 150 µl DNA-Lösung mit 150 µl H₂O_{bidest}. verdünnt, mit 1 ml "DNA Purification Resin" versetzt und auf den Säulenkörper pippetiert. Nach dem Waschen mit 2 ml Säulen-Waschlösung folgte eine Zentrifugation (2 min, 2 000 Upm) zum Trocknen des Säulenmaterials. Die Elution der DNA erfolgte mit jeweils 50 µl TE-Puffer (auf 65-70 °C vorgewärmt). Die Elution wurde sechsmal wiederholt, weil die Säule überladen war. Das verunreinigte Eluat wurde, wie vorher beschrieben, erneut bearbeitet. Die Endelution wurde viermal wiederholt.
II.4.1.2. Reinigung der aus Umweltproben isolierten DNA mit QIA Ex Kit

Die partiell verdaute DNA (s. II.7.1.) wurde in einen 0,8 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Die Fragmente mit einer Größe zwischen 30 und 40 kb wurden ausgeschnitten und mit dem "QIAEX II Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Gewisse Veränderungen des Protokolls (s. II.4.5.) wurden durchgeführt, um die Größe des Fragments intakt zu halten. Es wurden 30 μ l Silica-Gel Partikel und, wie vorgegeben, hochkonzentrierte Salzlösung mit dem Agarosestück gemischt und bei 50 °C inkubiert. Es wurde nicht gevortext sondern vorsichtig gemischt. Die Elution erfolgte bei 50 °C für 10 bis 15 min und wurde zweimal durchgeführt. Die in H₂O_{bidest.} aufgenommene DNA wurde im 0,8 % Agarosegel getestet und für eine spätere Ligation (s. II.7.3.) verwendet.

II.4.1.3. Dialyse von Gesamt-DNA

Die aus den Umweltproben isolierte DNA (s. II.4.1.) enthält hohe Salzkonzentrationen, die die weitere Anwendung stören. Deswegen musste zunächst eine Dialyse durchgeführt werden. Dazu wurden Dialyseschlauch-Stücke in TE-Puffer autoklaviert, mit DNA-Lösung befüllt und an beiden Enden mit Klammern verschlossen. Die Dialyse wurde für 24 Std. bei 4 °C gegen TE-Puffer durchgeführt: Der Puffer wurde nach ca. 4-5 Std. ausgewechselt. Anschließend wurde die DNA-Lösung mit Isopropanol gefällt (s. II.3.3.).

II.4.2. Isolierung von Gesamt-DNA aus Anreicherungskulturen (Entcheva et al., 2001)

Die DNA-Isolierung aus Anreicherungskulturen basiert auf einer bereits beschriebenen Methode (Streit et al., 1993). Gewisse Veränderungen waren notwendig, da hier ein Konsortium von Mikroorganismen vorlag, deren Lyse unter verschiedenen Bedingungen erfolgreich war. Nachdem die Zellen von Kulturen zwischen 100 ml und 11 pelletiert waren, wurden diese in 1 M NaCl resuspendiert und für 1 Std. auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (4 °C, 20 min, 13 000 Upm) wurde das Pellet in TE-Saccharose Puffer (20%, w/v) aufgenommen und die Zellen in DNA Extraktionpuffer (s. II.4.1.) mit 1 % SDS (w/v) für 2 bis 4 Std. lysiert. Die DNA-Extrakte wurden mit Sarkosyl-Proteinase K-Lösung (s. II.4.3.) versetzt und 2-3 Std. oder ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Gesamt-DNA wurde mit Phenol/Chloroform-Lösung (1:1, v/v) extrahiert. Diese Extraktion wurde 2 bis 3 mal wiederholt, bis eine klare viskose DNA-Lösung in der wässrige Phase vorhanden war. Anschließend wurde eine Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die DNA wurde gegen 21 TE-Puffer bei 4 °C ÜN dialysiert (s. II.4.1.3.). Anschließend wurde ein Aliquot der DNA in einen 0,8 % Agarosegel überprüft, um sicher zu stellen, dass diese nicht abgebaut war.

II.4.3. Isolierung chromosomaler DNA (Streit et al., 1993)

Eine ÜN gewachsene 5 ml Kultur von E.coli K12 oder 2 Tage gewachsene Kultur von Rhizobien wurde bei 4 °C mit 13 000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1 ml 1 M NaCl-Lösung resuspendiert und anschliessend 1 Std. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 300 µl TE-Saccharose-Lösung resuspendiert. Dann wurden 300 µl Lysepuffer hinzugegeben und der Ansatz 60 bis 120 min bei 37 °C inkubiert bis eine viskose Lösung zu sehen war. Diese wurde mit 300 µl Sarkosyl-Proteinase-K-Lösung versetzt, vorsichtig gemischt und bei 37 °C für mindestens 60 min bis ÜN inkubiert. Für die folgende DNA-Extraktion wurden 300 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1, v/v) hinzugegeben und gründlich aber vorsichtig durchmischt und 20 min bei 4 °C mit 13 000 Upm, abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig mit abgeschnittenen 1 ml Pippetenspitzen in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde zweimal mit Phenol/Chloroform-Gemisch und einmal mit Chloroform wiederholt. Dann wurde die DNA-Lösung mit 0,3 Volumen einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung und 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und ÜN bei –20 °C oder 10-30 min bei –70 °C gefällt. Anschließend wurde das Gemisch abzentrifugiert (20 min, 13 000 Upm, 4 °C). Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und die DNA in dem gewünschten Volumen TE-Puffer oder H₂O_{bidest} aufgenommen. Die chromosomale-DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Saccharose 1x TE-Puffer, pH 8,0	20 100	g ml
<u>Lysepuffer:</u> Lysozym RNase 1x TE-Puffer, pH 8,0	10 1 1	mg mg ml
<u>Sarkosyl-Lösung:</u> Sarkosyl H ₂ O _{bidest.}	5 100	g ml
Sarkosyl-ProteinaseK-Lösung: Sarkosyl-Lösung ProteinaseK-Lösung (20 %, w/v)	1 25	ml µl

II.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA

II.4.4.1. Minipräparation durch alkalische Lyse

Für die analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden bei High-Copy-Plasmiden 1,5 ml, bei Low-Copy-Plasmiden 3-4,5 ml einer in LB-Medium gewachsenen Bakterienkultur verwendet. Für *S. meliloti* wurden 5 ml TY-Kultur eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet (s. II. 2. 7.) und in 200 μ l Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Puffer P2 wurde der Ansatz höchstens 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l Puffer P3 wurde der Ansatz gründlich durchmischt und 10 min bei 4 °C mit 13 000 Upm abzentrifugiert. Zur Entfernung der restlichen Proteine wurde der Überstand mit Chloroform extrahiert (s. II.3.2.2.). Die DNA wurde anschließend mit 1 ml Isopropanol, 5-10 min bei –70 °C gefällt und 20 min bei 4 °C mit 13 000 Upm zentrifugiert (s. II.3.3.). Das Pellet wurde mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 20-50 μ l TE-Puffer aufgenommen. Reinheit, Konzentration und Größe der isolierten DNA wurden durch Restriktionsverdau (s. II.7.1.) und elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel überprüft. Die isolierte Plasmid-DNA konnte ebenfalls als "template" für die PCR verwendet werden (s. II.9.).

Puffer P1 (Resuspensionslösung)

Tris-HCl, pH 8,0	10	mM
EDTA	1	mM
RNase	100	μg/ml
Puffer P2 (Lysepuff	<u>er)</u>	
NaOH	200	mM
SDS	1	% (w/v)
Puffer P3 (Neutrali	sierungslö	isung)
K-Acetat	3	M
pH 5,5 (mit Eisessig	g eingestel	llt)

II.4.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Corynebacterium glutamicum

Die oben beschriebene alkalische Lyse (s. II.4.4.1.) wurde mit geringfügigen Änderungen auch bei der Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* angewandt. Da die Zellwand Gram-positiver Bakterien sehr viel mehr Peptidoglycan enthält als die Gram-negativer Bakterien, wurde das abzentrifugierte Zellpellet zur Schwächung der Zellwand 1 h bei 37 °C in 80 μ l Puffer P1 (s. II.4.4.1.) + 10 μ l frischer Lysozym-Lösung inkubiert. Dann wurden 10 μ l EDTA-Lsg. sowie 200 μ l Puffer P2 zugegeben und nicht mehr als 5 min bei RT inkubiert. Die Neutralisation erfolgte mittels der Zugabe von 150 μ l Lsg. III.

Lysozym-Stammlsg.	EDTA-Lsg.	<u>Lsg III</u>
100 mg/ml	0,5 M EDTA	5,0 M KAc
	pH 8,0 (NaOH)	pH 5,5
		(Eisessig)

II.4.4.3. Adsorption an Silicagel

Für besonders reine Plasmid-DNA wurde ein QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet. Dabei wurden bis zu 25 µg Plasmid-DNA (bei hoher Kopienzahl) aus 3-5 ml *E. coli*-Kulturen gewonnen. Das Prinzip beruht ebenfalls auf alkalischer Lyse der Zellen mit nachfolgender Adsorption an eine Silicagelmatrix in

Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Die in H₂O_{bidest.} eluierte DNA war für die PCR und Sequenzierungen verwendbar.

II.4.4.4. Anionenaustauschchromatographie

Größere Plasmidmengen wurden mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit (Fa. Qiagen, Hilden) isoliert. Abhängig von der Kopienzahl wurde eine 25-500 ml Kultur ÜN bei 37 °C inkubiert. Nach der Zellernte (s. II.2.7.) wurde das Pellet in einem vom Hersteller vorgeschriebenen Volumen P1-Puffer gelöst. Dann wurde die gleiche Menge P2-Puffer hinzugegeben und der Ansatz nich länger als 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde P3-Puffer hinzugegeben und das Gemisch wurde 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (4 °C, 30 min, 13 000 Upm) wurde der Überstand abgenommen und zur vollständigen Entfernung der Proteine erneut für 15 min zentrifugiert. Es folgte eine Reinigung durch Anioneaustauschchromatographie über eine Qiagen Tip 100-Säule. Der Überstand aus der letzten Zentrifugation wurde auf die mit Niedrigsalzpuffer (QBT) äquilibrierte Säule aufgetragen und nach einem Waschschritt (QC-Puffer) mit salzhaltigem Tris-Puffer (QF) unter schwach alkalischen Bedingungen eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt, gewaschen (70 % w/v Ethanol), getrocknet und in TE-Puffer oder H₂O_{bidest.} aufgenommen.

II.4.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Durch präparative Agarosegelelektrophorese (s. II. 5.1) wurden DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem "QIAEX II Gel Extraction Kit" (Fa. Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Das Reinigungsprinzip beruht auf dem Lösen der Agarose in einer hochkonzentrierten Salzlösung mit Silica-Gel Partikeln, die die Nukleinsäuren adsorbieren. Durch eine niedrig konzentrierte Salzlösung oder sterilem H₂O_{bidest}. wurden die Nukleinsäuren bei 37 °C oder 50 °C wieder von den Gelpartikeln gelöst. Die Gelpartikeln wurden abzentrifugiert, wobei die Nukleinsäuren im Überstand gelöst blieben. Falls die Konzentration der DNA-Lösung nicht ausreichend für eine Ligation war (unter 100 ng/µl) wurde diese mit der Hilfe einer Speedvac Zentrifuge (SpeedVac Plus SC110A, Savant) aufkonzentriert.

II.5. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

II.5.1. Standard-Agarosegelelektrophorese

Sie diente zur Größen- und Konzentrationsbestimmung sowie zur präparativen Auftrennung und Aufreinigung von Nukleinsäuren. Zur schnellen Analyse wurden Mini-Gelkammern mit einer Gelfläche von 10 x 6,5 cm (Pharmacia Biotech[®]; Hoefer[®] HE33 Mini Horizontal Submarine Unit) verwendet. Je nach verwendetem Kamm war es möglich 12-16 Proben mit einem Volumen von 10 µl aufzutrennen. Die Agarosekonzentration war abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente. Es wurden zwischen 0,8 und 1,6 % (w/v) Agarosegele in 1 fach konzentriertem TAE-Puffer eingesetzt. Das Gel wurde mit TAE-Puffer überschichtet. Die Elektrophorese wurde bei 80 Volt für 60-70 min in einer Elektrophorese-Kammer durchgeführt. Zur Beschwerung und Markierung der Lauffront wurden die Proben mit 1/10 Vol. Lade-Puffer gemischt. Die Gele wurden für ca. 10 min in einem Wasserbad mit 1 μ g/ml Ethidiumbromid gefärbt und danach 5 min gewässert, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Die Färbung der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe von UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) in einer Gel-Dokumentationsanlage von BioRad[®] (GelDoc 1000, Dokumentationsprogramm: Multi-Analyst-V.1.1.1) sichtbar gemacht, fotografiert und auf einem Thermodrucker (Mitsubishi Video Copy Prozessor P66DE) ausgedruckt.

<u>TAE-Puffer (50 x)</u>

Tris	2	Μ
EDTA	100	mM
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000	ml
pH 8,1	mit Essigsäure ein	nstellen

DNA-Lade-Puffer

EDTA, pH 8,0	40	mМ
Ficoll 400	1,5	g
Bromphenolblau	10	mg
H ₂ O _{bidest.}	5	ml

II.5.2. Größenbestimung von Nukleinsäuren

Die Größenbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Vergleich mit den Standards GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder oder GeneRulerTM DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) auf einem 0,8 % (w/v) Agarosegel.

II.6. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Messung ihrer Absorption bei 260 nm gegen H₂O_{bidest.} (Pharmacia Biotech Ultrospec[®] 3000-Fotometer) bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1,0 bestimmt in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke, entspricht ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook et al., 1989). Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde die Absorption bei 280 nm ermittelt. Als Richtwert für "reine" DNA-Lösungen gilt ein Verhältnis E₂₆₀ : E₂₈₀ von ca. 1,8 (Sambrook et al., 1989). Die Lösungen wurden je nach Konzentration 50 bis 300-fach verdünnt und nach sorgfältiger Durchmischung in Mikroquarzküvetten gemessen. Alternativ dazu wurde die Konzentration nach der Elektrophorese im 0,8 % (w/v) Agarosegel (s. II.5.1.) im Vergleich zu dem GeneRulerTM 1 kb Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) abgeschätzt.

II.7. Enzymatische Modifikation von DNA

II.7.1. Restriktionsspaltung

Für die analytische Restriktion von Plasmiden werden sog. TypII-Restriktionsendonukleasen verwendet, die die DNA an einer für das jeweilige Enzym spezifischen, i. d. R. palindromischen Erkennungssequenz, spalten können.

Die DNA-Lösungen wurden mit 2-10 U/µg DNA einer Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer zwischen 1 Std. und 4 Std. bei der optimalen Temperatur vollständig verdaut. Doppelverdaus mit Restriktionsendonukleasen, die unterschiedliche Puffer benötigen, erfolgten in einem Puffersystem, in dem die Aktivität beider Enzyme höher als 60 % war. Die präparative Restriktion wurde im 60 μ l Ansatz durchgeführt, wobei die DNA Konzentration pro μ l nicht größer als 250 ng war. Die Restriktionsenzyme wurden durch Chloroform-Extraktion inaktiviert.

Der partielle Verdau von Gesamt-DNA aus Umweltproben oder Anreicherungskulturen wurde in einer Verdünnungsreihe durch das Enzym *Sau*3A I durchgeführt. Es wurden 10 U Enzym bis zu 10⁻⁸ fach verdünnt und nie mehr als 250 ng DNA verdaut.

II.7.2. Herstellung von glatten Enden mit "Klenow-Fragment"

Zur Ligation von DNA-Fragmenten, deren Schnittstellen nicht kompatibel waren, wurden die überhängenden 5'-Enden mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Dazu wurde folgender Ansatz gemischt:

DNA-Fragment	10	μl (0,2 - 2 μg)
Klenow-Puffer (10x)	2	μl
Klenow-Fragment (2 U/µl)	0,5	μl
H ₂ O _{bidest.}	5,5	μl

Das Gemisch wurde 3 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die dNTP's zugegeben. dNTP's (10 μ M) je 0,5 μ l Es folgte eine weitere Inkubation für 10 min bei 37 °C. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in dem gewünschten Volumen H₂O_{bidest.} aufgenommen und in dieser Form für Ligationen (s. II.7.3.) eingesetzt.

II.7.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Im Gegensatz zur DNA-Ligase aus *E. coli* kann die hier verwendete T4-DNA-Ligase sowohl überhängende (sticky) als auch glatte (blunt) DNA-Enden ligieren. Dabei wird die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe zweier benachbarter Nukleotide katalysiert.

Die Reaktion wurde für blunt end- und sticky end-Ligationen in 20 µl-Ansätzen durchgeführt, in dem jeweils 0,2 bis 1 µg Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis 1:3 enthalten waren. Der Ansatz enthielt 1 U T4 DNA-Ligase (Promega Deutschland GmbH, Mannheim) und in 1-facher Konzentration den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer. Für eine "blunt-end" Ligation wurde PEG 5000 in einer Endkonzentration von 5 % zugesetzt. Die Ansätze wurden 12 bis 16 Std. bei 16 °C inkubiert.

II.7.4. Nicht-radioaktive Markierung von DNA

Für nicht-radioaktive Hybridisierungssexperimente wurden DNA-Sonden mit Hilfe "Digoxigenin-dUTP-DNA-labeling-Kit" (Boehringer Mannheim des GmbH, Mannheim) nach der Methode des "Random Priming" markiert. Ähnlich wie bei der PCR (s. 9) wird einzelsträngige DNA des Fragmentes, welche im folgenden als Sonde eingesetzt werden soll, als Matrize verwendet. An diesee Matrize wird ein markierter komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Die Synthese erfolgt durch das sog. "Klenow-Fragment", eine DNA-Polymerase I aus E. coli, deren 5'-3'-Exonuklease-Aktivität proteolytisch entfernt wurde. Neben einem Gemisch aus Hexanukleotiden mit statistischer Basensequenz als Startermoleküle (Primer) wird ein Mix der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP und Digoxigenin-dUTP verwendet. Das Digoxigenin, das über ein Spacer-Molekül mit dUTP verbunden ist, wird von dem Klenow-Fragment in die neu synthetisierten DNA-Stränge eingebaut. Die als Primer verwendeten Hexanukleotide lagern sich an unterschiedlichen Stellen entlang der Matrize an, so dass DNA-Sonden verschiedener Länge entstehen. Die Dig-markierten Basen der Sondenmoleküle können bei nachfolgenden Hybridisierungsexperimenten durch Antikörper nachgewiesen werden.

Als Matrize wurde ein durch PCR amplifiziertes und gelgereinigtes Fragment verwendet. Dieses wurde 10 min bei 95 °C denaturiert und sofort für 5 min auf Eis inkubiert.

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis wie folgt zusammenpipettiert:

DNA-Fragment	15 μl (0,01-3 μg)
Hexanukleotid-Gemisch	2 µl (3,12 µg)
dNTP-Markierungsgemisch	2 μl (je 2 nmol dNTPs; 0,7 nmol Dig-UTP)
Klenow-Fragment	1 μl (Endkonz. 100 U/ml)

Nach Inkubation des Ansatzes für 20 Std. bei 37 °C wurde die Sonde mit 96 % Ethanol (v/v) gefällt, mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen und in 50 μ l H₂O_{bidest.} aufgenommen.

II.8. Übertragung von DNA und Selektion rekombinanter Klone

II.8.1. Transduktion

Um Genbanken mit relativ großen Fragmenten (um 30 kb) herzustellen, wurden Cosmidvektoren verwendet. Diese können, falls sie dementsprechend große Inserts tragen, *in vitro* in λ -Phagen Köpfe verpackt und in dafür geeignete *E. coli*- Stämme transduziert werden.

In dieser Arbeit wurden sowohl Gigapack III Gold Packeging Extract (Stratagene, Heidelberg) als auch ein Zwei-Komponenten-*in vitro*-Verpackungssystem verwendet. Dieses Zwei-Komponenten System besteht aus den Lysaten der Stämme *E. coli* BHB 2688 und *E. coli* BHB 2690, die nur gemeinsam die Verpackung der Ligationsansätze ermöglichen (Sambrook et al., 1989).

II.8.1.1. Herstellung des "Freeze-Thaw" Lysates aus E. coli BHB 2688

Zuerst wurde ein Lysogenie-Test vorgenommen. Von einer auf LB-Platte (s. II.2.1.1.) gewachsenen Einzelkolonie des Stammes *E. coli* BHB 2688 wurden Ausstriche auf zwei LB-Platten gemacht. Eine davon wurde bei 30 °C und die andere bei 42 °C inkubiert. Für weitere Arbeiten wurden solche Kolonien genommen, die ein Wachstum nur bei 30 °C zeigte. Eine 10-ml Vorkultur in LB-Medium wurde mit einer Einzelkolonie von der 30 °C- Platte angezogen und ÜN inkubiert.

Anschliessend wurde eine 500-ml Hauptkultur mit 3 ml der Vorkultur beimft und bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer OD_{578} von 0,3 inkubiert. Die Kultur wurde bei 45 °C für 15 min in einem Schüttelwasserbad induziert und weiter bei 37 °C unter Schütteln (160-220 Upm) inkubiert.

Danach wurde 1 ml dieser Kultur in ein 2-ml ERG überführt und einem Chloroform-Test durch die Zugabe von 1 Vol. Chloroform unterzogen. Die Lösung wurde innerhalb kurzer Zeit klar. Die Hauptkultur wurde auf Eis für 15 min abgekühlt und abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 4 000 Upm, GSA-Rotor). Das gesamte Pellet wurde in 0,8 ml frischer Saccharose-Lösung resuspendiert und auf zwei gekühlte Schraubdeckel-E-Cups aufgeteilt. Es folgte die Zugabe von je 30 µl frisch angesetzter Lysozym-Lösung. Nachdem die Proben durchmischt waren, wurden die E-Cups mit geöffneten Deckel zum Schockgefrieren im flüssigen Stickstoff gehalten. Nach Auftauen der Lysate auf Eis (ca. 30 min) wurden je 100 µl frisch vorbereiteter M1-Puffer zugegeben, gut gemischt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (2 °C, 1 Std., 13 000 Upm) entfernt. Der Überstand wurde auf Eis in vorher gekühlte E-Cups aliquotiert, in flüssigen Stickstoff getaucht und bei –70 °C aufbewahrt.

M1-Puffer:

Tris-HCl (pH 7,4) Spermidin Putrescin MgCl ₂ ATP Mercaptoethanol	6 30 30 18 15 0,2	mM mM mM mM % (v/v)
<u>Saccharose-Lösung:</u> Tris-HCl (pH 7,4) Saccharose	50 10	mM % (w/v)
<u>Lysozym-Lösung:</u> Tris-HCl (pH 7,4) Lysozym	250 10	mM mg/ml

II.8.1.2. Herstellung des Ultraschall-Lysates aus E. coli BHB 2690

Der Stamm *E. coli* BHB 2690 wurde bis zur Anzucht der 500 ml Hauptkultur genau so behandelt wie es für den Stamm *E. coli* BHB 2688 beschrieben ist (s. oben). Diese

Hauptkultur wurde bis zu einer OD_{578} von 0,22 inkubiert. Es folgte eine Induktion für 15 min bei 45 °C im Wasserbad und eine Inkubation für 1,5 Std. bei 37 °C. Im Falle eines positiven Chloroform-Tests (s. II.8.1.1.) wurde die Kultur wie beschrieben abgekühlt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml Ultraschall-Puffer aufgenommen und auf zwei eiskalte 2-ml ERG verteilt. Es folgte die Ultraschallbehandlung in einem NaCl-Eisbad. Die E-Cups wurden in die Ultraschall-Anlage (UP 200s, Dr. Hielscher GmbH) eingespannt und die Zellsuspension jeweils 30 bis 40 mal für 5 sec mit einer Amplitude von 20 bis 25 Micron beschallt. Zwischen den Beschallungen lagen jeweils 20 s Pause.

Anschliessend wurden die beiden Lösungen zentrifugiert (2 °C, 10 min, 7000 Upm), um die Zelltrümmer zu entfernen. Es erfolgte die Zugabe von je 0,6 ml M1-Puffer (s. II.8.1.1.). Die Proben wurden in eiskalte E-Cups aliquotiert. Die Lysate wurden bei -70 °C aufbewahrt und waren für mehrere Monate haltbar.

Ultraschall-Puffer:

Tris-HCl (pH 8,0)	20	mM
MgCl ₂	3	mM
Mercaptoethanol	10	mM
EDTA-Na ₂	1	mM

II.8.1.3. Verpackung

Zur *in vitro*-Verpackung von Ligationsansätzen (oder Konstrukten) in Cosmidvektoren wurden die bei –70 °C aufbewahrten Lysate (s. II.8.1.1. und II.8.1.2.) oder ein Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene, La Jolla, CA) auf Eis aufgetaut (für ca. 5 min) und mit dem Ligationsansatz in vorgekühlten ERG mit ebenso vorgekühlten Spitzen wie folgt luftblasefrei gemischt:

Ultraschall-Lysat	4 µl
"Freeze-Thaw"-Lysat	14 µl
Ligationsansatz	2 µl

Nach einer Inkubation für 2 Std. bei 22 °C wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 30 sec. So vorbereitete Verpackungsmixe sind mehrere Tage bei 4 °C haltbar.

<u>SM-Puffer:</u>		
NaCl	10	mM
MgSO ₄	8	mМ
Tris-HCl, pH7,5	50	mM
Gelatine	0,01	% (w/v)

II.8.1.4. Herstellung phagenkompetenter Zellen

Als Wirtstamm diente *E. coli* VCS 257. Von einer frisch ausgestrichenen LB-Platte wurden die Zellen in 10 ml LB-Medium mit 0,2 % (w/v) Maltose und 10 mM MgSO₄ bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 2000 Upm). Das Pellet wurde zur Hälfte des ursprünglichen Volumens in 10 mM MgSO₄ aufgenommen. Die Suspension wurde weiter bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt, um die Infektion durchzuführen.

II.8.1.5. Transduktion

II.8.1.5.1. Titerbestimmung

Der Verpackungs-Mix wurde 1:5, 1:10 und 1:50 mit SM-Puffer (s.o.) verdünnt und davon jeweils 25 μ l mit 25 μ l kompetenten Zellen (OD₆₀₀=0,5) vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 22 °C wurden je 200 μ l LB-Medium hinzugegeben. Die Proben wurden für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen auf LB-Agarplatten unter Selektionsdruck ausplattiert. Um die Bank anzulegen, wurde die effektivste Verdünnung verwendet.

II.8.1.5.2. Transduktion im großen Maßstab

Eine 30-ml LB-Kultur wurde mit dem Stamm *E. coli* VCS 257 angezogen. Die kompetenten Zellen wurden so hergestellt, wie es bereits für die Titerbestimung (s. II.8.1.5.1.) beschrieben wurde. Der Verpackungs-Mix wurde entsprechend der effektivsten Verdünnung mit SM-Puffer eingestellt. Dann wurde ein äquivalentes Volumen an Zellen, die eine OD_{600} von 0,5 aufwiesen, zugegeben. Nach 30 min

Inkubation bei 22 °C wurde das LB-Medium hinzugegeben (pro 1 ml Zellen/ Verpackungs-Mix Gemisch 4 ml LB-Medium). Die nachfolgende Inkubation erfolgte unter langsamen Schütteln bei 37 °C. Der Ansatz wurde nach 1h abzentrifugiert (4 °C, 15 min, 1 500 Upm). Das Pellet wurde in 1 bis 2 ml LB-Medium aufgenommen, in 500 µl Aliquots auf LB-Agarplatten (14 cm) ausplattiert und ÜN unter Selektionsdruck bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wurden die Kolonien gezählt und von den Platten abgeschwemmt. Von der Zellsuspension wurden Glycerinkulturen angelegt (s. II.2.6.). Die Fragmente in den Cosmiden wurden überprüft nachdem die Plasmid-DNA isoliert wurde (s. II.4.4.1.).

II.8.1.6. Selektion biotinproduzierender Cosmide

Um eine schnelle Selektion *bio*-Operons tragender Cosmide durchzuführen, wurden die "Pools" der Klone nach der Transduktion in *E. coli* ATCC 33767 (s. Tabelle 1) direkt in 10 ml M9 Medium (s. II.2.1.2.) mit der Zugabe von Antibiotika (s. II.2.4.) überführt. Es wurden 2 weitere Überimpfungen in Anwesenheit von Avidin (0,065U/ml) durchgeführt, um die wirksamsten *bio*-Operons enthaltende Cosmide auszuwählen. Anschließend wurden diese auf CA-Agarplatten unter Antibiotika Selektionsdruck (s. II.2.1.2.) ausgestrichen, um das Wachstum von einzelnen Kolonien nachzuweisen.

II.8.2. Transformation

II.8.2.1. Herstellung der hochkompetenten Zellen

Der zu transformierende *E. coli*-Stamm wurde in 50 ml LB-Medium supplementiert mit 0,125 ml 1 M MgSO₄ + 1 M MgCl₂ und 0,0625 ml 40 % (w/v) Glukose und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (4 °C, 15 min, 3 500 Upm, GSA Rotor). Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem TFRP1 aufgenommen und 1-2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 2 ml TFRP2 resuspendiert. Die Zellsuspension

wurde zu je $100 \,\mu$ l aliquotiert und bei $-70 \,^{\circ}$ C aufbewahrt. Dabei blieb die Kompetenz über mehrere Monate erhalten.

TEDD1	
IFKPI	2
	-

TFRP2:

	RbCl	100	mМ	RbCl	10	mM
	$MnCl_2$		50	MOPSmM	10	mМ
	CaCl ₂		10	CaCl ₂ mM	75	mМ
	K-Acetat	t	30	GlycerinM	15	% (w/v)
pН	5,8 mit	verdünnter	Essigsäure	pH 7,0 mit NaOH einst	elle	n
eins	tellen					

II.8.2.2. Transformation

Zur Transformation wurden 100 μ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 3 μ l Plasmid-DNA oder 5 μ l Ligationsansatz (s. II.7.3.) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 90 sec Hitzeschock bei 42 °C. Der Ansatz wurde dann für 3 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 800 μ l LB–Medium zugegeben. Zur Ausprägung der plasmidcodierten Antibiotikaresistenzen wurde 60 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden Volumina von 75-200 μ l auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die Transformanten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Plasmide in den Transformanten wurden durch analytische Plasmidpräparation überprüft (s. II.4.4.1.).

II.8.2.3. "Blau-Weiß" Selektion rekombinanter Klone

Zur Selektion von *E. coli*-Transformanten mit rekombinanten Plasmiden wurde der X-Gal-Plattentest verwendet. Damit stand neben der plasmidcodierten Antibiotikaresistenz ein weiterer Selektionsmarker zur Verfügung.

Die verwendeten *E. coli* Klonierstämme XL1-Blue und DH5 α sind durch eine Deletion im *lacZ*-Gen gekennzeichnet und können daher keine aktive β -Galactosidase bilden. Durch Transformation mit Plasmiden wie pBlueskriptII SK+, pBBR1MCS-2, pHSG399, die über die α -Untereinheit der β -Galactosidase verfügen, in der sich wiederum die Multiklonierungsstelle (MCS) befindet, kommt es zur Bildung eines aktiven Enzyms (Vieira und Messing, 1982). Dies kann auf X-Gal (5Brom-4-Chlorindoyl- β -D-galaktosid) und IPTG (Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid) haltigen LB-Agarplatten sichtbar gemacht werden, auf denen das *lacZ*-Gen durch IPTG induziert wird und die β -Galactosidase das Galaktoseanalogon X-Gal spaltet. Durch Luftoxidation wird ein blauer Farbstoff, 5,5`-Dibrom-4,4`-Dichlorindigo, sichtbar. Soll in die Multiklonierungsstelle des Plasmides ein Insert ligiert werden, wird der Erfolg der Klonierung nach Transformation anhand der Kolonienfarbe erkennbar. Plasmide mit einem Insert in der Multiklonierungsstelle und damit im *lacZ*-Gen können keine aktive β -Galactosidase bilden und erscheinen weiß (Blau/Weiß-Selektion).

II.8.3. Konjugation

Eine weitere Möglichkeit der DNA-Übertragung in eine Zelle ist die Konjugation. Diese Vorgehensweise wurde für die verschiedenen Rhizobium Stämme verwendet. Hierbei wird Plasmid-Einzelstrang-DNA von einem Donorstamm (*E. coli* S17-1) in einen Rezipientenstamm durch direkten Zellkontakt ("agar spot-mating"), über vom Donorstamm ausgebildete sog. F-Pili übertragen. Die für die Konjugation notwendigen *tra*-Gene befinden sich auf dem konjugativen Plasmid RP4, das in das Chromosom des Donorstammes integriert wurde (Simon et al., 1983). Das vom Donorstamm zu übertragende Plasmid muss mobilisierbar sein, d. h. es muss einen Transferursprung (*ori*T) enthalten.

II.8.3.1. Anzucht des Rezipientenstammes

Die Rhizobien, *K. planticola* und *R. eutropha* H16 Rezipientenstämme wurden von einer frischen Platte in 5 ml TY-Flüssigkulturen mit den entsprechenden Antibiotika gegeben und ca. 48-72 Std. bei 30 °C inkubiert.

II.8.3.2. Anzucht des Donorstammes

Als Donorstamm wurde *E. coli* S17-1, welcher unterschiedliche mobilisierbare Konstrukte enthielt, verwendet. Die Zellen wurden in 5 ml LB/Kanamycin (30 μ g/ml) angeimpft und 16 Std. bei 37 °C oder 24 Std. bei 30 °C inkubiert.

II.8.3.3. Konjugation und Selektion der rekombinanten Klone

Donor- und Rezipientenstamm wurden auf Eis abgekühlt. Jeweils 1 ml Kultur wurde in einem E-Cup abzentrifugiert (4 °C, 4 min, 11 000 Upm). Die Zellen wurden einmal mit 1 ml 10 mM MgSO₄ gewaschen und anschließend in je 250 µl 10 mM MgSO₄ resuspendiert (mit einer P1000 Pipette; nicht vortexen). Die Donor- und Rezipientenzellen wurden im Verhältnis 1:1 im E-Cup gemischt. Von diesem Donor-Rezipientengemisch wurden 10 µl Spots auf eine TY-Agarplatte getropft und für 24 Std. bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von einem Spot mit der Impföse genommen und in 1 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Aliquots von 20 bis 50 µl dieser Suspension wurden auf GTS-Agarose Platten (s. II.2.2.2.) unter Selektionsdruck ausplattiert. Alternativ wurden 30 µl von dem Gemisch direkt in 5 ml GTS-Medium inokuliert. Nach einer Inkubation von 4-5 Tagen entwickelten sich Transkonjuganten von Rhizobium, die die Konstrukte enthielten. Die Klone wurden mit PCR (s. II.9.) überprüft, wobei spezifische Primer für die Konstrukte und einzelne stammspezifische Gene (z.B. bioS; (Heinz et al., 1999)) verwendet wurden. Die Plasmide wurden durch Minipräparation (s. II.4.4.1.) auf ihre Identität getestet. Einzelne Kolonien wurden in 5 ml GTS-Medium angeimpft und auf kontinuierliches Wachstum überprüft.

II.8.4. Elektroporation kompetenter Corynebacterium glutamicum-Zellen

II.8.4.1. Herstellung von hochkompetenten Zellen (Liebl et al., 1989)

Neben der chemisch ausgelösten Kompetenz können Bakterien durch Einwirkung eines kurzen Stromstoßes in die Lage versetzt werden, DNA aufzunehmen. Dies kann durch Öffnung der Zelle für eine passive Diffusion der DNA geschehen oder dadurch, dass Medium zusammen mit der DNA in die Zelle fließt (Dower et al., 1988).

Eine 250 ml *C. glutamicum* R163 LB-Kultur wurde ÜN auf einem Schüttler bei 30 °C inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 wurde die Kultur in Eiswasser abgekühlt und die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 5 000 Upm, 20 min). Die Zellen wurden 2 mal mit 200 ml eiskaltem GT-Puffer gewaschen, in 40 ml eiskaltem GT-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert (4 °C, 5 000 Upm, 10 min). Nach nochmaligem Waschen mit 40 ml eiskaltem GT-Puffer wurde das Zellpellet in 450 μ l eiskaltem GT-Puffer aufgenommen, in 150 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –70 °C gelagert.

GT-Puffer

Glycerin	10	%
Tris-HCl	8	mМ
рН 7,4		

II.8.4.2. Elektroporation und Selektion (Liebl et al., 1989)

Nachdem die Zellen auf Eis aufgetaut waren, wurden sie abzentrifugiert (4 °C, 5 min, 12 000 Upm) und in 1,5 ml kaltem, 10 % Glycerin (v/v) resuspendiert (insgesamt 3 mal). Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 180 µl kaltem, 10 % igem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden mit ca. 1 µg DNA gemischt und in eine sterile, auf Eis vorgekühlte Elektroporations-Küvette (Equibio, peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gegeben. Evtl. vorhandene Luftblasen wurden durch kurzes Vortexen der Küvette entfernt und die Küvette wurde bis zum Stromstoß auf Eis gekühlt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, sollte die Zeitkonstante ≥ 4,5 ms sein. Nach der Elektroporation wurden sofort 1000 µl BHIS (s. II.2.3.) in die Küvette gegeben, die Lösung in ein E-Cup umgefüllt und 1 Std. bei 30 °C inkubiert (bei aeroben Bakterien idealerweise unter Schütteln).

10 % Glycerin (v/v)

Glycerin	12	ml
H ₂ O MilliQ	ad 100	ml

II.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifikation von bestimmten DNA Fragmenten (Gene oder Operons) für weitere Klonierungen verwendet. Durch PCR kann eine spezifische DNA-Sequenz (Zielsequenz) um den Faktor 10^6 angereichert werden (Saiki et al., 1988). Zur *in vitro*-Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR (Mullis and Faloona, 1987) wurden *Taq*- und *Pfu*-DNA-Polymarasen verwendet. Oligonukleotide mit Längen von 24 bis 35 Basenpaaren, die die Zielsequenz flankieren, wurden als Primer eingesetzt. Als Matrize diente Gesamt-, Cosmid- oder Plasmid-DNA. Die Anlagerungs-Temperatur T_{ann} lag zwischen 60 und 72 °C (s. Tab. 3) und wurde

nach der Formel von Chester und Marshak (1993) berechnet:

 $T_{ann.}$ (°C) = 69,3 + 0,41 (% GC) - (650 / L)

 $T_{ann.} =$ Anlagerungs- ("annealing") Temperatur % GC = prozentualer Gehalt der Basen Guanin und Cytosin in der Primersequenz L = Länge des Primers

Zur Abschätzung der Schmelztemperatur wurde folgende Formel angewendet:

 $T_{m} (^{\circ}C) \equiv 2 x (N_{A} + N_{T}) + 4 x (N_{G} + N_{C})$ $T_{m} = \text{Schmelztemperatur}$

N = Anzahl der Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T) im Primer, wobei nur die zum Template komplementären Basen gezählt wurden.

Die Amplifikation wurde in Aliquots von 20 bis 50 µl in einem PCR-Gerät "Primus" mit beheizbarem Deckel der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Folgende Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert:

PCR Reaktionansartz:

DNA Matrize	1	μl	$(\leq 500 \text{ ng Gesamt- oder Cosmid-DNA}; \leq 200 \text{ ng}$
		-	Plasmid-DNA)
Primer 1	1	μl	(100 pmol)
Primer 2	1	μl	(100 pmol)
dNTP-Mix	8	μl	(je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Puffer	10	μl	(10x <i>Pfu</i> - oder <i>Taq</i> -Puffer)
DMSO*	10	μl	
dH ₂ O	68	μl	
Pfu	1	μl	(9 U/Ansatz) (<i>Taq</i> -)Polymerase
*DMSO in 10 %	5 Endk	onzentrat	ion erlaubt für längere Zeit, die DNA-Matrize einzelsträngig zu

halten, um eine bessere Anlagerung des Primers zu ermöglichen.

Für die Amplifikation von Fragmenten, die weiterhin kloniert werden sollten, wurde die *Pfu*-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, Promega, Mannheim) verwendet, da sie aufgrund ihrer 3`-5`-Exonuklease-Aktivität ("proofreading"-Funktion) eine sehr geringe Fehlerrate (1,3 x 10^{-6} , *Taq*-Polymerase: 8,0 x 10^{-6} , Lundberg et al., 1991) aufweist.

Für Amplifikation von unterschiedlich langen Fragmenten wurden verschiedene Programme durchgeführt, die alle folgende grundlegende Schritte enthielten:

1. Denaturierung		5 min bei 95 °C
2. 25-35 Zyklen	Denaturierung	45 sec bei 95 °C
	Anlagerung der Primer	1 min bei X °C
	Neusynthese	Y min bei 72 °C
3. Anreicherung		5-15 min bei 72 °C

X °C ist die Anlagerungtemperatur, die von den Schmelztemperaturen der Primer abhängig war.

Y min ist Zeit, die für die Neusynthese der Fragmente notwendig ist und hängt von deren Länge ab. Für die Ansätze mit Taq-Polymerase wurde 1 min/1 kb berechnet und für die Ansätze mit Pfu-Polymenrase wurden 1,5 min/1 kb berechnet.

Der PCR-Ansatz wird auf Eis gehalten, bis das PCR-Gerät die Denaturierungstemperatur erreicht hat. Auf diese Weise können unspezifische Anlagerungen und Primer-Schäden durch die 3`-5`-Exonuklease-Aktivität der *Pfu*-Polymerase vermieden werden.

Die präparativen Ansätze wurden mit einem sog. "hot start" durchgeführt. Die *Pfu*-DNA-Polymerase wurde nach den ersten 5 min Denaturierung in den Ansatz hineinpippetiert, um eine Verminderung ihrer Aktivität zu vermeiden.

Zum Nachweis positiver Klone, die nicht durch ein bestimmtes Merkmal selektioniert werden konnten, wurde die PCR mit *Taq*-Polymerase (Eigenproduktion Labor 37) durchgeführt. Als Template wurde eine Einzelkolonie von einer Agar-Platte in den Ansatz gegeben. Als Kontrolle diente das ursprünglich für die Amplifikation des jeweiligen Vektorteilstücks verwendete Plasmid oder Gesamt-DNA.

II.10. DNA-DNA-Hybridisierung

Zum Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen im Chromosom wurde eine DNA-DNA Hybridisierung durch Southern Blotting (Southern, 1975) durchgeführt. Im wesentlichen sind dazu drei Schritte notwendig. Zuerst wird die durch Restriktions-Enzyme geschnittene, genomische DNA auf einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.4) und von dort auf eine positiv geladene Membran übertragen. Da DNA-Moleküle über 10 kb Größe aufgrund ihrer geringen Mobilität nur schwer auf die Membran übertragen werden können, erfolgt zusätzlich zur Restriktion eine Hydrolyse. Durch Inkubation des Gels in 250 mM HCl wird die DNA partiell depuriniert. Bei der darauffolgenden Einwirkung einer stark alkalischen Lösung werden die Phosphodiesterbindungen an den depurinierten Stellen hydrolysiert und es entstehen kleinere, leichter übertragbare DNA-Fragmente. Zudem wird ds-DNA in Einzelstränge aufgespalten. Im zweiten Schritt wird die Membran mit für die gesuchte Sequenz spezifischen, markierten, einzelsträngigen DNA-Sonden inkubiert. Im dritten Schritt werden die mit der fixierten DNA hybridisierten Sonden sichtbar gemacht.

Eine sichtbare Hybridisierung ist abhängig vom Anteil des Genoms, der zur Sonde komplementär ist, der Größe der Sonde und der Menge genomischer DNA, die auf dem Filter fixiert ist. Unter idealen Bedingungen kann eine einzelne Kopie eines Gens sichtbar gemacht werden. Hierzu müssen jedoch 10 µg DNA auf den Filter übertragen und mit einer Sonde hybridisiert werden, die mehrere hundert Nukleotide lang ist (Sambrook et al., 1989). Sehr kurze Sonden erschweren den Nachweis oder machen ihn sogar unmöglich. Für das hier verwendete DIG-System wird der Kolorimetrische Nachweis von 0,1 pg homologer DNA in einem Southern Blot auf einer Nylonmembran angegeben, was einer einzelnen Kopie eines Gens in weniger als 1 µg humaner genomischer DNA entspricht (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim).

II.10.1. Transfer von DNA auf Membranen durch Vakuum-Blotting

Mit bestimmten Endonukleasen geschnittene und in einem 0,8 %igen Agarose-Gel aufgetrennte DNA (60 V, ca. 120 min) wurde durch Vakuum-Blotting auf eine Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig; Böringer, Meinheim) übertragen. Das Agarose-Gel wurde in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt danach in einem sauberen Wasserbad entfärbt und fotografiert (s. II.5.1.).

Ein Stück kurz in H₂O_{bidest.} eingeweichte Nylonmembran, das etwa 1 cm breiter und länger war als die darübergelegte Maske, wurde luftblasenfrei auf die Ansaugfläche des Vakuumblotters (Vakuumblotter VB II, Biometra, Göttingen) gelegt. Nachdem die angefeuchtete Maske auf die Membran gebracht worden war, wurde das Gel ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt. Für den Transfer der DNA auf die Nylonmembran wurden folgende Lösungen, wie angegeben, bei einem konstanten Druck von 80-100 mbar durchgesaugt:

Depurinierungslsg.			10 min
HCl	0,25	М	
Denaturierungslsg	<u>.</u>		20 min
NaCl	1,5	Μ	
NaOH	0,5	М	
Neutralisierungsls	<u>g.</u>		20 min
Tris-HCl (pH 7,5)	0,5	Μ	
NaCl	3,0	М	
Transferlösung (20	<u>) x SSC)</u>		2 h
NaCl (pH 7,0)	3,0	М	
Na ₃ -Citrat	0,3	Μ	

Die Membran wurde kurz auf Whatman-Papier getrocknet (Blottingpapiere GB 02, Schleicher & Schuell) und zur Fixierung der DNA 45 sec mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) bestrahlt. Im getrockneten Zustand konnte die Membran auch bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

II.10.2. Dotblot

Die Gesamt oder Plasmid-DNA wurde 1:1 mit 10-facher SSC Lösung (s. II.10.1.) verdünnt und 4 bis 6μ l von diesem Gemisch wurden auf eine Nylonmembran gespottet. Nachdem die Spots getrocknet waren, folgte eine UV-Fixierung der DNA auf der Membran für 45 sec (s. II.10.1.).

II.10.3. Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden

Die Hybridisierungen der auf der Membran fixierten DNA erfolgte in einem Hybridisierungsofen (Biometra, Göttingen) und den dazugehörigen Röhrchen (Ochs, Bovenden). Die Membran wurde mit der DNA-tragenden Seite nach innen luftblasenfrei in das Röhrchen gelegt. Um ein unspezifisches Binden der Sonden an die Membran zu verhindern, wird vor der eigentlichen Hybridisierung eine sog. Prehybridisierung (Blockierung, "blocking") durchgeführt, bei der die Membran vollständig mit DNA abgedeckt wird. Als Blockierungsreagenz werden denaturierte DNA-Fragmente aus Lachssperma oder Hefezellen benutzt. Zur Prehybridisierung wurde ca. 15 ml Prehybridiserungslösung in das Hybridisierungsröhrchen gegeben und für 30 bis 60 min in dem Hybridisierungsofen bei 68 °C inkubiert. Dann wurden 50 µl hitzedenaturierter DIG-markierter Sonde (s. II.7.4.) zu der Membran gegeben und diese ÜN bei 68 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. Um ungebundene und unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Tag mit Niedrigsalzpuffern gewaschen: 2 mal für 5 min mit Puffer 1 bei Raumtemperatur und danach 2 mal 15 min. bei 68 °C mit Puffer 2.

Prähybridisierungslsg.

SSC		5	Х
N-Laurylsarkosin		0,1	% (w/v)
SDS		0,02	2%(w/v)
Blockierungsreage	nz	1	% (w/v)
H ₂ O _{bidest.}	ad	100	ml

Puffer 1

SSC	2	Х
SDS	0,1	% (w/v)

Puffer 2		
SSC	0,5	Х
SDS	0,1	% (w/v)

II.10.4. Detektion

II.10.4.1. Kolorimetrische Detektion

Die Detektion der mit der fixierten DNA hybridisierten Sonden erfolgte mit Hilfe des "DIG Nucleic Acid Detection Kit" (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim).

Ein Konjugat aus Anti-Digoxigenin Antikörpern und Alkalischer Phosphatase (Anti-Digoxigenin-AP) bindet an die hybridisierte Sonde. In einem zweiten Schritt werden kolorimetrische Substrate der alkalischen Phosphatase (Nitroblau-Tetrazolin-NBT und 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-BCIP) umgesetzt und bewirken eine violettbraune Färbung der Membran an den Stellen, an denen eine Hybridisierung stattgefunden hat.

Die Membran wurde zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der Antikörper für 30 bis 60 min in ca. 15 ml Blockierungslösung bei RT inkubiert. Dann wurden die Antikörper in die Blockierungslösung pipettiert und es folgte eine weitere Inkubation für 30 min bei RT. Die Antikörperlösung wurde entfernt und überschüssiges Antikörper-Konjugat wurde durch dreimaliges 15minütiges Waschen der Membran mit DIG1-Puffer bei RT entfernt. Die Membran wurde durch Schwenken in Detektionspuffer für 2 min äquilibriert, dann wurden in 10 ml Detektionspuffer 45 μ l NBT und 35 μ l BCIP gegeben und dieser mit der Membran zusammen in Folie eingeschweißt. Die Färbung der Banden erfolgte bei RT unter Lichtabschluss ohne Schwenken. Nach vollständiger Entwicklung aller Banden wurde der Detektionspuffer entfernt, die Membran mit H₂O_{bidest.} gespült und getrocknet.

DIG1-Puffer

TrisHCl (pH 7,5)	0,1	М
NaCl	0,1	М

<u>Blockierungslsg.</u>		
DIG1-Puffer	100	ml
Blockingreagenz	1	% (w/v)
Antikörperlsg.		
DIG 1-Puffer ca	a. 15	ml
Anti-DIG	150	mU/ml (Endkonzentration)
<u>Detektionspuffer</u>		
TrisHCl (pH 9,5)	0,1	M
NaCl	0,1	M

II.10.4.2. Nachweis auf Röntgenfilmen

Um spezifische Reaktionen zu erzeugen, wurde das Substrat CSPD (Böringer Meinheim) verwendet. Es reagiert mit der Alkalische Phosphatase ähnlich wie der NBT/BCIP Komplex. Die Reaktion kann auf einem Röntgenfilm (BioMax MR-1 Film, 13x18 cm, Kodak) detektiert werden. CSPD wurde 1:100 in Detektionspuffer verdünnt und ca. 500 µl dieser Lösung wurden auf die Membran gegeben und luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt. Die Membran wurde in eine Kassette (HypercassetteTM, Amersham Pharmacia) geklebt und im Dunkeln ein Röntgenfilm darauf gelegt. Der Film wurde in Abhängigkeit von der Stärke des Signals nach einer Exposition zwischen 1,5 h und ÜN entwickelt. Die Entwicklung erfolge für 5 min im Dunkeln im Entwickler Kodak LX 24 und die Fixierung wurde für 5 min im Fixierer Kodak AL 4 durchgeführt.

II.11. Sequenzierung und Analyse der Sequenzdaten

Die Isolierung der zu sequenzierenden Plasmide oder der PCR Fragmente erfolgte unter des Verwendung der QIAprep[®] Spin Miniprep Kits (s. II.4.4.3.) bzw. des QIAEX II Gel Extraction Kits (s. II.4.5.). Die Sequenzierung wurde durch das "Göttingen Genomics Laboraory" (G₂L) im Institut für Mikrobiologie und Genetik an der Universität Göttingen an einem ABI377 DNA-Sequencer durchgeführt.

Die Fluoreszenzsignale wurden automatisch in Sequenzdaten umgewandelt. Dazu wurden die Programme DNA- Sequencer Datacolection, Version 2.0 und Sequence

Analysis, Version 3.0 (Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die Sequenzen wurden zusätzlich manuell aus dem Verlauf der Kurven (Programm Cromas Version 1.43; Conor McCarthy; Australia) abgeleitet und verändert.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen "Clone Manager Scientific and Educational Software Version 4.0" und "ORF-Finder" (NCBI). Hiermit wurden offene Leseraster und Restriktionsschnittstellen gefunden. Die editierten Sequenzen wurden in GenBank deponiert und die accesion Nummern sind in der Tabelle 7 zu finden. Für Datenvergleiche wurde das Programm "BLAST" (Altschul et al., 1990) eingesetzt. Multiple Sequenzvergleiche wurden mit der Hilfe des Proramms "BLAST 2 Sequence" (NCBI) durchgeführt.

II.12. Bestimmung von Biotinkonzentrationen in Kulturüberständen

II.12.1. Kompetitiver ELISA Test (Chang et al., 1994)

Bei dieser Methode wurde die Biotinmenge durch ein kolorimetrisches Verfahren mit Hilfe antikörpergekoppelten Enzymreaktion Die einer ermittelt. Kulturüberstände wurden meistens 1:100 verdünnt, da einige Medienbestandteile mit dem Test interferieren können. Außerdem sollen die Überstände frei von Zellen und deren Trümmer sein, weil der Test in der Lage ist, alle biotinilierten Proteine (z.B. Acetyl-CoA-Karboxylase) nachzuweisen. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (4 °C, 30 min, 13 000 Upm). Enthielten die Kulturen Avidin, wurde eine Zentrifugation für 1 Std. bei 6 500 Upm durch "Filtron 10 K" (Filtron Technology Corporation, Northborough, MA) durchgeführt. Damit wurde abgesichert, dass keine Proteine mit gebundenem Biotin in dem Test eine Rolle spielen werden.

Zunächst wurde eine "96 Well Mikrotiterplat" mit dem "Biotin Conjugate rabbit IgG" für 2 Std. in einer feuchten Kammer beschichtet. Nach dreifachem Waschen mit PBS Puffer erfolgte das Blockieren unspezifischer Bindung mit Casein-Lösung. Nach einer Stunde Inkubation wurde erneut drei mal mit PBS gewaschen und anschließend die "ExtrAvidin Alkaline Phosphatase Conjugate"-Antikörper hinzugegeben. Dann wurden 100 μ l verdünnter Kulturüberstand oder Biotinlösung mit Konzentrationen zwischen 50 pg/ml und 10 μ g/ml hinzugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Substrat für die enzymgekoppelte

Farbreaktion zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C im Dunkeln. Die Farbintensität wurde in einem "BIORAD Microplate Reader" gemessen. Die Inkubation wurde in einem Mikrotiterplate-Fotometer bei 405 nm fortgesetzt und jede 15 min wurde die Intensität gemessen; insgesamt fünf mal.

Cesein Lösung (0,5 % geko	ocht)		PBS Puffer:	Phosphate-buffere	<u>d</u> saline
Casein (Biotin frei) 0,1 N NaOH PBS Puffer	0,5 10 90	g ml ml	(1x) NaCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ KCl H ₂ O Milli Q pH 7,4	8 1,15 0,20 0,20 ad 1000	g g g ml

Das Casein wurde in 10 ml 0,1 N NaOH und 90 ml PBS Puffer gelöst und autoklaviert. Nachdem die Lösung auf RT heruntergekühlt war, wurde der pH Wert auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde Thimerosal Natrium Salz bis zu einer Endkonzentration von 0,1 g/l hinzugegeben. Die Aliquots wurden bei –20 °C aufbewahrt.

Substratpuffer: sterilfiltrieren

Tris/Cl	1,2110	g
NaCl	0,5844	g
MgCl ₂	1,0170	g
H ₂ O Milli Q	ad 100	ml
pH auf 9,5 vorsich	tig einstellen	

Vor dem Gebrauch wurde das Substrat pNPP (p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium; Hexahydrate) in einer Endkonzentration von 2 mg/ml zugegeben und das Gemisch wurde im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt (bleibt bis zu 1 Woche stabil).

Tween 20-Lösung

Tween 20	25	μl
PBS Puffer	ad 100	ml
bei -20 °C aut	fbewahren	

<u>Antikörper</u>

Biotiniliert Ziege Anti-Kaninchen IgG1/ 5 000 verdünnt im PBS PufferExtrAvidin Alkaline Phosphatase Conjugate1/20 000 verdünnt in Tween 20 Lösung

II.12.2. Wachstumstest mit Lactobacillus plantarum ATCC 8014

Die Biotinkonzentration im Kulturüberstand der Reinkulturen (*E. coli* K12, *K. pneumoniae*, *R. eutropha* H16) und rekombinanter Bakterien wurde mittels *L. plantarum* Test gemessen (DeMoll and Shive, 1986; modifiziert). Der Test wurde im "Biotin Assay Medium" (Difco) durchgeführt.

Biotin Assay Medium (BAM)	7,5	g
MilliQ Wasser	100	ml

Das Medium wurde 3 min gekocht, abgekühlt und in 5 ml-Aliquots auf Reagenzgläser verteilt. Die Biotinlösungen wurden dazugeben und das Volumen wurde auf 10 ml mit MilliQ Wasser eingestellt. Das Medium wurde 5 Minuten autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

Für jeden Wachstumsversuch wurde eine Standardkurve erstellt. Biotin wurde in Endkonzentrationen von 10 pg/ml bis 100 ng/ml zugegeben. Um die Biotinmenge in den Überständen der Reinkulturen und der neu konstruierten Stämmen zu bestimmen, wurden diese entsprechend den Werten aus dem ELISA Test (s. II.12.1.), verdünnt. Die Kulturüberstände wurden wie im II.12.1 beschrieben vorbereitet. Ansließend wurde mit bereits ausgehungertem *L. plantarum* (mindestens ein mal in BAM mit Biotin in einer Konzentration von 10 pg/ml gewachsen) angeimpft. Die Wachstumsversuche wurden immer in 3-facher Wiederholung durchgeführt.

II.13. Zellaufschluss und Herstellung von Extrakten für zweidimensionale Gele

Die 2-D Gelelektrophorese erlaubt Proteingemischen, extrahiert aus Mikroorganismen, Zellkulturen und Gewebe, aufgrund zwei unabhängiger Parameter, pI (Isoelektrischer Punkt) und Molekularmasse, zu trennen. In der ersten Dimension werden die Proteine auf den sog. ImmobilineDryStrips (18 cm, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH) aufgetragen und unter hoher Spanung aufgrund ihres pI aufgetrennt. In der zweiten Dimension (SDS-PAGE) werden die Proteine nach deren Molekulargewicht getrennt.

Verschiedene *R. meliloti* 1021 Stämme wurden in 100 ml GTS Medium mit oder ohne Zugabe von Biotin angezogen und bis zum Erreichen ihrer Stationärphase inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (4 °C, 20 min, 9 000 Upm) und ÜN bei –20 °C weggefroren. Anschließend wurde das Pellet in 6 ml Lysepuffer aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte durch zweimaliges Passieren einer Frech-Press-Zelle (SLM AMINCO) bei 69 Mpa (= 1000 psi). Der Rohextrakt wurde für eine spätere Zentrifugation in SS34 Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Zelltrümmer hochtourig abzuzentrifugiert (4 °C, 20 min, SS34, 15 000 Upm). Schließlich wurde der klare Überstand abgenommen. Die Proteine im Überstand wurden mit 3 Vol. eiskaltem Aceton versetzt und ÜN bei –20 °C gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden pelletiert (SS34, 13 000 Upm, 20 min, 4 °C), das Pellet getrocknet und in 0,6-1 ml "*Sample*"-Puffer aufgenommen. Es wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (s. II.14.) um die Proteinkonzentration in den Lösungen zu bestimmen. Die Proteinextrakte wurden in Aliquots bei –20 °C

Es wurden ca. 100 μ g Protein für silbergefärbte Gele (s. II.15.2.2.) und 1 mg für die coomassiegefärbte Gele (s. II.15.2.1.) eingesetzt und auf 170 μ l mit *Sample* Puffer (mit Pharmalyte) aufgefüllt. Die Proben wurden mit jeweils 170 μ l Rehydrierungspuffer versetzt und auf die ImmobilineDryStrips geladen.

Lysepuffer:

Harnstoff	8 M	19,2	g	
Tris-Base	40 mM	0,194	g	
H ₂ O _{bidest.}		ad 40	ml	
Frisch anset	zten oder in A	liquots bei	–20 °C la	gern.

Sample Puffer:

Harnstoff	8 M	4,8	g
Tris-Base	35 mM	42,2	mg
CHAPS	2 %	200	mg
DTT	1 %	100	mg
Pharmalyte*	0,5 %	125	μl
H ₂ O _{MilliQ}		ad 10	ml
*Die Pharmal	vte wurden	frisch zu	gegeben

Rehydrierungslösung:

Harnstoff	8 M	12	g
CHAPS	2 %	500	mg
Pharmalyte	0,5 %	125	μĺ
Bromphenolb	lau	Wenig	e Körner
H ₂ O _{MilliQ}		ad 25	ml

In 1 ml Aliquots aufteilen und bei –20 °C lagern. 2,8 mg DTT direkt vor Gebrauch geben.

Nach der Isofokusierung wurden die ImmobilineDryStrips in Folie eigeschweißt und bei –70 °C aufbewahrt. Vor Durchführung der zweiten Dimension wurden die ImmobilineDryStrips in jeweils 10 ml Equilibrierungspuffer für 20 min geschwenkt und ein SDS-PAGE-Gel geladen.

<u>Aquilibrierungspuffer:</u>				
1,5 M Tris-Cl,pH 8,0	50 mM	6,7	ml	
Harnstoff	6 M	72,07	g	
87 % (v/v) Glycerin	30 % (v/v)	69	ml	
SDS	2 % (w/v)	4,0	g	
Bromphenolblau		Weni	ge Körne	er
H ₂ O _{bidest.}		ad 40	ml	
Vor dem Gebrauch 100 mgDTT pro 10 ml Puffer zugeben.				

II.14. Proteinbestimmung

Für eine quantitative Proteinbestimmung wurde der Protein-Assay von BIORAD verwendet, welcher auf der kolorimetrischen Methode nach Bradford (1976, modifiziert) basiert. Proteine und Peptide mit einem $M_r > 3000$ bilden mit dem in saurer Lösung anionisch vorliegenden Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 einen blauen Farbkomplex, der photometrisch bestimmt werden kann. Der Farbstoff bindet dabei an positiv geladene AS der Proteine. Maximal können Proteinmengen bis 10 µg bestimmt werden. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 1 µg.

Lösungen:

Nähere Informationen können die dem Kit von BIORAD beiliegenden Vorschriften entnommen werden.

Der Farbstoff (Bradford-Reagenz) konnte auch selbst hergestellt werden:

Bradford-Reagenz:

Coomassie Brilliant Blue G250	100	mg
oder Serva Blau G250	70	mg
96 % (w/v) Ethanol	50	m
85 % (w/v) H ₃ PO ₄	100	m
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000	m

Ein Volumen Coomassie wurde mit vier Volumen H₂O_{bidest.} verdünnt und mittels Filtration durch einen Faltenfilter von ungelösten Partikeln befreit. Die Lösung wurde gekühlt in einer abgedunkelten Flasche aufbewahrt.

In einer Halbmikro-Küvette legte man anschließend 1 ml der fertigen Coomassie-Lösung vor und vermischte den Ansatz mit maximal 20 μ l Probe. Es wurde für 15 Minuten bei RT inkubiert und anschließend die Extinktion bei einer OD von 595 nm gegen einen Ansatz ohne Protein gemessen. Aus einer Eichgeraden (diese wurde mit 0-20 μ g Protein aus dem Kit beiliegenden BSA-Stammlösung erstellt) konnte über den gemessenen Extinktionswert die Proteinmenge in der Probe ermittelt werden.

II.15. 2-D Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

II.15.1. Denaturierende PAGE (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE lassen sich Proteine entsprechend ihrer molaren Massen auftrennen, wobei Dimere bzw. Multimere in ihre Untereinheiten aufgetrennt werden.

Die meisten Proteine binden SDS in einem konstanten Verhältnis. Dodecylsulfat überträgt auf die Proteine eine sehr hohe negative Ladung, wodurch die eigentliche Ladung des Proteins maskiert wird. SDS- beladenen Proteine liegen somit in einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis vor. Die gesamte Oberfläche des Moleküls wird dabei negativ geladen. Für die Trennleistung in einem bestimmten Molekularmassenbereich ist der Vernetzungsgrad des SDS-Gels entscheidend. Lösungen:

Trenngel-Stammlösung:

Tris	8,2	g
SDS	0,4	g
H ₂ O _{bidest.}	ad 100	ml
pH 8,8		

Ammoniumpersulfat (APS): 10 % H₂O_{bidest.}

N,N,N`,N`-Tetramethylendiamin (TEMED)

1 x Elektrophorese-Puffer:

Tris	6,04	g
Glycin	28,84	g
SDS	2,0	g
H ₂ O _{bidest.}	ad 2000	ml
рН 8,4		

Herstellung der Gele:

Die technische Ausstattung basierte auf der BIORAD PROTEIN II XL Kammer. Zunächst wurden die Glasplatten und Spacer gründlich mit 96 %igen Ethanol gereinigt und in den Gießstand eingespannt. Das Trenngel wurde dann ohne APS und TEMED zusammenpipettiert und gründlich durchmischt. Dann wurde APS und TEMED hinzugegeben und nach kurzem Vortexen der Ansatz bis ca. 2 cm unter den obersten Rand der Glasplatten gegossen. Um eine gerade Oberfläche des Trenngels zu bekommen, wurde das Gel bis zum Rand mit Isopropanol überschichtet.

Das Gel sollte solange polymerisieren bis eine scharfe Trennlinie sichtbar wurde. Nach dem Abgiesßen des Isopropanols wurde der äquilibrierte "Immobiline DryStrips" auf das Trenngel gesetzt. Die Gele wurden 15 h bei 15mA gefahren. Pipettierschema (ausreichend für 2 große Gele):

<u>Lösung</u>	Trenngel 13 %
AA (40 %)	16,5 ml
TG	12,5 ml
H ₂ O _{bidest.}	20,75 ml
TEMED	75 µl
APS	125 µl

II.15.2. Proteinfärbung der SDS-PAGE Proteingele

II.15.2.1. Coomassie-Färbung

Das Prinzip der Färbung entspricht dem der Proteinbestimmung (s. II.14.)

Lösungen:

Coomassie-Färbelösung (mehrf	fach verwei	ndbar):
Coomassie-Brilliant-Blue R250) 1,5	g
Methanol	455,0	ml
Eisessig	80,0	ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000	ml

Entfärbelösung:

Methanol	250,0	ml
Eisessig	350,0	ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000	ml

Das Gel wurde nach der Elektrophorese zunächst in eine Färbewanne überführt und 30 min in Coomassie- Färbelösung bei RT geschwenkt. Nach Entfernen der Färbelösung und Spülen mit H₂O_{bidest.} wurde das Gel mit Entfärbelösung überschichtet und ÜN unter leichtem Schwenken bei RT entfärbt.

II.15.2.2. Polychromatische Silberfärbung (Blum et al., 1987; modifiziert)

Im Vergleich zur Coomassie- Färbung ist die Silberfärbung etwa 50 mal empfindlicher. Schon 1 ng Protein pro Bande reicht als Nachweis in einem Gel aus. Bei dieser Methode binden Silberionen an die Proteine. Durch Reduktion der gebundenenen Silberionen wird die Bildung von Silberkeimen hervorgerufen. 1. Fixierlösung (ausreichend für 2 grosse Gele):

Methanol	150	ml
Eisessig	36	ml
Formaldehyd (37 %,v/v)	0,3	ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 300	ml

2. Thiosulfatlösung (ausreichend für 2 grosse Gele):

$Na_2S_2O_3x5H_2O$	60	mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 300	ml

3. Imprägnierlösung (ausreichend für 2 grosse Gele):

AgNO ₃	0,6	g
Formaldehyd (37 %,v/v)	225	μl
H ₂ O _{bidest.}	ad 300	ml

4. Entwicklerlösung (ausreichend für 2 grosse Gele):

Na ₂ CO ₃	10,2	g
Formaldehyd (37 %,v/v)	150	μl
Thiosulfatlösung	6	ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 300	ml

5. Stopplösung (ausreichend für 2 grosse Gele):

EDTA	5,58	g
H ₂ O _{bidest.}	ad 300	ml
рН 7,5		

Die Inkubationen und die Waschschritte wurden nach folgendem Schemata durchgeführt:

- 1 bis 24 h in Fixierlösung
- 3 mal 15 min in 50 % Ethanol (v/v)
- 60 s in Thiosulfatlösung
- 3 mal 20 s in MilliQ Wasser
- 20 min in Imprägnierlösung
- 2 mal 20 s in MilliQ Wasser
- Schwenken in Entwicklerlösung bis die Banden gut erkennbar sind
- 10 s in MilliQ Wasser
- 15 min in Stopplösung
- 2 mal 20 s in MilliQ Wasser

Die Gele wurden anschließend in Cellophanfolie (BIORAD) eingeschweißt und getrocknet.

II.16. Chemikalien und Enzyme

Für Wachstums- und Selektionsmedien sowie Lösungen, Puffer und Reaktionsansätze wurden Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme der folgenden Firmen verwendet:

Amersham Pharmacia Biotech	Nylonmembranen; Endonukleasen
	(Braunschweig)
Boehringer (Mannheim)	CSPD, Klenow-Fragment der DNA-
	Polymenrase, DIG-dNTPs, DIG-AP
Biomol (Hamburg)	X-Ga,l IPTG
Difco (Augsburg)	Brain Heart Infusion, Bacto TM Pepton,
	Biotin Assay Medium, Casaminosäuren
Eurogentech (Seraing, Belgien)	Agarose
Fluka (Buchs, Schweiz)	Glycerin 87 %
<u>Kodak (Stuttgart)</u>	Röntgenfilme, Röntgenfilmentwickler und -fixierer
MBI Fermantas (St. Leon-Rot)	dNTPs, Ladder-Mix, Endonukleasen
Merck (Darmstadt)	DMF
MWG-Biotech (Ebersberg)	Oligonukleotide
Oxoid (Wesel)	Agar, Hefeextrakt, Trypton
<u>Qiagen, (Hilden)</u>	QIAprep [®] Spin Miniprep, Midiprep Kits
Promega (Heidelberg)	Wizard TM Plus DNA Minipreps Purification
	Kit, T4 Ligase, Pfu-Polymerase
Roth (Karlsruhe)	Ethidiumbromid, Phenol/Chloroform,
	Akrylamid
Serva (Heidelberg)	Coomassie-Brilliant-Blue R250
Sigma (Deisenhofen)	Antibiotika, Avidin, Biotin, DMSO, pNPP,
	Thimerosal, Succinat, Thiamin, Tween 20,
	Putrescin, Spermidin
Stratagene (Heidelberg)	Gigapack III Gold Packaging Extract

III. Experimente und Ergebnisse

Es ist bekannt, dass bisher nicht mehr als 1 % aller Mikroorganismen kultiviert werden können (Amann et al., 1995). Durch die bis jetzt für die Isolierung von unbekannten Mikroorganismen verwendeten Kultivierungsmethoden geht ein großer Teil des Potentials verloren. Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit war es, das in der Natur existierende große genetische Reservoir von bisher nicht-kultivierten Mikroorganismen für die biotechnologische Biotinproduktion zu nutzen.

In den letzten Jahren wurden verstärkt molekulargenetische Methoden entwickelt, um neue mikrobielle Habitate erschließen zu können. Eine große Anzahl an bisher unbekannten Mikroorganismen wurde mit Hilfe von 16S rRNA-Analysen und Southern- und Northern-Hybridisierungen identifiziert (Pace, 1997). Die Homologie zwischen Genen und Proteinen und das Vorhandensein von konservierten Bereichen in verschiedenen Enzymklassen ermöglichte darüber hinaus die Amplifizierung von unbekannten DNA-Bereichen mittels PCR (Seow et al., 1997; Rosado et al., 1998; Bruce et al., 1995). Jedoch ist dieses Verfahren auf Gene beschränkt, die zu bereits bekannten Gruppen gehören. So können in der Regel weder durch PCR noch mit Hilfe von Hybridisierungen neuartige Gene gefunden werden.

Daher wurden neue Methoden entwickelt, um das biotechnologische Potential von bisher nicht kultivierten Mikroorganismen zu nutzen (Henne et al., 1999; Rondon et al., 2000; Entcheva et al., 2001). Bereits etablierte Methoden (Henne et al., 1999) konnten in der vorliegenden Arbeit nur begrenzt verwendet werden, da für die Suche nach intakten Operons und Gencluster, Genbanken mit Insertgrößen von >20 kb notwendig waren. Die direkt aus den Umweltproben isolierte DNA enthält Huminsäuren und andere Verunreinigungen, die weitere Klonierungsschritte inhibieren können. Klassisch isolierte DNA konnte bisher somit nur für die Konstruktion von Plasmid-Genbanken mit Insertgrößen bis 10 kb verwendet werden, ist aber für die Konstruktion von Cosmid-Genbanken nicht geeignet. Daher wurde in dieser Arbeit ein anderer Ansatz gewählt, der auf einer gezielten Anreicherung basiert und DNA-Verunreinigungen von Huminsäuren minimiert. Für dieses Vorhaben musste zunächst ein Verfahren etabliert und optimiert werden (Abb. 6). Dabei wurde ausgenutzt, dass die Zugabe des Proteins Avidin, welches stark an Biotin bindet, die Biotinkonzentration im Medium verringert. Mit Hilfe dieser
Methode wird ein "Biotinproduzenten"-Konsortium von unbekannten Mikroorganismen angereichert.



Abb. 6: Isolierung von biotinüberproduzierenden Bakterien aus Umwelt-Cosmid-Banken.

Das *bio*-Operon (welches die Gene für die Biotin-Biosynthese umfasst) hat in den bekannten Mikroorganismen eine Größe von 6 kb. Für die Konstruktion von Cosmid-Genbanken wurde Gesamt-DNA aus Anreicherungskulturen verwendet. Als Wirtsorganismen wurden zwei Stämme von *Escherichia coli* [*E. coli* VCS257 und *E. coli* ATCC 33767 Δ (*bio-uvrB*)] und pWE15 als Vektor verwendet. Anschließend wurden die Genbanken auf das Vorhandensein von *bio*-Operons in Mineralmedium mit Avidin (0,065 U/ml) überprüft. Solche Cosmide, die die *E. coli* ATCC 33767 Deletionsmutante komplementierten (Abb. 9), wurden weiter charakterisiert.

III.1. Konstruktion von Umwelt-Genbanken aus mikrobiellen Konsortien

III.1.1. Anreicherungskulturen von verschiedenen Umwelt-Habitaten

Zur Konstruktion von Cosmidgenbanken aus Umwelt-DNA mit großen Inserts wurde eine gezielte Anreicherung mittels Avidin-Zugabe durchgeführt. Avidin bindet an Biotin und hält dessen Konzentration im Medium gering. So setzen sich Mikroorganismen durch, die über ein großes Potential für die Biotinproduktion verfügen (Abb. 6). Zur Konstruktion von Umwelt-Genbanken wurden Proben aus folgenden Habitaten ausgewählt: Vulkanischer Boden (VS; "Mount Hood", USA), Waldboden (FS) aus dem Harz (Braunlage), Ackerboden aus Göttingen (AS), Pferdedung (HE) und sandiger Boden (GS) aus Griechenland (Tab. 4). Jeweils 100 ml M9 Mineralmedium wurden mit 6,5 Units Avidin (1 Unit Avidin bindet 1 µg Biotin) supplementiert und mit 2 g Umweltprobe (Feuchtgewicht) angeimpft. Die Anreicherung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden Aliquots aus den Kulturen auf Mineralmedium-Platten ausplattiert (II.2.1.2). Anschließend wurde die Diversität sowohl an Hand von unterschiedlichen Kolonietypen auf Agarplatten, als auch unter dem Mikroskop bestimmt. In den Anreicherungskulturen traten drei bis sieben verschiedenartige Kolonietypen auf (Tab. 4). Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten, dass nur relativ wenige Mikroorganismen angereichert wurden (Abb. 7). Verschiedene Formen von Mikroorganismen wurden unter dem Lichtmikroskop beobachtet, z.B. Kokken, Stäbchen und Coryneformen.

Der Erfolg der Anreicherung wurde mittels Dotblots überprüft (Abb. 8). Dazu wurde die DNA, die aus der Anreicherungskultur isoliert worden war, auf Nylonmembranen gespottet (780 ng pro Dot) und die Hybridisierung wurde mit einer *bio*-Sonde aus *E. coli* K12 durchgeführt (Abb. 8A). Als Kontrolle wurde eine gleiche Menge DNA gespottet, die aus einer Probe vor der Anreicherung gewonnen worden war. Es zeigte sich, dass eine bis zu 6,3-fachen Anreicherung der *bio*-Sequenzen in der DNA, die aus der Anreicherungskultur, im Vergleich zu der direkt aus der Umwelt isolierten DNA, erfolgt war (Abb. 8C).



Abb. 7: Elektronmikroskopische Aufnahmen von Zellen aus diversen Anreicherungskulturen. AS: Ackerboden; VS: Vulkanischer Boden; FS: Waldboden; HE: Pferdedung; TS: Tropischer Boden; GS: Sandboden. Beizeichnung der Umweltproben nach (Entcheva et al., 2001).





Abb. 8: Dotblot Hybridisierung von DNA, isoliert aus Umweltproben und Anreicherungskulturen. (A) Nylonmembran mit DNA, direkt isoliert aus Pferdedung (HE) und DNA, isoliert aus der korespondierenden Anreicherungskultur mit Zugabe von Avidin. Es wurden 780 ng DNA pro Dot aufgetragen und mit einer *E. coli* DNA-Sonde hybridisiert (*bioA-orf1*); (B) Nylonmembran mit DNA, isoliert aus zwei Anreicherungskulturen und inokuliert mit jeweils 2 g Ackerboden (AS), wobei die eine in Anwesenheit von Avidin (6,5 *Units* pro 100 ml Medium) und die andere in Abwesenheit von Avidin angezogen wurde. Die DNA wurde nach 48-stündigem Wachstum isoliert und jeweils 930 ng DNA pro Dot aufgetragen. Als Sonde wurden *bio*-Gene verwendet, die sich auf dem pCosAS1 befanden. Die Hybridisierung wurde in beiden Experimenten unter stringenten Bedingungen bei 68 °C durchgeführt. (C) Densitometrische Auswertung von "Direkt" isolierte zu mit Avidin "Angereicherte" DNA [s. (A)]; (D) Densitometrische Auswertung zur Verdeutlichung des Unterschiedes einer Anreicherung mit bzw. ohne Avidin [s. (B)].

Die Auswirkung von Avidin in den Anreicherungskulturen wurde ebenfalls mittels Dotblot überprüft. Dazu wurde DNA aus zwei Anreicherungskulturen isoliert. Eine wurde in Anwesenheit und die andere in Abwesenheit von Avidin angezogen. Ackerboden wurde als Inokulum für dieses Experiment verwendet. Es wurde mit einer *bio*-Sonde hybridisiert, die das *bioF*-Gen umfasste, das aus dieser Umweltgenbank stammte (Abb. 8B). Wie aus Abbildung 8B ersichtlich wird, haben sich in der Kultur mit Avidin Mikroorganismen durchgesetzt, die in der Lage waren, hohe Mengen an Biotin zu produzieren und so die Anwesenheit von Avidin zu kompensieren. In der Anreicherungskultur ohne Avidin entstand ein anderes mikrobielles Konsortium, in dem Mikroorganismen mit hoch effektiven *bio*-Genen nicht so stark vertreten waren. Die Anreicherung der *bio*-Sequenzen betrug etwa 3,5fach (Abb. 8D).

Die Biotinproduktion in verschiedenen Anreicherungskulturen wurde mittels eines kompetitiven ELISA-Tests überprüft (s. II.12.1.). Kulturen, in denen Biotin im Überstand unterhalb der Nachweisgrenze lag. wurden aus weiteren molekularbiologischen Arbeiten ausgeschlossen (Tab. 4) und es wurde nur mit Kulturen weitergearbeitet, die mehr als 200 pg/ml/OD Biotin produzierten. In den meisten Anreicherungskulturen entsprach die Zahl an unterschiedlichen Kolonieund Zellentypen unter dem Mikroskop der Biotinkonzentration im Überstand. Je mehr Mikroorganismen-Typen angereichert wurden, desto mehr Biotin konnte im Überstand gemessen werden, so z.B. bei sieben Kolonietypen in der GS-Kultur wurden 1040 pg/ml/OD Biotin im Überstand bestimmt. In der VS-Kultur wurden fünf verschiedene Kolonietypen beobachtet aber weniger als 50 pg/ml/OD Biotin gemessen. Die Biotinkonzentration in allen Kulturüberständen war höher als die im Überstand von E. coli K12 (8 pg/ml; Tab. 6), der als Kontrolle verwendet wurde und eine Kopie des bio-Operons trägt.

Anreicherungs-	Habitat Kolonietypen		Biotin im Überstand ^c
Kulturen ^a			[pg/ml/OD]
HE	Pferdedung	3	200
AS	Ackerboden	4	875
FS	Waldboden	6	1000
VS	Vulkanischer Boden	5	<50
GS	Sandiger Boden	7	1040

Tab. 4: Bestimmung der Biotinkonzentrationen und Analyse der Diversität vonMikroorganismen in verschiedenen Anreicherungskulturen aus Umweltproben.

^a-die Namen der Anreicherungskulturen sind nach (Entcheva et al., 2001) bezeichnet. ^b-Zahl der verschiedenen Kolonietypen auf Mineralagarplatten; ^c-Biotin im Überstand in den Subkulturen ohne Avidin. Die Biotinkonzentration in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Zellen wurden in Mineralmedium angezogen und geerntet, sobald keine Veränderung in der OD zu messen war. Die Biotinmessungen repräsentieren Daten aus drei unabhängigen Wachstumsexperimenten. Alle Subkulturen, bis auf HE, wurden bei 30 °C angezogen.

Die Produktionsmengen und die Zahl von Kolonietypen in den verschiedenen Kulturen unterschieden sich voneinander, was für eine erfolgreiche Anreicherung und gegen eine Kontamination sprach. Die Biotinkonzentration bei der Anreicherung aus AS war bis zu fünf Mal höher als bei der HE-Kultur und über 20-fach höher im Vergleich zu der aus VS.

Die weitere Arbeit umfasste das Anlegen von drei Umweltgenbanken aus Pferdedung, Ackerboden und Waldboden. Die Produktionsraten in der Anreicherungskultur aus Vulkanboden zeigten (<50 pg/ml/OD), dass das *Screening* auf hocheffektive *bio*-Operons in dieser Probe geringe Erfolgsaussichten hatte.

Die Cosmid-Genbanken wurden, wie unter II.8.1. beschrieben, angelegt und enthielten jeweils mehrere tausend Klone. Zwischen 6.000 und 35.000 Klone wurden als Pools *gescreent* (Tab. 5). Es wurde Cosmid-DNA isoliert und in die *E. coli bio*-Mutante transduziert [*E. coli* $\Delta(uvrB-gal)$; Abb. 9]. Anschließend wurden die Pools von Klonen in frisches M9-Medium überimpft bis ein kontinuierliches, nichtlimitiertes Wachstum bestätigt wurde. Anhand von Restriktionsspaltungen wurde festgestellt, dass die *bio*-Cosmide untereinander verschieden waren. Jeweils zwei bis drei verschiedene *bio*-Cosmide wurden aus jeder Umwelt-Genbank identifiziert (Tab. 5).

Cosmid-Genbanken ^a	Klone getestet	Erhaltene <i>bio</i> - Cosmide ^b	Charakterisierte <i>bio</i> -Cosmide
HE	30.000	2	pCosHE1
			pCosHE2
AS	6.000	2	pCosAS1
			pCosAS2
FS	35.000	3	pCosFS1
			pCosFS2

Tab. 5: Konstruktion von DNA-Genbanken aus den Anreicherungskulturen und *Screening* auf *bio*⁺ Klone.

^a-Inokulum für die Anreicherungskulturen aus: HE-Pferdedung; AS-Ackerboden; FS- Waldboden (Entcheva et al., 2001); ^b-wurde auf der Basis des Restriktionsverdaus bestimmt.



Abb. 9: Schematische Darstellung der *E. coli bio*⁻-Mutante ATCC 33767 und Komplementationsschema. *E. coli* K12-Wildtyp Stamm, dessen chromosomal liegendes *bio*-Operon deletiert worden ist. Δ -Deletion; λ att- die *attachment*-Stelle des λ -Phages; "+" und "-" zeigen das Wachstum der Stämme im Mineralmedium ohne Biotinzusatz.

III.1.2. Isolierung, Reinigung und Klonierung von Gesamt-DNA aus mikrobiellen Anreicherungen

Die DNA, die für die Konstruktion von Cosmid-Genbanken eingesetzt werden sollte, sollte hochmolekular sein und einen möglichst geringen Anteil an Huminsäuren aufweisen. Daher wurde generell DNA aus den wie oben beschrieben entstandenen mikrobiologischen Konsortien, nach 48 Std. Schütteln bei 30 °C (für die HE-Kultur 24 Std. bei 37 °C), isoliert (II.4.2.). Die auf diese Weise isolierte DNA wurde dialysiert (II.4.1.3.) und auf einem 0,8 % Agarosegel überprüft (II.5.1). In der Regel wurden zwischen 2,5 mg und 3,5 mg DNA aus jeder Umweltprobe isoliert, die für die Konstruktion von Umwelt-Genbanken geeignet war. Um Genbanken herzustellen, wurde ein partieller Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Sau*3AI vorgenommen (Abb. 10). Es wurde angestrebt, Gesamt-DNA-Fragmente mit einer Größe von 30 bis 40 kb zu erzeugen.



Abb. 10: Partieller Verdau von der Gesamt-DNA aus Umweltproben mit der *Sau*3AI Restriktionsendonuklease: 1. 1-kb Ladder; 2. bis 6. Partieller Verdau 1:2.000 bis 1:32.000; 7. direkt isolierte DNA.

Als Vektor wurde das Cosmid pWE15 verwendet, das mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI verdaut wurde. Als Wirtsstamm wurde *E. coli* VCS257 verwendet.

Zur Kontrolle wurden 70 bis 100 der Klone einzeln mit Miniprep Methode überprüft. Die Größe der Inserts variierte zwischen 30 und 40 kb und 98 % aller Klone hatten klonierte Fragmente.

III.2. Screening von Umwelt Cosmid-Genbanken auf bio⁺Cosmide

Um aus den oben angefertigten Cosmid-Genbanken in *E. coli* VCS 257 *bio*⁺Cosmide zu isolieren, wurden zwischen 100 und 2.800 Klone *gepoolt*. Die aus den *gepoolten E. coli* VCS 257-Klonen isolierte Cosmid-DNA wurde in *E. coli* ATCC 33767 $\Delta(uvrB-gal)$ transduziert (Abb. 9). Ob die Cosmide *bio*-Operons enthielten wurde anhand deren Fähigkeit, *E. coli* ATCC 33767 zu komplementieren, festgestellt. Als eindeutig biotinproduzierend wurden solche Klone bewertet, die nach dem zweiten Überimpfen in M9-Mineralmedium unter Biotinmangel nicht-limitierendes Wachstum zeigten. Die Wachstumsfähigkeiten von positiven Klonen wurden in M9-Mineralmedium unter Zugabe von Avidin (0,065 *Units*/ml) überprüft und die Klone wurden auf CA-Agar Platten (s. II.2.1.2.) unter Selektionsdruck vereinzelt. Mit diesem *Screening* wurden sieben Klone mit einem *bio*-Operon isoliert (Tab. 5).

III.2.1. Biotinproduktion und Wachstumscharakteristika von Klonen mit *bio*-Cosmiden

Die Biotinproduktionsfähigkeit von sechs *E. coli* ATCC 33767 Klonen mit bio^+ Cosmiden, die aus Umwelt-Genbanken stammten, wurden untersucht (Abb. 11). Die Biotinproduktion wurde mit Hilfe des Wachstumstestes (Bioassay) mit *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 ermittelt (s. II. 12.2.). Dieser Test beruht auf der Biotinauxotrophie des Stammes *L. plantarum*. Als Kontrollstamm wurde *E. coli* K12 getestet. So konnten die Überproduktionvermittelnden Eigenschaften der *bio*-Cosmide nachgewiesen werden. Insgesamt wurden sechs Stämme mit *bio*-Cosmiden auf Succinat- und Glukose-supplementiertem Medium gemessen. Eine

Überproduktion von mindestens 9-fach (bei dem pCosHE1) bis zu ca. 80-fach (bei pCosHE2) wurde auf Succinat-supplementiertem Medium gemessen. Auf Glukosesupplementierten Medium wurde eine mindestens 5,25-fache (bei pCosHE2) bis 450fache (bei pCosFS1) Überproduktion festgestellt (Tab. 6).

In einigen Fällen (pCosHE1 und pCosHE2) war die Biotinkonzentration in den Überständen von Succinat-supplementiertem Mineralmedium deutlich höher (414 pg/ml und 3.800 pg/ml) als in Glukose-supplementiertem M9-Medium (100 pg/ml bzw. 42 pg/ml) (Tab. 6). E. coli K12 produziert ca. 5,8-fach mehr Biotin auf Succinat-supplementiertem Mineralmedium als auf Glukose-supplementiertem Mineralmedium. E. coli ATCC 33767/pCosHE2 produziert ca. 90,5-fach mehr Biotin auf Succinat-supplementiertem Mineralmedium im Vergleich zu der Produktionsmenge Glukose-supplementiertem auf Mineralmedium. Interessanterweise zeigten die Cosmidklone pCosAS1 und pCosFS1 höhere Produktivitäten auf Glukose-supplementiertem Mineralmedium gegenüber dem Succinat-supplementiertem Mineralmedium (3,3-fach bei pCosAS1 und 2,1-fach bei pCosFS1).





Tab. 6: Wachstumscharakteristika und Biotinproduktion von *E. coli* ATCC 33767komplementiert mit *bio*-Cosmiden aus verschiedenen Anreicherungskulturen. AlsKontrollstamm wurde *E. coli* K12 verwendet.

<i>bio-</i> Comidklone/	Verdopplungszeiten		Lag I	Phase	Biotin im Überstand	
Kontrollstamm	Succinat	Glukose	Succinat	Glukose	Succinat	Glukose
	[Std.]	[Std.]	[Std.]	[Std.]	[pg/ml]	[pg/ml]
pCosHE1	6,0	2,9	6,3	3,6	414	100
pCosHE2	4,1	3,0	6,3	4,3	3.800	42
pCosAS1	5,0	2,9	5,3	4,1	360	1.200
pCosFS1	5,1	2,9	9,5	5,0	1.740	3.600
<i>E. coli</i> K12	2,9	2,9	2,3	2,3	47	8

Die Biotinkonzentration in den Überständen wurde mit dem *L. plantarum*-Test bestimmt. Die OD-Messungen repräsentieren Daten aus drei unabhängigen Wachstumsexperimenten. Die Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase geerntet.

Nachdem die Biotinproduktion der verschiedenen *bio*⁺Cosmide untersucht worden war, wurden deren Wachstumscharakteristika auf verschiedene C-Quellen überprüft. Es wurden vier bio-Cosmide detailliert untersucht: pCosHE1, pCosHE2, pCosAS1, pCosFS1. Einzelkolonien wurden in 10 ml M9-Mineralmedium angeimpft und Vorkulturen wurden ÜN bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert. Hauptkulturen wurden mit der gleichen OD₆₀₀ gestartet und Wachstumskurven aufgenommen (Abb. 12A und 12B). Die Zellen wurden in der Regel in der stationären Wachstumsphase geerntet und die Biotinkonzentration in den Überständen ermittelt. Die Wachstumscharakteristika der verschiedenen *bio*-Cosmide wurden auf Mineralmedium, welches mit unterschiedlichen C-Quellen supplementiert wurde, untersucht. Mit Succinat als C-Quelle zeigten die Klone schlechteres Wachstum (Abb. 12A) im Vergleich zu Glukose-suplementiertem M9-Medium (Abb. 12B).



Abb. 12: Wachstumskurven von *E. coli* ATCC 33767 nach der Komplementation mit verschiedenen *bio*-Cosmiden und *E. coli* K12 (Wildtyp Stamm) in Mineralmedium ohne Zugabe von Biotin. (A) Wachstum in Mineralmedium mit Succinat als einzige C-Quelle; (B) Wachstum in Mineralmedium supplementiert mit Glukose als einzige C-Quelle. Die OD- Messungen repräsentieren Daten aus drei unabhängigen Wachstumsexperimenten. *E. coli* K12 (\bullet); *E. coli* pCosHE1 (\bullet); *E. coli* pCosHE2 (\blacksquare); *E. coli* pCosAS1 (\blacktriangledown); *E. coli* pCosFS1 (\bullet).

III.2.2. DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen

Um die Sequenzen der identifizierten bio-Gene festzustellen, wurden sog. shot-gun vorgenommen. Cosmid-DNA wurde mit häufigspaltenden Klonierungen Endonukleasen verdaut und in Vektoren wie z.B. pK18mobsac, pHSG396 und pHSG399 kloniert. Die Inserts der rekombinanten Plasmide wurden zunächst mit den beiden Standard-Sequenzierungsoligonukleotiden (Abi for: 5'-ACGACGTTGTAA AACGACGGCCAG-3' und Abi rev: 5'-TTCACACAGGAAACAGCTATGACC-3') ansequenziert, die sich auf den beiden Seiten der MCS (multiplen Klonierungsstelle) der pK18mobsac, pHSG396 und pHSG399 Plasmid-Vektoren anlagerten. In einigen Fällen wurde ein sog. primer walking vorgenommen. Aus den erhaltenen Sequenzen wurden anschließend neue Oligonukleotide (jeweils 20mere mit Tm zwischen 53 °C und 60 °C) abgeleitet, synthetisiert und wiederum in die Sequenzierung eingesetzt (s. II.11.). Auf diese Weise wurden die rekombinanten Plasmide, deren Inserts Teile des bio-Operons enthielten, vollständig sequenziert (Tab. 2).

Es wurden RFLP-Analysen (*restriction fragment length polymorphism*) durchgeführt, um die Position der *bio*-Gene auf den *bio*-Cosmiden und deren genetische Umgebung festzustellen (Abb. 13).

Mit Hilfe der Datenbankabgleiche (BLAST search, NCBI) konnten *bio*-Gene auf allen vier *bio*-Cosmiden identifiziert werden. Die ORFs auf den *bio*-Cosmiden zeigten Ähnlichkeiten zu Genen aus Gram-negativen Bakterien. Das *bio*-Operon auf dem pCosHE2 zeigte eine besonders hohe Homologie zu dem *E. coli* K12 *bio*-Operon (Tab. 7), während die *bio*-Gene auf den anderen drei *bio*-Cosmiden signifikante Homologien zu *E. coli* K12 und *Erwinia herbicola* (pCosHE1), *E. herbicola* (pCosAS1) und *Serratia marcescens* (pCosFS1) zeigten. Weiterhin wurden andere ORFs auf den Cosmiden identifiziert. Hierzu zählten diverse ABC-Transporter und andere Gene.



<u>_____78</u>

Abb. 13: (s. vorige Seite) Genorganisation der Zentralregionen unterschiedlicher bio-Cosmide aus drei verschiedenen Umweltgenbanken auf Grundlage von DNA-Sequenzanalysen (A-D); Die Pfeile zeigen die Lokalisation und die Transkriptionsrichtung der offenen Leserahmen (ORFs) auf den verschiedenen Cosmiden. (A) Restriktionskarte des pCosHE1 bio-Cosmides. Die bio-Gene zeigten Homologien zu den entsprechenden bio-Genen aus Erwinia herbicola und E. coli; (B) Restriktionskarte des pCosHE2 bio-Cosmides, wobei die bio-Gene eine hohe Homologie zu E. coli bio-Genen zeigten; (C) Restriktionskarte des pCosAS1 bio-Cosmides und (D) Restriktionskarte des pCosFS1 bio-Cosmides. Die bio-Gene auf pCosAS1 und pCosFS1 zeigten Homologien zu E. herbicola bzw. zu Serratia marcescens bio-Genen. Die identifizierten ORFs und die Homologien zu den bekannten Genen sind zusammen mit accession Nummern, unter denen sie in der Datenbank (GenBank) vorliegen, in Tab. 7 aufgelistet. Für bioF-D Gene aus dem pCosHE1 sowie bioA und bioB aus dem pCosFS1 wurden nur partiellle Sequenzen erhalten. In den Fällen von pCosHE1 und pCosHE2 wurde eine bioAorf1 Sonde von E. coli K12 verwendet und für die Southern-Hybridisierungen von pCosAS1 und pCosFS1 wurden bioF bzw. bioFC Sonden aus dementsprechenden bio-Cosmiden eingesetzt. Es wurden folgende Restriktionsenzyme verwendet: N, NcoI; B, BamHI; E, EcoRI; Sm, SmaI; P, PstI; K, KpnI; H, HindIII; Sc, SacI.

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode zur direkten Klonierung der DNA aus den Umweltkonsortien wurden andere Genloci gefunden wie z.B. *moaA-D* und *hut*-Gene. Die *hut*-Gene wurden stromaufwärts des *bio*-Operons auf dem pCosAS1 gefunden. Das pCosAS1 *bio*-Operon zeigte gewisse Homologien zum *E. herbicola bio*-Operon. Bis jetzt wurden keine *hut*-Gene bei *E. herbicola* beschrieben. ORFs, die Ähnlichkeiten zu Genen aus *Enterobacteriaceae* zeigten, wurden auf den gesamten Längen der *bio*-Cosmide identifiziert, sequenziert und in die NCBI Datenbank eingereiht (Tab. 7). Ein ORF, das zu dem Gen *uvrB* signifikante Homologien aufweist (Tab. 7), befindet sich stromabwärts der *bio*-Gene auf dem pCosHE1, pCosAS1 und pCosFS1 (Abb. 13A, C und D).

Cosmid- Klone	Identifiziertes Homologes Gen ¹ Proteinen ² (<i>accession</i> Nummern)		Organismen ³	Identität %	Länge der ähnlichen Aminosäure- Sequenzen	Score	
pCosAS1	hutH	Histidin Amonia Lyase	P. putida	75	490	723	
	(AF248314)		S. meliloti	50	480	420	
pCosAS1	<i>orf-1</i> (AF248314)	Hypothetische 17,1 kD Protein in <i>modC-bioA</i> Region;	E. coli	77	158	268	
		Hypothetische Protein Rv2140c	M.tuberculosis	42	154	116	
pCosAS1	bioA	DAPA-	E. coli	85	427	767	
	(AF248314)	Aminotransferase	E. herbicola	85	427	757	
			X. nematophilus	70	421	628	
pCosAS1	bioB	Biotinsynthase	E. herbicola	86	346	618	
	(AF248314)	2	E. coli	84	346	602	
	()		S. marcescens	80	343	566	
pCosAS1	hioF	7-KAPA-Synthetase	E. herbicola	67	384	509	
people	(AF248314)	, iti ii ii oynaloaso	E. coli	64	384	485	
	(/11 240514)		S. marcescens	55	378	386	
pCosAS1	hioC	BioC Protein involviert	F herbicola	56	251	271	
peosAsi	(ΛE_{248314})	in der Biotinsynthese	E. neroicoia E. coli	53	251	271	
	(AF246514)	in der Biotinsyndiese	S. marcescens	33 42	231	201	
- C A C 1		Dethicking others	E hauhiaala	43	247	201	
pCosASI	bloD	Dethiobiotinsynthetase	E. nerdicola E. coli	74	225	106	
	(AF248314)		E. COII S. marcascans	/6	251	2/1	
			5. marcescens	68	251	261	
pCosAS1	elsA	ABC-Transporter, ATP-	D. radiodurans	38	189	103	
	(AF248314)	Binde Protein, putativer ABC-Trasporter,	A. PCC/120	35	186	86	
		1.1.1	1. <i>marttima</i>	33	182	86	
		nodulation-ATP-binde Protein I	R leguminosarum	31	189	71	
pCosAS1	hutG (AF250775)	Histidin Aufnahme Repressor G	K. aerogenes	65	28	48	
pCosAS1	hutC	Histidin Aufnahme	K. aerogenes	76	70	109	
1	(AF250775)	Repressor C	Yersinia pestis	63	60	86	
	(·r	P. putida	65	60	83	
pCosAS1	hutU (AF250766)	Urocanase	P. putida	84	340	603	
nCosAS1	uvrB	UvrB	E. coli	89	297	543	
pecon 101	(AF248315)	enb	P. aeruginosa	69	297	430	
	(11210010)		X. campestris	65	296	406	
pCosHE1	moaA	Molybdän Cofactor	E. coli	89	186	352	
	(AF250774)	Biosynthesis Protein A	H. influenzae	61	185	245	
			<i>Synechococcus</i> sp.	41	185	164	
pCosHE1	<i>moaB</i> (AF250774)	Molybdän Cofactor Biosynthesis Protein B	E. coli	41	136	70	
pCosHE1	moaC	Molybdän Cofactor	E. coli	75	59	85	
-	(AF250774)	Biosynthesis Protein C	H. influenzae	67	53	64	
		, ·	S. carnosus	54	53	52	
pCosHE1	moaD	Molybdän Cofactor	E. coli	85	46	86	
r	(AF250774)	Biosynthesis Protein D		65	35	46	
	(H. influenzae	61	46	66	
			•	45	41	41	
					1.1	• •	

 Tab. 7: Identifizierte Gene und Nummern unter denen die Gene in NCBI Datenbank
 eingereicht worden sind sowie ermittelte Homologien.

Fortsetzung Tabelle 7:

pCosHE1	moaE	Molybdopterin	E. coli	82	150	270
peconili	(AF250774)	verstoffwechselte	H. influenzae	56	150	184
	(111 250771)	Factor Finhait 2	P. abyssi	41	130	101
mCoalUE1	here II	Histidin Amonio Lucco	D mutida	41 01	101	205
pCosnE1		HISUUIII AIIIOIIIa Lyase	r . pullaa S malilati	61	121	203
	(AF250/69)		D radiodurans	54	128	119
			D. ruulouuruns	48	115	104
pCosHE1	<i>orf-1</i> (AF250769)	Hypothetisches 17,1 kD Protein in <i>modC-bioA</i>	E. coli	81	158	278
	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	Region; Hypothetisches 19,5 kD	E. coli	46	165	152
		Protein in <i>emrE-rus</i> Region; Hypothetisches Protein	M. thermoautotrophi	32	148	80
	1. 4	MTH273	cum E. hanhiaala	95	2(0	452
pCosHET	bloA	DAPA-	E. nerbicola E. coli	85	260	453
	(AF250//0)	Aminotransferase	E. COll S. marcascans	83	260	453
	(AF250769)		S. marcescens Y namatophilus	70	254	355
			A. nemaiophilus	67	255	361
pCosHE1	bioB	Biotinsynthase	E. herbicola	84	127	228
-	(AF250770)	-	E. coli	82	127	220
			S. marcescens	72	142	200
			P. stutzeri	64	119	168
nCocHE1	unr ^R	Uvr B	F coli	Q1	222	511
peosner	$(\Lambda E250772)$	UVI B	H influenzae Rd	60	323	450
	(AF250772)		P aeroginosa	69	323	459
			1 . uci oginosu	62	322	393
pCosHE1	elsB	Hypothetisches 36,3 kD	E. coli	85	98	183
	(AF250773)	Protein in <i>modC-bioA</i> Region;		44	24	25
		(Hypothetisches 30,2 kD Protein in <i>modC</i> 3' Region) -YbhE	X. nematophilus	46	97	88
pCosHE1	elsC (AF250773)	Hypotehtische 46,1 kD Protein in <i>modC-bioA</i>	E. coli	83	162	283
		Putativer	E. coli	83	162	283
		in <i>bioA</i> 5' Region;	E changanth and			
		Precursor der Pectinesterase B	E. cnrysaninemi	46	152	123
pCosHE1	elsG (AF250771)	Hypothetisches 47,6 kD Protein in <i>moaE - rhlE</i> Region	E. coli	70	44	75
pCosHE1	elsH (AF2507771)	Hypothetisches 28,8 kD Protein in <i>moaE - rhlE</i> Region	E. coli	85	99	185
0 501	1. (DADA	q	0.6	202	(05
pCosFS1	bioA	DAPA-	S. marcescens	86	393	695
	(AF250768)	Aminotransferase	X. nematophilus	74	387	617
			E. herbicola	73	390	598
pCosFS1	bioB	Biotinsynthase	S. marcescens	95	342	665
•	(AF250768)	2	E. coli	87	341	605
			E. herbicola	85	341	605
nCosFS1	hioF	7-KAPA-Synthetase	S marcescens	66	381	477
peosi bi	(AE250768)	/-IC/II / I-Synthetase	E herbicola	56	382	412
	(AI 230/00)		E. coli	55	202	400
0 501	1. 0		C	33	381	409
pCosFS1	DIOC	BIOC-Protein involviert	S. marcescens	84	186	313
	(AF250768)	in der Biotinsynthese	E. COll E. horbicala	56	181	198
			L. nervicola	51	175	177
pCosFS1	uvrB	Uvr B	E. coli	86	38	71
	(AF303465)		P. aeruginosa	77	35	59
			<i>H. influenzae</i> Rd	70	37	58

Fortsetzung	Tabell	le 7 [.]	•
1 OI (SOLZung	ruoon	IU / .	•

pCosFS1	elsD (AF250767)	Hypothetisches 42,1 kD Protein in <i>moaE - rhlE</i>	E. coli	77	270	427
		Region YbhS;				
		Hypothetisches 42,1 kD	E. coli	27	231	125
		Protein in <i>moaE</i> - <i>rhlE</i> Region Vbh R		88	26	51
		Hypothetisches Protein	E. coli	21	225	110
		ECA9.	A. fulgidus	27	233	119
		F048;		27	184	80
		ATP-binde Protein				
pCosFS1	elsE	ABC-Transporter,	E. coli	72	114	168
	(AF250767)	ATP-binde Protein -		41	116	87
		YbhF;				
			M.	41	113	90
		ABC-Transporter,	thermoautotrophi			
		ATP-binde Protein	Cum A fulgidus			
			21. <i>Juigiuus</i>	39	105	82
pCosFS1	elsF	Hypothetisches Protein	E. coli	66	163	224
1	(AF250767)	F355				
pCosFS1	rhlE	ATP-abhängige RNA-	E. coli	80	78	123
-	(AF303464)	Helicase RhIE	Shewanella violacea	73	65	100
			Vibrio cholerae	70	65	98
pCosHE2	orfl (AF250776)	Hypothetisches 17,1 kD Protein in <i>modC-bioA</i> Region	E. coli	99	158	339
		Hypothetisches Protein Rv2140c	M. tubercolosis	47	150	138
pCosHE2	bioA	DAPA-	E. coli	96	429	860
peconic	(AF250776)	Aminotransferase	E. herbicola	83	427	735
	(X. nematophilus	70	421	62.5
nCosHE2	hiaB	Biotinsynthase	E. coli	99	346	697
peconic	(AF250776)	Diotinsynthuse	E. herbicola	91	346	655
	(11200770)		S. marcescens	86	344	611
pCosHE2	bioF	7-KAPA-Synthetase	E. coli	82	384	635
peconic	(AF250776)	, 11.11.1.5,	E. herbicola	62	384	471
	(111 2007 70)		S. marcescens	55	378	384
pCosHE2	bioC.	BioC-Protein involviert	E. coli	93	251	490
peconic	(AF250776)	in der Biotinsynthese	E. herbicola	64	251	317
	(211 2007 70)	in der Distilisyndiese	S. marcescens	48	248	235
pCosHE?	hiaD	Dethiobiotinsynthese	E. coli	91	212	401
pC03IIL2	(AF250776)	Demotionisynthese	E. herbicola	75	207	330
	(11 230770)		S. marcescens	72	198	297
				14	170	271

¹: die Identifizierten Gene auf den in dieser Arbeit isolierten Cosmiden und deren *accession* Nummern; ²: die Proteine mit den höchsten Homologien; ³: Organismen, in welchen die homologen Proteine identifiziert wurden.

Aufgrund der Biotinproduktivitäten, die für Stämme mit allen vier verschiedenen *bio*-Operons ermittelt und verglichen wurden (Tab. 6; Abb. 12), stellte sich das *bio*⁺Cosmid pCosHE2 als das beste in der Biotinproduktion heraus. Aus diesen Gründen wurden die pCosHE2-*bio*-Gene als Grundlagen für die Konstruktion rekombinanter Stämme gewählt. Weiterhin zeigte die Sequenzanalyse der pCosHE2*bio*-Gene, dass auf Protein-Ebene bis zu 92 % Identität zu *E. coli bio*-Proteinen vorliegt. Andererseits produzierte das pCosHE2-Konstrukt bis zu 3.800 ng/ml Biotin, was verglichen mit *E. coli* K12 (47 ng/ml) eine bis zu 80-fache Überproduktion darstellt (Abb. 12). Um die Ursache für diese dereprimierende Funktion des *bio*⁺Cosmides festzustellen, wurden die Proteinsequenzen näher untersucht.

III.2.3. Molekulare Analyse der identifizierten bio-Proteine auf dem pCosHE2

Da pCosHE2 am meisten Biotin produzierte, wurden für die *bio*-Proteine auf diesem Cosmid detaillierte molekulare Untersuchungen durchgeführt.



Abb. 14: (A) Schematische Darstellung von pCosHE2 *bio*-Genen; (B) Die "Aminosäureveränderungen" im Vergleich zu den *bio*-Proteinen im *E. coli* K12-*bio*-Operon; (C) Die Kristallstrukturen von bereits kristallisierten *bio*-Proteinen aus *E. coli* K12 aus der NCBI-Datenbank. Die schwarzen Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtungen, die blauen Pfeile weisen auf die "Aminosäureveränderungen" im Vergleich zu *E. coli* hin.

Protein	Position im Protein	AS ^a in <i>E. coli</i> K12	AS ^a in den pCosHE2	Unterschiede ^b in den Aminosäureresten
				K12 pCosHE2
BioA (1)	14	Leu	Trp	unverändert
(2)	104	Glu	Lys	<i>pK</i> 4,4 <i>pK</i> 10,0
BioB (3)	106	His	Asn	basisch nicht geladen
(4)	122	Ala	Asp	neutral $pK4,4$
(5)	123	Met	Leu	unverändert
BioF (6)	171	Met	Leu	unverändert
(7)	285	Ser	Arg	der Aminosäure Rest
(8)	296	Ala	Val	unverändert
(9)	297	Ala	Ser	hydrophob hydrophil
(10)	300	Thr	Ala	hydrophil hydrophob
(11)	301	Arg	His	<i>pK</i> 12,0 <i>pK</i> 6,5
(12)	347	Gly	Ala	unverändert
(13)	357	Ile	Thr	hydrophob hydrophil
BioC (14)	33	Ala	Val	unverändert
(15)	40	Gln	Glu	negativ nicht geladen
(16)	57	Ser	Thr	unverändert
(17)	132	Pro	Ser	Sekundärstruktur*
BioD (18)	1	Met	Val	unverändert
(19)	96	Leu	Ser	hydrophil hydrophob
(20)	100	Ala	Ser	hydrophil hydrophob
(21)	161	Val	Ala	unverändert
(22)	188	Met	Ile	unverändert

Tab. 8: Die bio-Proteine von pCosHE2, verglichen mit den bio-Proteinen aus E. coli K12.

^a-AS- Aminosäuren; ^b- die Unterschiede beziehen sich auf den AS Reste, wobei als "unverändert" entweder eine Veränderung im AS-Rest hydrophob—hydrophob oder hydrophil—hydrophil bezeichnet wurde. Die in Klammern stehenden Nummern zeigen die Position der Aminosäurenunterschiede die in Abb. 14 gezeigt wurden; *-mit dieser Veränderung wird die Sekundärstruktur beeinflusst.

Die Proteinsequenzen der bio-Proteine auf den pCosHE2-Cosmiden wurden mit bereits bekannten Sequenzen der *bio*-Proteine von *E. coli* K12, die in der Datenbank vorliegen, verglichen. Insgesamt 22 Aminosäuren sind in pCosHE2 verändert (Tab. 8). Davon liegen keine im Promotor-Operator Bereich. In Tabelle 8 sind die Aminosäureaustausche und die dadurch möglicherweise verursachten physikalischchemischen Veränderungen, aufgelistet. Die Proteine BioA, BioF und BioD von E. coli K12 wurden bereits kristallisiert (Alexeev et al., 1994a; Alexeev et al., 1994b; Alexeev et al., 1995; Alexeev et al., 1998; Kack et al., 1999) und ihreKristallstrukturen liegen in der NCBI-Datenbank vor. In Abbildung 15 A, B und C sind die veränderten Aminosäuren aufgezeichnet. Auffällig ist, dass der Leu→Trp Austausch (Abb. 15A) an Position 14 im BioA-Protein nahe dem Tyr₁₇ liegt, welches für die Bindung des Pyridoxalphosphates (BioA-Kofaktor) verantwortlich ist. In BioF befinden sich die meisten veränderten Aminosäuren, die am Ende der mittleren Domäne vorliegen (Abb. 15B). In dem BioD-Protein befinden sich die veränderten Aminosäuren auf der
ß-Helix und keine von diesen veränderten Aminosäuren liegt im aktiven Zentrum des Proteins (Abb. 15C). Auffällig ist, dass das BioD von E. coli mit Methionin anfängt, wo hingegen das BioD auf dem pCosHE2-Cosmid mit Valin startet. Außerdem besteht das überexprimierte BioD aus 214 AS, im Gegensatz zu BioD von E. coli, welches eine Länge von 224 AS aufweist.

Abb. 15: (s. folgende Seite) Kristallstrukturen der *bio*-Proteine aus *E. coli* K12 und die veränderten Aminosäuren der *bio*-Proteine aus pCosHE2. (A) BioA; (B) BioF und (C) BioD. Die bei den *bio*-Proteinen aus pCosHE2 veränderten Aminosäuren sind gelb markiert. In der Abbildung sind die Substrate, Cofaktoren der Proteine und die mitkristallisierten anorganischen Ionen aufgezeichnet.

Α.

Β.

C.



Val →Ala

Nach der Sequenzanalyse der *bio*-Gene auf pCosHE2 und den physiologischen und genetischen Untersuchungen mit *E. coli* ATCC 33767/pCosHE2 wurde die Produktivität dieses Stammes, die 3,8 µg/l beträgt, mit einigen bereits bekannten überproduzierenden Stämmen, die bei 0,39 mg/l bis 160 mg/l liegen, verglichen. Es stellte sich heraus, dass die weitere Optimierung des Produktionsstammes notwendig war. Die *bio*-Gene auf pCosHE2 wurden als Grundlage für die Konstruktion von biotinüberproduzierenden Stämmen eingesetzt.

III.3. Konstruktion von rekombinanten biotinüberproduzierenden Mikroorganismen

Viele Bodenbakterien sind nicht in der Lage, Biotin selbständig zu produzieren oder die Produktionsraten sind zu gering, um diese Bakterien als Produktionsstämme industriell zu nutzen (Shaw et al., 1999; Streit and Phillips, 1996). Eine Strategie, die bis jetzt verfolgt wurde, war das *Screening* nach resistenten Bakterien gegen Biotinanaloga (z.B. Acidomycin, 5-(2-Thienyl)-Valerische Säure und α -methyl Dethiobiotin; Kiyasu et al., 2001; Hoshino et al., 1997) und auf diese Weise mutierte *bio*-Gene wurden subkloniert und für die Konstruktion überproduzierender Stämme verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein anderer Weg eingeschlagen: *bio*-Gene, die aus einer Umwelt-Genbank isoliert wurden, (Entcheva et al., 2001), dienten als Vorlage für die Konstruktion von biotinüberproduzierenden Stämmen. Der Stamm *E. coli* ATCC 33767, welcher mit dem *bio*-Cosmid pCosHE2 komplementiert war, zeigte die höchste Biotinproduktion unter den getesteten Bedingungen (Tab. 6; Abb. 11). Daher wurde dieses Cosmid für die Konstruktion rekombinanter, biotinüberproduzierender Stämme ausgewählt.

Um biotinüberproduzierende Bakterien zu konstruieren, wurden drei Strategien verfolgt (Abb. 16A, B und C).

Das *bio*-Operon aus pCosHE2 wurde durch PCR amplifiziert und in verschiedene Vektoren subkloniert.



Abb. 16: Klonierungsstrategie zur Konstruktion biotinüberproduzierender Bakterien: (A) Verwendung des unveränderten *bio*-Operons dem pCosHE2, aus wobei die Wildtyporientierung der bio-Gene und der Promotor erhalten blieben; (B) Umbau und Reorientierung der bio-Gene aus dem pCosHE2 in eine Transkriptionsrichtung und Klonieren von allgemein starken Promotoren sowie wirtsspezifischen Promotoren; (C) Klonieren der bioB und bioD Gene aus dem pCosHE2 unter der Kontrolle von starken artifiziellen und wirtsspezifischen Promotoren. Ptrp-Tryptophan Promotor; Ptac-Kombination von trp und lac Promotor; PnodD1 und PnodD3- S. meliloti 1021 spezifische Promotoren.

Die erste Strategie basiert auf der Amplifikation des Wildtyp *bio*-Operons mit den Primern orfKpn und 1_6bioDXba (Abb. 16A). Das Fragment von 5,6 kb wurde *blunt end* in pBluescriptSK+ Plasmid-Vektor kloniert und in *E. coli* ATCC 33767 überexprimiert. Das bidirektionale *bio*-Operon als 5,6 kb *Hin*dIII/*Xba*I-Fragment wurde in pBBR1MCS-2 (Kovach et al., 1995) umkloniert (Abb. 17). Der Vektor pBBR1MCS-2 ist ein mobilisierbares *low copy* Plasmid und kann mittels Konjugation (s. II.8.3.) in diverse Gram-negative Bakterien übertragen werden. Weiterhin wurde das Plasmid pK18mobsac (Schafer et al., 1994) für die Überexpression der *bio*-Gene verwendet. Ein entsprechendes DNA-Fragment wurde nach dem *Hin*dIII/*Xba*I Verdau in den pK18mobsac-Vektor ligiert und anschließend in *E. coli* ATCC 33767 und *Corynebacterium glutamicum* R163 mobilisiert (Abb. 17 und 18).





Abb. 17: Schematische Darstellung der Konstruktion von *bio*-Plasmiden, die das unveränderte biotinbiosynthese Operon aus pCosHE2 trugen. Das pPESKbio-Konstrukt ist Derivat von pBSSK+, das pPEBBRbio ist ein Derivat von pBBR1MCS-2 und das pPEPKbio ist ein Derivat von pK18mobsac.

Das unveränderte *bio*-Operon (Abb. 16A) in pBSSK+ (pPESKbio, Abb. 18, Mitte) und pK18mobsac (pPEPKbio, Abb. 18, rechts), verursacht Instabilität und Wachstumsprobleme in den biotinprototrophen Klonierstämmen *E. coli* XL1-blue und *E. coli* S17-1, sind aber in der Lage, die Deletionsmutante *E. coli* ATCC 33767 (Abb. 9) zu komplementieren.



Abb. 18: Konstruktion von *bio*-Konstrukten mit dem unveränderten *bio*-Operon aus pCosHE2 und Expression in unterschiedlichen Bakterien. *E. coli* ATCC 33767-*E. coli* $\Delta(uvrB\text{-}gal)$; *E. coli* BM 4062- *E. coli birA*⁻ Mutante; als andere Gram-negative Bakterien wurden S. meliloti, R. etli, Rhizobium sp. NGR 234, *K. planticola, X. campestris* verwendet.

III.3.1. Expression von bio-Konstrukten in E. coli-Stämmen

In den folgenden Versuchen wurden *E. coli* Stämme mit den obengenannten *bio*-Konstrukten auf Biotinproduktivität untersucht.

III.3.1.1. Bestimmung von Biotin in Kulturüberständen

Die Biotinproduktionsmenge des Stammes mit pCosHE2 variierte in Abhängigkeit von der C-Quelle (Tab. 6). Eine erhöhte Biotinproduktion wurde auf Succinat gemessen, während die Produktion auf Glukose mehr als 90-fach niedriger war. Es bot sich an, die gleichen Versuche mit den umklonierten Konstrukten durchzuführen. Die Biotinproduktion wurde mittels *L. plantarum* Test und ELISA-*Assay* bestimmt. Überstände der verschiedenen Kulturen wurden verdünnt (bis 1/2000) und wie unter II. 12. beschrieben gemessen.

Tabelle 9 zeigt, dass *E. coli* ATCC 33767/pPESKbio eine Überproduktion von ca. 6.700-fach auf Glukose und ca. 64-fach auf Succinat, verglichen mit dem Ausgangskonstrukt pCosHE2, aufweist. Der Stamm mit dem pPEBBRbio-Konstrukt, produzierte ca. 4.700-fach mehr Biotin auf Glukose-Mineralmedium und ca. 17-fach mehr Biotin auf Succinat im Vergleich zu dem pCosHE2. *E. coli* ATCC 33767, komplementiert mit pPEPKbio, produzierte 37 ng/ml Biotin auf Glukose-supplementiertem Medium, welches einer ca. 880-fachen Überproduktion im Vergleich zu dem Stamm mit dem Ausgangskonstrukt pCosHE2-Konstrukt entsprach.

Der Unterschied in der Produktivität zwischen den Stämmen mit pPESKbio und pPEBBRbio auf Glukose betrug 40 % und blieb im gleichen Messbereich, während auf Succinat-supplementiertem Medium ein ca. 3,9-facher Unterschied in der Produktionsrate zwischen den beiden Konstrukten zu messen war. Der Stamm mit dem pPEPKbio-Konstrukt zeigte eine 7,6-fach bzw. 5,4-fach niedrigere Biotinkonzentration auf Glukose im Vergleich zu den pPESKbio- und pPEBBRbio-Konstrukten. *E. coli* ATCC 33767 mit pPEPKbio produzierte 65 ng/ml Biotin auf Succinat-supplementiertem Medium. Diese Konzentration war ca. 4,3-fach niedriger als mit pPESKbio und lag damit im gleichen Bereich, wie es mit pPEBBRbio der Fall war.

Tab. 9: Biotinproduktion von *E. coli* ATCC 33767, komplementiert mit verschiedenen *bio*-Konstrukten, angezogen auf M9-Mineralmedium supplementiert mit unterschiedlichen C-Quellen.

Konstrukt	Biotin auf Glukose [pg/ml]	Biotin auf Succinat [pg/ml]
pCosHE2	42	3.800
pPESKbio	280.000	240.000
pPEBBRbio	200.000	62.000
pPEPKbio	37.000	65.000

Die Biotinkonzentration wurde mit den *L. plantarum* und ELISA-Tests gemessen. Die Biotinmessungen repräsentieren Daten aus drei unabhängigen Experimenten. pPESKbio: pBSSK+/unverändertes *bio*-Operon aus pCosHE2; pPEBBRbio: pBBR1MCS-2/unverändertes *bio*-Operon aus pCosHE2; pPEPKbio: pK18mobsac/unverändertes *bio*-Operon.

Der Stamm mit dem *bio*-Cosmid pCosHE2 zeigte eine mehr als 90-fach erhöhte Biotinproduktion auf Succinat-supplementiertem Mineralmedium im Vergleich zu Glukose-Medium, während die *bio*-Konstrukte (mit Ausnahme des pPEPKbio-Konstruktes) in verschiedenen Vektoren entweder die gleiche oder niedrigere Biotinkonzentrationen auf Succinat- wie auf Glucose-Medium aufwiesen. Interessanterweise produzierte das pPEPKbio-Konstrukt auf Succinatsupplementiertem Medium 1,7-fach mehr Biotin als auf Glukose.

E. coli ATCC 33767/pPESKbio produzierte 280 ng/ml Biotin auf Glukose und 240 ng/ml auf Succinat. Somit war dieser Stamm hinsichtlich der Biotinproduktion derjenige mit der höchsten Ausbeute von allen (Tab. 9).

III.3.1.2. Wachstumsparameter der *E. coli*-Stämme mit *bio*-Konstrukten in Mineralmedien

Die unveränderten *bio*-Gene, die aus dem pCosHE2-Cosmid amplifiziert und wie bereits beschrieben umkloniert worden waren, wurden in *E. coli* ATCC 33767 (Abb. 9) expremiert. Weiterhin wurden Wachstumsexperimente auf M9-Mineralmedium mit verschiedenen C-Quellen durchgeführt (Tab. 10). Aus den Wachstumskurven war zu sehen, dass der *E. coli* ATCC 33767 Stamm, abhängig von der Vektorzahl pro Zelle unterschiedlich wuchs. In Tabelle 10 sind die Wachstumscharakteristika der verschiedenen Konstrukte zusammengefasst.

Im Allgemeinen zeigte es sich, dass das Wachstum stark von der C-Quelle abhängig war (Tab. 9, Abb. 19 und Abb. 12). Dabei waren die OD-Werte in der Regel für die Glukose-Kulturen höher als für die Succinat-Kulturen. In Abbildung 12A und 12B ist zu sehen, dass der Wildtyp *E. coli* K12 ebenfalls höhere OD-Werte auf Glukose erreichte als auf Succinat. Die End-OD Werte zwischen den Stämmen mit verschiedenen *bio*-Konstrukten waren auf dem gleichen Medium bis zu 1,8-fach unterschiedlich.

Tab. 10: Wachstumscharakteristika von *E. coli* ATCC 33767, komplementiert mit den verschiedenen *bio*-Konstrukten.

Konstrukt	OD ₆₀₀ ^a		Verdopplur	ngszeit [Std.]	Lag Phase [Std.]	
	Glukose	Succinat	Glukose	Succinat	Glukose	Succinat
pPESKbio	2,765	1,915	1,8	3,2	1,6	2,4
pPEBBRbio	1,835	1,555	2,1	2,6	1,6	2,6
pPEPKbio	1,803	1,040	2,4	5,0	10,4	13,5

^a OD₆₀₀ in der Stationärwachstumsphase. Die Zellen wurden in Mineralmedium mit den entsprechenden C-Quellen (0,2 %-ig Glukose und 0,5 %-ig Succinat) angezogen. Die OD-Messungen repräsentieren Daten aus drei unabhängigen Experimenten. pPESKbio: pBSSK+/unverändertes *bio*-Operon aus pCosHE2; pPEBBRbio: pBBR1MCS-2/unverändertes *bio*-Operon aus pCosHE2; pPEPKbio: pK18mobsac/unverändertes *bio*-Operon.

In der Regel war auf Succinat-supplementiertem Mineralmedium im Vergleich zu dem Glukose-Mineralmedium eine verlängerte Lag-Phase zu beobachten. Dies trat auch für die Lag-Phasen, die für die *bio*⁺Cosmide berechnet wurden (Tab. 6), zu. Die Lag-Phasen sind auf Succinat um 2,6 und 2,4-fach verkürzt (bei pPESKbio und pPEBBRbio) und bei dem pK18mobsac-Konstrukt (Abb. 17) im Vergleich zum Ausgangs-Konstrukt pCosHE2 um etwa 2,2-fach verlängert. *E. coli* ATCC 33767, komplementiert mit pPESKbio und pPEBBRbio, zeigte gegenüber dem pCosHE2 (4,3 Std.) eine um ca. 2,7-fach verkürzte Lag-Phase auf Glukose (1,6 Std.). Eine verlängerte Lag-Phase beim *E. coli* ATCC 33767/pPEPKbio war auch auf Glukose

zu messen, wobei diese 6,5-fach länger war als die bei den pPESKbio- und pPEBBRbio-Stämme und etwa 2,4-fach länger (Tab. 10) als die Lag-Phase bei pCosHE2 (Tab. 6).



Abb. 19: Wachstumskurven von *E. coli* ATCC 33767-Klone nach der Komplementation mit den verschiedenen *bio*-Konsrukten: pPESKbio (\blacksquare), pPEBBRbio (\blacktriangledown) und pPEPKbio (\bullet) in Mineralmedium ohne Zugabe von Biotin. Die schwarzen Symbole zeigen die Wachstumskurven auf 0,2 % Glukose, die weißen Symbole auf 0,5 % Succinat. Die OD-Messungen repräsentieren Daten aus drei unabhängigen Wachstumsexperimenten.

Nach der Analyse der Daten in Tabellen 9 und 10 wurde *E. coli* ATCC 33767 mit dem pPESKbio-Konstrukt für weitere Wachstums- und Produktionsversuche ausgewählt. In 1L-,,Schikanen-Kolben" wurden 100 ml Mineralmedium mit 0,2 % oder 0,6 % Casaminosäuren (CS) supplementiert. Als C-Quellen wurden Glukose, Succinat oder ein Glukose/Succinat-Gemisch in 0,2 % bzw. 0,5 % (w/v) Endkonzentration angesetzt. Proben wurden nach 12 Std. und 24 Std. entnommen, anschließend wurde die OD bei 600 nm und die Biotinkonzentration bestimmt (Tab. 11). Die bessere Belüftung, die Konzentration der Casaminosäuren und die Kombination der C-Quellen stimulierten das Wachstum sowie die Biotinproduktion.

% CS*			C-	Quelle			
	0,2 % (Glukose	0,5 % S	luccinat	0,2 %Glukose	, 0,5 % Succinat	
	[ng/m	1]	[ng/ml]		[ng/ml]		
	12h	24h	12h	24h	12h	24h	
0,2	386,67	225	110	500	201	2.300	
0,6	562,22	810	413	2.120	571	2.225	

Tab. 11: Biotinproduktion von *E. coli* ATCC 33767/pPESKbio auf M9-Mineralmedium mit verschiedenen Konzentrationen von Casaminosäuren und supplementiert mit unterschiedlichen C-Quellen. Die Zellen wurden unter starkem Belüften angezogen.

*- % Casaminosäuren, die dem Medium zugesetzt wurden. Die Biotinkonzentration wurde mit den *L. plantarum* und ELISA-Tests bestimmt. Die Kulturüberstände wurden bis 1/50 für den *L. plantarum*-Test und bis zu 1/2000 für den ELISA-Test verdünnt. Die Biotinmessungen repräsentieren Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

Aus Abbildung 18 wird deutlich, dass *E. coli* ATCC 33767/pPESKbio auf Glukose-Mineralmedium nach 12 h in die stationäre Wachstumsphase eintrat und 280 ng/ml Biotin produzierte (s. Tab. 9). Nach 12 Std. Wachstum in "Schikanen-Kolben" unter sonst gleichen Bedingungen (s.o.) wurden mehr als 380 ng/ml Biotin gemessen (ca. 30 % erhöht). Weitere Inkubation auf Glucose-Medium mit 0,2 % CS hatte keinen Einfluss auf die Biotinproduktion (Tab. 11). Unter allen anderen Bedingungen (s. Tab. 11) wurde die Biotinbiosynthese nach 24 Std. gesteigert im Vergleich zu 12 Std. Nach 24 Std. Wachstum wurden je nach C-Quelle und CS-Konzentration zwischen 500 und 2300 ng/ml Biotin produziert.

Um eine noch höhere Biotinproduktion zu erreichen, wurden die Konstrukte auf LB-Medium angezogen und die Überproduktion auf diesem Komplexmedium nach 24 Std. untersucht. Wenn die Biotinkonzentration im unbewachsenen LB-Medium (0,5 μ g/ml) und die Biotinkonzentration in dem Kulturüberstand der zwei Negativkontrollen (*E. coli* ATCC 33767 mit pBluskriptSK+ und pBBR1MCS-2, zwischen 0,24 μ g/ml und 0,18 μ g/ml) berücksichtigt wurde, sind folgenden Biotinmengen im Überstand gemessen worden: 0,57 μ g/ml für pPESKbio; 0,456 μ g/ml für pPEBBRbio und 1 μ g/ml für pPEPKbio. Somit wiesen die rekombinanten *bio*-Stämme eine bis zu 7,35-fach erhöhte Biotinproduktion auf. Im Vergleich zu der Produktion mit *E. coli* ATCC 33767/pPESKbio auf Mineralmedium supplementiert mit Glukose und Succinat (2,3 μ g/ml) und LB-Komplexmedium (0,57 μ g/ml) konnte angenommen werden, dass eine Optimierung der Produktion auf Minimalmedium effektiver sein würde.

Für die Optimierung der Biotinproduktion wurden andere, bereits beschriebene *E. coli* Mutanten als Wirtsstämme gesucht. Es ist bekannt, dass *E. coli birA*-Mutanten einen Transportphänotyp zeigen (Mutanten in *birA*-Gen exkretieren 20 bis 100 nM Biotin ins Medium während *E. coli* K12 weniger als 0,05 nM Biotin exkretiert). Eine von Barker und Campbell (Barker and Campbell, 1980) isolierte und charakterisierte *birA*-Mutante benötigt mindestens 4,1 μ M Biotin. Diese *E. coli*-Mutante wurde für weitere Experimente in dieser Arbeit als potentieller Produktionsstamm getestet.

Die bereits beschriebenen bio-Konstrukte: pPESKbio und pPEBBRbio (Abb. 17) wurden in *E. coli* BM 4062 transformiert und die Biotinproduktion bzw. Wachstumscharakteristika wurden in unterschiedlich supplementiertem Mineralmedium ermittelt. Als Negativkontrolle wurde E. coli BM 4062 mit pBBR1MCS-2-Vektor verwendet. In Mineralmedium supplementiert mit Glukose als einzige C-Quelle, 0,6 g/l Casaminosäuren (CS) und Inkubation bei 29 °C produzierte E. coli BM 4062/pPESKbio 412 ng/ml Biotin (Tab. 12A). Diese Konzentration ist ca. 2,8-fach höher im Vergleich zu der Konzentration von Biotin im Kulturüberstand von dem gleichen rekombinanten Stamm in Glukose-Mineralmedium mit Zugabe von 0,2 g/l CS. Bei E. coli BM 4062/pPEBBRbio wurde die Produktion, nach dem Erhöhen der Casaminosäuren-Konzantration von 0,2 auf 0,6 g/l ca. um das 4-fache gesteigert. Die Zugabe von 1,2 g/l CS in das Glukose-supplementierte M9-Medium spielte für die Biotinproduktion bei keinem der rekombinanten Stämme (E. coli BM 4062/pPESKbio und E. coli BM 4062/pPEBBRbio) eine entscheidende Rolle (Tab. 12A). Dagegen wurde die Produktion bei E. coli BM 4062/pPESKbio nach Zugabe von 1,2 g/l CS ins Succinat-supplementiertes Medium von 233 ng/ml auf 415 ng/ml Biotin erhöht (Tab. 12A, Zeile 2).

Tab. 12: (A) Biotinproduktion in *E. coli* BM 4062 [*birA*⁻; (Barker and Campbell, 1980)] mit verschiedenen *bio*-Konstrukten auf unterschiedlich supplementiertem Mineralmedium, inkubiert bei 29 °C; (B) Biotinproduktion in *E. coli* BM 4062 mit dem *bio*-Konstrukt pPEBBRbio und die Vektor-Kontrolle (pBBR1MCS-2) auf Mineralmedium, supplementiert mit 1,2 % CS inkubiert bei 37 °C; (C) Wachstumscharakteristika des *E. coli* BM 4062-Stammes mit verschiedenen *bio*-Konstrukten bei 29 °C; (D) Wachstumscharakteristika des *E. coli* BM 4062-Stammes mit dem *bio*-Konstrukt pPEBBRbio und die Vektor-Kontrolle (pBBR1MCS-2) bei 37 °C; (D) Wachstumscharakteristika des *E. coli* BM 4062-Stammes mit dem *bio*-Konstrukt pPEBBRbio und die Vektor-Kontrolle (pBBR1MCS-2) bei 37 °C.

Konstrukt	Biotin auf Glukose [ng/ml]		Bio	tin auf Su [ng/ml]	ccinat	
-	Casaminosäuren			C	asaminosä	uren
	0,2 %	0,6 %	1,2 %	0,2 %	0,6 %	1,2 %
pPESKbio	147	412	288	100	233	415
pPEBBRbio	47	187	149	23	120	29

Tab. 12A: Biotinproduktion bei 29 °C

Tab. 12B: Biotinproduktion bei 37 °C

Konstrukt	Biotin [ng/ml]			
	auf Glukose	auf Succinat		
	1,2 %*	1,2 %*		
pPEBBRbio	3.500	1.600		
pBBR1MCS-2	<0,05	<0,05		

*1,2 % CS; nd- nicht bestimmt. Die Biotinkonzentration wurde mit den *L. plantarum*-Wachstumstest und ELISA-Test bestimmt. Die Kulturüberstände wurden bis zu 1/50 für den *L. plantarum*-Test und bis zu 1/2000 für den ELISA-Test verdünnt. Die Biotin-Messungen repräsentieren Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Wachstumsexperimenten.

Konstrukt	Verdopplungszeiten [Std.]					
	auf Glukose ^a		auf Succinat ^b			
	0,2 %	0,6 %	1,2 %	0,2 %	0,6 %	1,2 %
pPESKbio	3,3	1,2	1,3	4,0	2,3	3,5
pPEBBRbio	3,9	2,0	1,4	7,0	2,8	1,9

Tab. 12C: Wachstumscharakteristika bei 29 °C

Tab. 12D: Wachstumscharakteristika bei 37 °C

Konstrukt	Verdopplungszeiten [Std.]			
	auf Glukose ^a	auf Succinat ^b		
	1,2*	1,2*		
pPEBBRbio	1,2	1,2		
pBBR1MCS-2	6,0	13,0		

^a- M9-Mineralmedium, supplementiert mit Glukose als C-Quelle; ^b- M9-Mineralmedium, supplementiert mit Succinat als C-Quelle; *- 1,2 g/l Casaminosäuren. Die Zellen wurden in der Stationärwachstumsphase geerntet. Die OD-Messungen repräsentieren Daten aus drei unabhängigen Wachstumsexperimenten. pPESKbio: pBSSK+/unverändertes *bio*-Operon aus pCosHE2; pPEBBRbio: pBBR1MCS-2/unverändertes *bio*-Operon aus pCosHE2.

Die Wachstumscharakteristika des *E. coli* BM 4062-Wirtsstammes mit *bio*-Konstrukten sind in Tabelle 12C vorgestellt. Generell wuchsen die rekombinanten *E. coli* BM4062-Stämme auf Glukose-Medium zu höheren Zelldichten (nicht gezeigt). Die Verdopplungszeiten waren am kürzesten in M9-Mineralmedium mit Glukose und 0,6 g/l Casaminosäuren bei 29 °C. Hier wurde die bereits beobachtete Tendenz, dass in Succinat-supplementiertem Mineralmedium langsameres Wachstum als in Glukose-supplementiertem Mineralmedium auftrat (s. Tab. 6, Tab. 10 und Tab. 12C), bestätigt.

Im Allgemeinen wuchs der *E. coli* BM 4062/pPEBBRbio-Stamm auf beiden C-Quellen bei 29 °C langsamer als der *E. coli* BM 4062/pPESKbio-Stamm. Wie aus Tabelle 12C in der letzten Spalte ersichtlich ist, zeigte der Stamm mit dem pPEBBRbio-Konstrukt 1,8-fach besseres Wachstum auf Succinat-1,2 %-igen CS Mineralmedium, verglichen mit dem pPESKbio-Konstrukt (Verdopplungszeiten von 1,9 bzw. 3,5 Std.).

Bei 37 °C wuchs *E. coli* BM 4062/pPEBBRbio sowohl auf Glukose- als auch auf Succinat-Medium (Tab. 12D) mit einer Verdopplungszeit von 1,2 Std. Die Biotinproduktionsmengen lagen im Bereich von 1,6 bis 3,5 µg/ml. Diese Daten, verglichen mit denen des Stammes *E. coli* BM 4062/pPEBBRbio, auf dem identisch supplementiertem Mineralmedium, bei 29 °C (Tab. 12A, Zeile 2), weisen auf die Temperaturabhängigkeit der Biotinproduktion hin.

Nachdem unterschiedliche *bio*-Plasmide, die das unveränderte *bio*-Operon vom Cosmid pCosHE2 als Grundlage hatten, konstruiert und diverse *E. coli*-Stämme als potentielle Wirte für eine biotechnologische Biotinproduktion getestet worden waren, wurde eine Maximalausbeute von 3,5 mg/l erreicht (Tab. 12B).

III.3.1.3. Fermentation von ausgewählten *bio*-Konstrukten

Alle Versuche, Biotin aus *batch*-Kulturen (in 100-ml Kölbchen) zu gewinnen, haben Biotinkonzentrationen im ng/ml Bereich ergeben (Tab. 9 und 12A und 12B, mit Ausnahme von *E. coli* BM 4062/pPEBBRbio bei 37 °C). Eine Optimierung der Produktion wurde mittels stärkerer Belüftung der Kultur (in "Schikanen-Kolben"), durch eine Erhöhung der CS-Konzentration, oder durch die Zugabe von zwei C-Quellen (Glukose/Succinat-Gemisch) erzielt. Versuche, eine Überproduktion auf LB-
Komplexmedium zu erreichen, haben eine 2 bis 5-fach höhere Biotin-Konzentration ergeben (bei *E. coli* ATCC 33767/pPESKbio wurde sogar weniger Biotin auf LB- als auf Glukose-Succinat-supplementierten M9-Medium produziert).

Die Produktivität kann oft im Fermenter erhöht werden (Stafford, 1986). Unter *fed-batch* Bedingungen werden die Bakterien im Fermenter unter ständigem Rühren und Belüftung angezogen (Stafford, 1986), wobei zu bestimmten Zeitpunkten zusätzliche Nährstoffe zugesetzt werden. Dadurch können erhöhte Zelldichten und höhere Produktionsraten erreicht werden.

Exemplarisch wurde der Stamm *E. coli* ATCC 33767 mit dem *bio*-Konstrukt pPESKbio in einem 3-Liter Fermenter (FairManTec; Göttingen) in M9-Mineralmedium (supplementiert mit 0,2 % Glukose, 0,5 % Succinat und 0,6 % Casaminosäuren) angezogen. Nach 12, 24 und 36 Std. wurden 50 ml Proben entnommen und gleichzeitig 50 ml einer Glukose-Succinat-Lösung zugegeben. Die Zellen wurden unter starkem Rühren (zwischen 1000 und 1100 Upm Geschwindigkeit des Rührers) und ständiger Belüftung angezogen. Der maximale OD-Wert, der unter diesen Bedingungen erreicht wurde, lag bei 4,2 nach 24 Std. Inkubation (Tab. 13). Die Produktkonzentration wurde bei 12, 24 und 36 Std. gemessen und zeigte 2,3 mg/ml Biotin im Kulturüberstand. Diese Werte liegen im gleichen Bereich wie die des selben Konstruktes auf Mineralmedium (supplementiert mit Glukose und Succinat). Die Daten in Tabelle 13 zeigen, dass nach 24 Std. die höchste Biotinproduktion erreicht wurde. Diese konnte nicht durch Zugabe von zusätzlichen C-Quellen und weiteren 12 Std. Wachstum erhöht werden.

Als weiterer Produktionsstamm für die mögliche Fermentation wurde *E. coli* BM 4062/pPEBBRbio getestet. Diese Fermentation wurde für 24 Std. oder 36 Std. bei 37 °C durchgeführt. Wie bereits beschrieben, wurden jede 12 Std. 50 ml Proben abgepumpt und 50 ml Glukose-Succinat Gemisch hineingepumpt. Die Zellen wurden in 2 oder 3 Liter Mineralmedieum angeimpft und der pH und die OD₆₀₀ wurden ermittelt. Die maximal erreichte OD₆₀₀ war 5,14 im Fermenter mit 2 Liter Medium. Im Fermenter mit 3 Liter Medium konnte eine maximale DO von 3,56 erreicht werden, was niedriger ist als die maximale OD, die in 100-ml *batch* Kulturen in Schüttelkolben in der Stationärwachstumsphase (OD₆₀₀ von 5,2 auf Glukose und 4,3 auf Succinat) gemessen wurde. In dem Fermenter mit 2 Liter Medium blieb mehr Luftraum und unter ständiger Belüftung stieg die relative O₂ Konzentration bis zu 280-300 % im Vergleich zu dem Fall mit 3 Liter Medium (100 % O₂ relativer Wert).

Die gemessene Biotinkonzentration im Überstand zeigte jedoch keine erheblichen Unterschiede zwischen den beiden Inkubationsbedingungen (s. Tab. 13) und lag zwischen 6,4 und 7,1 mg/l.

Tab. 13: Wachstum und Biotinproduktion im Fermenter von zwei verschiedenen *E. coli* Mutanten, transformiert mit den pPESKbio und pPEBBRbio-Konstrukten unter *fed-batch*-Bedingungen.

Stamm	OD ₆₀₀	рН	Biotin [mg/l]
ATCC 33767 ^a pPESKbio	*	*	*
12 Std.	3,425	6,5	2,2
24 Std.	4,040	7,3	2,3
36 Std.	4,050	7,3	2,3
BM 4062 ^b pPEBBRbio	* **	* **	* **
12 Std.	3,460/4,380	7,0/6,8	6,4
24 Std.	3,560/5,140	7,5/7,0	7,1
36 Std.	nd/4,640	nd/7,5	nd/6,6

^a- *E. coli* ATCC 33767 ist eine *bio*⁻Mutante (Abb. 9). ^b- *E. coli* BM 4062 trägt eine Punktmutation in dem *birA*-Gen (Barker and Campbell, 1980). *: die Fermentation wurde in 3 L Medium durchgeführt; **: die Fermentation wurde in 2 L Medium durchgeführt. Die Biotinkonzentration in den Kulturüberständen wurde mit *L. plantarum*und ELISA-Tests bestimmt. Die Werte repräsentieren Daten aus zwei unabhängigen Läufen des Fermenters pro Stamm und mindestens drei unabhängigen Biotinkonzentrationsmessungen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einsatz der *bio*-Gene des pCosHE2-Cosmides als Bausteine für die Konstruktion von biotinüberproduzierenden *E. coli*-Stämmen zu Stämmen führte, die unter bestimmten Anzuchtbedingungen eine maximale Ausbeute von 7,1 mg/l Biotin erreichten. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die bereits beschriebenen *bio*-Konstrukte in diverse Wirte zu exprimieren und somit einen alternativen Wirt für die Biotinproduktion zu finden.

III.3.2. Expression von *bio*-Konstrukten in unterschiedlichen Bakterien

Generell ist die Überproduktion von Biotin wegen möglicher Plasmidinstabilität oder anderer toxischer Effekte erschwert (Ifuku et al., 1992; Bower et al., 1996b). In dieser Arbeit wurden jedoch stabile *E. coli*-Stämme konstruiert (III.3.), wobei bei einer heterologen Expression von umweltisolierten *bio*-Genen in *E. coli* zunächst keine negativen Auswirkungen auf die Zellen beobachtet wurden. Um über die Konzentration von 7,1 mg/l (s.o.) hinaus Biotin zu produzieren, sollten in dieser Arbeit verschiedene Gram-negative und Gram-positive Bakterien als mögliche Wirte getestet werden. Bisher waren *S. marcescens*, *B. subtilis*, *B. sphaericus* und *Kurthia* sp. von anderen Arbeitsgruppen getestet worden, wobei es sich um eine homologe Überexpression handelte (Sakurai et al., 1993b; Kiyasu et al., 2001; Ohsawa et al., 1989). Demzufolge war es interessant, solche Mikroorganismen anzuwenden, die noch nicht als Biotin-Produzenten getestet wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bakterien aus der Familie *Rhizobiaceae* und insbesondere *S. meliloti* in Betracht gezogen. Weiterhin wurden Mikroorganismen aus anderen Gattungen, wie z.B. *Klebsiella, Xanthomonas, Ralstonia, Corynebacterium* getestet.

Es wurden *bio*-Gene (s. Tab. 2B) in einen mobilisierbaren Vektor pBBR1MCS-2 ligiert. Anschließend wurden diese in unterschiedliche Bakterien mittels Konjugation (s. II.8.3.) oder Elektroporation (s. II.8.4.) übertragen. Als Wirtsstämme wurden *S. meliloti* 1021, *S. meliloti* GR4, *Rhizobium* sp. NGR234 und noch weitere 45 *R. etli, R. tropici*-Isolate, *A. tumefaciens* C58, *X. campestris, R. euthropha* H16, *K. planticola*, und *C. glutamicum* verwendet. Die Selektion wurde auf Mineralmedium mit Zugabe von Avidin durchgeführt. Alle rekombinanten Stämme mit *bio*-Genen wurden mit Hilfe von PCR und Southernblot überprüft.

III.3.2.1. Expression von bio-Konstrukten unter dem Wildtyp Promotor

Zunächst wurde das unveränderte *bio*-Operon (mit dem Wildtyp Promotor) im Rahmen des mobilisierbaren Konstruktes pPEBBRbio (s. Abb. 17) nach diversen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien mobilisiert.

Rhizobium

Wie vorher von Streit berichtet (Streit and Phillips, 1996), produziert ein rekombinanter *S. meliloti* 1021-Stamm bis zu 1 μ g/l Biotin. Weitere Versuche waren notwendig um einen *Rhizobium*-Stamm mit verbesserten Wachstums- und Besiedlungs-charakteristika zu schaffen, der gleichzeitig Biotin im mg/l-Messbereich produziert.

Die das pPEBBRbio-Konstrukt enthaltenden *S. meliloti* 1021, *S. meliloti* 1021-B3/B6 (*S. meliloti* 1021-Mutanten in den *bioMNB*-Locus; Abb. 20) und *S. meliloti* GR4-Stämme wurden 3 bis 4 mal in GTS-Medium transferiert. Durch Zugabe von Avidin (0,065-0,13 U/ml) wurde der Selektionsdruck erhöht, so dass die Anwesenheit und die Expression der *bio*-Gene gesichert schien. Die Biotin-Ausbeute lag zwischen 2,4 und 7,0 μ g/l (Tab. 14). Interessanterweise produzierten die *S. meliloti* 1021-B3/B6-Stämme (Abb. 20) 4,3 μ g/l Biotin, was ca. 80 % höher war als der Wildtyp *S. meliloti* 1021-Stamm mit *bio*-Operon (2,4 μ g/l).



Abb. 20: Schematische Darstellung der *bioMNB*-Region auf dem Chromosom von *S. meliloti* 1021 und die Positionen der Transposonmutationen bei *S. meliloti* 1021-B3 und *S. meliloti* 1021-B6 (Entcheva et al., 2001, eingereicht).

Unter Biotin-limitierten Bedingungen zeigte der rekombinante *S. meliloti* 1021-Stamm logarithmisches Wachstum im Gegensatz zu *S. meliloti* 1021 Wildtyp, der ein bradytrophes Wachstum aufwies (Abb. 21).



Abb. 21: Wachstum und Biotinproduktion von *S. meliloti* 1021 und *S. meliloti* 1021/pPEBBRbio in GTS-Mineralmedium ohne Zugabe von Biotin. (•)-*S. meliloti* 1021/pPEBBRbio in GTS-Mineralmedium mit Zugabe von 0,065 U/ml Avidin; (\mathbf{V})-*S. meliloti* 1021/pPEBBRbio in GTS-Mineralmedium mit Zugabe von 0,13 U/ml Avidin; (\mathbf{m})-*S. meliloti* 1021/pPEBBRbio in GTS-Mineralmedium mit Zugabe von 0,13 U/ml Avidin; (\mathbf{m})-*S. meliloti* 1021 ohne Zugabe von Avidin.

Weitere *Rhizobium*-Stämme wurden als potentielle Wirte getestet, wie z.B. *Rhizobium* sp. NGR234 (Pueppke and Broughton, 1999), *R. etli* (Dunn et al., 1997), *R. tropici* (CIAT), *A. tumefaciens* C58 (Young et al., 2001). Diese Bakterien wurden so ausgewählt, dass sie zwar zur Gruppe der Rhizobien zählen jedoch aus unterschiedlichen Subgruppen stammten (Abb. 22) und somit verschiedene Wachstumscharakteristika und Wirtsspezifitäten aufweisen. In Tabelle 14 sind die toxischen Effekte aufgelistet, die nach der Expression des unveränderten *bio*-Konstruktes in diesen Stämme auftraten.



Abb. 22: Phylogenetische Verwandtschaft der *Rhizobiaceae* in der α -Subgruppe der Proteobakterien basiert auf dem Sequenzvergleich der kleinen Einheit der rRNA-Gene (nach Spaink et al., 1998, modifiziert). Mit Pfeilen sind die Subgruppen gezeigt, aus welchen in dieser Arbeit Rhizobien als Wirtsstämme verwendet wurden.

Stamm	Wachstumscharakteristika*	Biotin [µg/l]
S. meliloti 1021	Nicht limitiertes Wachstum in Mineralmedium	2,4
	nach Zugabe von 0,13 U/ml Avidin bei 30 °C	
S. meliloti 1021-B3	Nicht limitiertes Wachstum in Mineralmedium	4,2
-B6	nach Zugabe von 0,13 U/ml Avidin bei 30 °C	4,5
A. tumefaciens C58	Unstabiles, verlangsamtes Wachstum, die	nd
	Zellen präzipitieren	
Rhizobium sp.	Unstabiles, verlangsamtes Wachstum, die	nd
NGR234	Zellen präzipitieren	
S. meliloti GR4A	Nicht limitiertes Wachstum in Mineralmedium	7,0
	nach Zugabe von 0,065 U/ml Avidin bei 30 °C	
K. planticolla	Nicht limitiertes Wachstum in Mineralmedium	100,0
	nach Zugabe von 0,065 U/ml Avidin bei 30 °C	
X. campestris	Unstabiles, verlangsamtes Wachstum, die	nd
	Zellen prezipitieren	

 Tab. 14: Wachstum und Biotinproduktion von rekombinanten Gram-negativen Bakterien

 mit pPEBBRbio-Konstrukt auf Mineralmedium.

K. pneumoniae-Mineralmedium für *K. planticola* (Schmitz et al., 1996); GTS-Mineralmedium für *X. campestris*, *R. euthropha* H16 und für die *Rhizobium* Stämme; Biotin wurde im Überstand der Stationärwachstumsphase-Zellen mit ELISA- und *L. plantarum*-Test gemessen. Die Daten der Biotinkonzentration sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. *: das Wachstum wurde unter Biotin-limitierenden Bedingungen ermittelt. nd: keine Biotin-Messung möglich.

Klebsiella

Bis jetzt wurde die Gattung *Klebsiella* als möglicher Wirt für die Biotinproduktion nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde *Klebsiella planticola* als potentieller Biotinüberproduktions-Stamm in Betracht gezogen. *K. planticola* ist ein Pflanzenpathogen (Drancourt et al., 2001; Seidler et al., 1975) und somit war es zu erwarten, dass er selber Biotin in geringen Konzentrationen herstellt, jedoch das notwendige aus der Pflanze bekommt. Messungen im Rahmen dieser Arbeit haben ergeben, dass *K. planticola*-Wildtyp 200 pg/ml Biotin produziert.

Das pPEBBRbio-Konstrukt und der pBBR1MCS-2 mobilisierbare Vektor, wurden in *K. planticola* mittels Konjugation übertragen und anschließend das Wachstum und die Biotinproduktion auf Mineralmedium (Schmitz et al., 1996) ermittelt. In dem Überstand der Vektorkontrolle wurde eine Biotinkonzentration unter 200 pg/ml

detektiert. Dagegen wurde eine 500 bis 1000-fache Biotinüberproduktion im Kulturüberstand des *bio*-Konstruktes gemessen (Abb. 23).



Abb. 23: Biotin-Bioproduktion von *K. planticola*-Wildtyp und *K. planticola* transformiert mit dem *bio*-Konstrukt. Wildtyp-*K. planticola* mit dem pBBR1MCS-2 Vektor, *bio*-Konstrukt-*K. planticola* mit dem pPEBBRbio.

Xanthomonas

Ein anderes in der Natur sehr verbreitetes pflanzenpatogenes Bakterium ist *X. campestris*. Hier wurde ein Stamm, der für Fermentationsexperimente geeignet war (Slodki and Cadmus, 1978), als Wirt für die Biotinproduktion gewählt. Wie bei den bereits erwähnten *Rhizobium* sp. NGR234, *R. etli* und *A. tumefaciens* rekombinanten Stämme, traten Plasmidinstabilität und Toxizität auf (Tab. 14).

Corynebacterium

Als weiterer Wirt für die Biotinproduktion wurde das Gram-positive Bakterium *C. glutamicum* getestet. *C. glutamicum* ist für eine biotechnologische Produktion von Biotin geeignet, weil es als Aminosäure-Produzent in der Lebensmittelindustrie etabliert ist und als Biotin-auxotroph (Lengeler et al., 1999) bekannt ist. Das für Gram-negative Bakterien geeignete *bio*-Konstrukt pPEBBRbio (s. III.3. und Abb. 17) wurde mit einem *ori (origin of replication)* für *C. glutamicum* ausgestattet. Dieses wurde aus pCLiK5 (Köthe, 2000) mit Primer, die jeweils *Xho*I Schnittstellen trugen, amplifiziert (s. Tab. 3, Abb. 24). Letztendlich wurde das Konstrukt pPEBBRbiocg in *C. glutamicum* R163 elektroporiert (s. II. 8.4.). Die Selektion rekombinanter *bio⁺-C. glutamicum* wurde zunächst 2 bis 3 mal auf Komplexmedium durchgeführt, wobei dem Medium Antibiotika zugesetzt wurden. Die Versuche, *C. glutamicum* als Wirt für die Expression der *bio*-Gene auf den pPEBBRbiocg- und pPEPKbio-Konstrukten (s. Abb. 18) zu etablieren, waren weniger erfolgreich, da alle Zellen mit den oben beschriebenen Konstrukten in Abwesenheit von Biotin eingingen.



Abb. 24: Vektor-Konstrukt, das für *C. glutamicum* konstruiert wurde. Das *bio*-Konstrukt, enthält das *bio*-Operon aus dem Cosmid pCosHE2 mit dem Wildtyp Promotor als *HindIII/XbaI* Fragment und *ori* als *XhoI* Fragment. Blau: Wildtyp Promotor; andre Bestandteile des *bio*-Konstruktes sind wie folgt dargestellt: rot, *bio*-Gene; lila, *origin of replication* für *C. glutamicum*.

III.3.2.2. Konstruktion und Expression kontrollierbarer bio-Konstrukte

Zusätzlich zu den o. a. Versuchen mit dem unveränderten *bio*-Operon wurden zwei weitere Strategien entwickelt (Abb. 16B und 16C). (i) Die *bio*-Gene des pCosHE2-Konstruktes wurden als zwei Kassetten (*bioAorf1* und *bioBFCD*) mittels PCR amplifiziert. Diese zwei *bio*-Cluster wurden zunächst in pBSSK+ kloniert (Abb. 25) und danach mit *Kpn*I- bzw. *Xba*I-Endonukleasen ausgeschnitten und in dem Vektor pHSG399 in Richtung des *lacZ*-Genes zusammengesetzt. So entstand das Grundgerüst des umgebauten *bio*-Operons. (ii) Um das *bioBuD*-Grundgerüst zu konstruieren (s. Abb. 16C), wurden *bioF* und *bioC* aus den *bioBFCD*-Cluster mit *Sap*I und *Eco*RV herausgeschnitten. Die weiteren Klonierungsschritte erfolgten nach dem Schema, welches für die *bioBFCDAorf1*-Konstrukte in den Abbildungen 25 und 26 dargetellt wurde. Es wurden verschiedene Promotoren vor die Gene kloniert, um das System kontrollieren zu können.

In Abbildung 25 wurde die Klonierungsstrategie für die *nodD3 bio*-Konstrukte beschrieben. In diesem Fall trug das *Sall/Nco*I-Fragment den *nodD3* Promotor und die Shine-Dalgarno-Sequenzen. Die gleiche Klonierungsstategie wurde bei den *nodD1*-Konstrukten verfolgt (Daten nicht abgebildet). Die *nodD1* und *nodD3*-Gene sind typisch für *S. meliloti* 1021, es gibt aber äquivalente Gene in allen Rhizobien (Dusha et al., 1999; Kondorosi et al., 1991; Broughton and Perret, 1999). Diese Gene sind für die Nodulation verantwortlich und befinden sich unter der Kontrolle von Flavonoiden/Isoflavonen in der Rhizosphäre. Die Anwendung von solchen wirtsspezifischen Promotoren würden die Kontrolle der *bio*-Gene unter bestimmten Bedingungen ermöglichen.

Um eine stärkere Expression der *bio*-Gene zu erzeugen und so die Biotinproduktion zu erhöhen, wurden die Promotoren Ptrp und Ptac gewählt, welche aus bereits bekannten Überexpressionsvektoren amplifiziert und als *Hin*dIII/*Sal*I Fragment kloniert wurden (Tab. 2B und 3). In diesen Fällen wurde die Shine-Dalgarno-Sequenz aus dem *S. marcescens bioB*-Gen verwendet und als *Sal*I/*Nco*I Fragment eingesetzt. In Abbildung 26 ist die Konstruktion des Ptrp - regulierbaren *bio*-Konstruktes gezeigt. In Stämmen ohne chromosomale Kopie des *trp*-Operons (*S. meliloti, C. glutamicum,* usw.) wird dieses Konstrukt konstitutiv exprimiert. Das Ptac-regulierbare Konstrukt wurde anhand des gleichen Schemas zusammenkloniert. Der Ptac Promotor wurde gemeinsam mit dem *lac1*^q-Repressorgen aus pWLQ2 amplifiziert und als *Hin*dIII/*Sal*I Fragment stromaufwärts der Shine-Dalgarno-Sequenz aus dem *S. marcescens bioB*-Gen kloniert. Mit der Klonierung des Gens *lac1*^q auf dem Vektor wurde eine IPTG regulierbare Expression der *bio*-Gene ermöglicht (Schema nicht gezeigt).

III.3.2.3.1. Funktionalitätskontrolle anhand von Komplementationsstudien

Die zweite Strategie (Abb. 16B), das *bio*-Operon umzustukturieren und dieses unter die Kontrolle verschiedener Promotoren zu stellen, war mit der Konstruktion einer breiten Kollektion von *bio*-Konstrukten verbunden (Tab. 2B, Abb. 25 und Abb. 26). Um die Funktionalität der einzelnen Gene auf den Konstrukten zu überprüfen, wurden die Grundgerüst-Konstrukte in definierte *bio*⁻-Mutanten von *E. coli* transformiert (s. II.8.2.2.) und anschließend auf M9-Mineralmedium selektioniert. In Tabelle 15 sind *bio*⁻-Mutanten und dementsprechende *bio*-Konstrukte aufgelistet.

Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass alle einzelnen *bio*-Gene im Rahmen dieser *bio*-Konstrukte funktional sind. Das *bioA*-Gen des pPEHSGSDbio-Konstruktes komplementiert nicht die *bioA*⁻-Mutante von *E. coli*. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, befand sich das *bioA* hinter dem *bioD*-Gen und in Abwesenheit eines starken Promotors wurde möglicherweise das *bioA*-Gen nicht 100 % transkribiert. Die Gene auf dem pPEHSGSDbio-Konstrukt zeigten im Allgemeinen eine schwächere Expression und waren nur teilweise in der Lage die *E. coli bio*⁻-Mutanten zu komplementieren (s. Tab. 15). Dies könnte in Zusammenhang mit der vermutlichen Länge des Transkriptes (5,6 kb) im Vergleich zum kürzeren Ausgangtranskript stehen.



Abb. 25: Schematische Darstellung der Konstruktion des *nodD3* kontrollierbaren *bio*-Operons aus den *bio*-Genen des pCosHE2: pPEbioAorf ist pHSG399::*bioAorf1*; pPEbio ist pBSSK+::*bioBFCDbioAorf1*; pPEnodD3 ist pBSSK+::*nodD3*; pPESKD3bio ist pBSSK+:: *nodD3bioBFCDAorf*; pPED3bio ist pBBR1MCS-2::*nodD3bioBFCDAorf*.



Abb. 26: Schematische Darstellung der Konstruktion von Ptrp kontrollierbaren *bio*-Gene des pCosHE2-Cosmides: pPEbio ist pBSSK+::*bioBFCDAorf1*; pPESDbio ist pBSSK+:: SD*bioBFCDAorf1*; pPEHSGSDbiocm ist pHSG399::SD*bioBFCDAorf1*; pPEtrpbiocm ist pHSG399::*trp*SD*bioBFCDAorf1*, wobei der *trp*-Promotor aus dem pDR720 Expressions-Vektor (Pharmacia) mit *Hind*III/*Sal*I ausgeschnitten wurde; pPEtrpbior und pPEtrpbiof sind pBBR1MCS-2 Derivate, in denen mit *Eco*RI das Fragment *trp*SD*bioBFCDAorf1* in unterschiedliche Orientierungen kloniert wurde.

Stamm	Konstrukt	Wachstum in M9 <i>batch</i> -Kultur bei 30°C ^a	Wachstum auf M9 Agaroseplatten ^b
R879; bioA	pPEHSGSDbio	-	-
R879; bioA	pPEHSGtrpAorf	+	(+)
R879; <i>bioA</i>	pPEtrpbio	+	+
R875; <i>bioB</i>	pPEHSGSDbio	(+)	+
R875; <i>bioB</i>	pPEtrpbioBuD	+	+
R875; <i>bioB</i>	pPED1bio	+	+
R875; <i>bioB</i>	pPEtrpbio	+	+
R872; <i>bioF</i>	pPEHSGSDbio	+	+
R872; <i>bioF</i>	pPEtrpbio	+	+
R876; <i>bioC</i>	pPEHSGSDbio	+	+
R876; <i>bioC</i>	pPEtrpbio	+	+
R877; bioD	pPEHSGSDbio	(+)	(+)
R877; <i>bioD</i>	pPEtrpbioBuD	+	+
R877; <i>bioD</i>	pPED1bio	+	+
R877; <i>bioD</i>	pPEtrpbio	+	+
ATCC 33767	pPEloopATG	+-	-
ATCC 33767	pPEtrpbio	+-	-
ATCC 33767	pPEtacbio	+-	-
ATCC 33767	pPED1bio	(+-)	-
ME 9045	pPEtrpbio	(+-)	-
ME 9045	pPEtacbio	(+-)	-

Tab. 15: Komplementationsstudien in *E. coli bio*-Mutanten mit verschiedenen *bio*-Konstrukten. Die *bio*-Konstrukte wurden auf Funktionalität aller Gene überprüft.

^a-Das Wachstum wurde in M9-Mineralmedium mit und ohne Zugabe von 0,065 U/ml Avidin untersucht; ^b-M9-Agaroseplatten supplementiert mit 0,065 U/ml Avidin; Abkürzungen: SD-Shine-Dalgarno Sequenzen; *trp*-Tryptophan Promotor; *tac*-Tac Promotor; *D1*-Promotor des *nodD1*-Genes; *bio*-das umstrukturierte *bio*-Operon,wie es in Abb. 25 und 26 gezeigt worden ist. Die Zellen wurden in Flüssigkulturen bis zu 48 Std. inkubiert und auf Platten bis zu 24 Std. "+": kontinuierliches Wachstum bis OD₆₀₀ von ca. 2; "(+)": Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7; "+-": kontinuierlich abgeschwächtes Wachstum mit jedem Überimpfen; "(+-)": schwaches Wachstum nach dem ersten Überimpfen und kein Wachstum nach dem nächsten Transfers; "-": kein Wachstum. Das Wachstum wurde bei 30 °C untersucht, um Revertanten zu vermeiden.

III.3.2.3.2. Expression von kontrollierbaren *bio*-Konstrukten in verschiedenen Bakterien

Im folgenden wurden die wie oben beschriebenen und modifizierten *bio*-Konstrukte in unterschiedliche Bakterien mobilisiert und die Funktion getestet.

Die *bio*-Konstrukte, bei denen sich die *bio*-Gene unter der Kontrolle von *nodD1* und *nodD3* Kontrolle befanden, wurden mittels Konjugation in *S. meliloti* 1021, *Rhizobium* sp. NGR234 und *A. tumefaciens* C58 übertragen. Nach zweifacher Selektion auf biotinfreien GTS-Mineralagarplatten und Überprüfung mittels PCR (s. II.9.), wurden die positiven rekombinanten Klone in GTS-Mineralmedium angezogen.

Sinorhizobium meliloti

Die rekombinanten *S. meliloti* 1021-Stämme mit den pPED1bio und pPED3bio-Konstrukten (s. Tab. 2B) zeigten jedoch weiterhin ein bradytrophes Wachstum, welches sich vom Wachstum des Wildtyps *S. meliloti* 1021, der auf identischem Mineralmedium gewachsen war, nicht unterschied. Dagegen wuchs *S. meliloti* 1021/pPEBBRbio auf gleichem Medium logarithmisch, nicht Biotin-limitiert (Abb. 21).

Weitere *bio*-Konstrukte wurden in *S. meliloti* 1021 getestet, beispielsweise pPED1BuD und pPED3BuD, welche nur die Gene *bioB* und *bioD* unter der Kontrolle von *nodD1* und *nodD3*-Promotoren enthielten (Abb. 16C). An Hand der Funktionalitätstests mit *E. coli bio*⁻-Mutanten, Komplementationsstudien und *cross-feeding*-Experimenten mit *S. meliloti* 1021-B3 und *S. meliloti* 1021-B6 Transposon-Mutanten (Abb. 20) wurde festgestellt, dass die beiden *bio*-Gene in diesen Konstrukten funktional waren. Da die rekombinante *S. meliloti* 1021 Stämme nicht Biotin-prototroph wuchsen, konnte davon ausgegangen werden, dass die *nod*-Promotoren unter diesen Kultivierungsbedingungen im flüssigen Medium nicht angeschaltet werden konnten. Nach Zugabe von reinem Luteolin (1,75 μ M, der Induktor von diesen Promotoren) zeigten sich nur geringe Effekte, wobei die Zugabe von komplexen Samenexudaten aus *Medicago sativa* (Luzerne) den prototrophen Phänotyp wiederherstellte.

Andere regulierbare *bio*-Konstrukte wurden nach einem ähnlichen Schema konstruiert (Abb. 26) und auf Funktionalität getestet. Dazu zählten z.B. pPEtrpbio,

pPEtacbio, pPEtrpBuD, wobei die bio-Gene unter trp- und tac-Promotorkontrolle lagen. Das Vorhandensein der bio-Gene in den Konjuganten wurde in der ersten Generation mittels PCR nachgewiesen (s. II.9.). Es wurden jedoch keine stabilen rekombinanten S. meliloti 1021-Stämme, die entweder pPEtrpbio oder pPEtacbio enthielten, gewonnen. Das pPEtrpBuD-Konstrukt wurde sowohl in S. meliloti 1021-B3 als auch in S. meliloti 1021-B6-Mutanten übertragen (Abb. 20) und es wurde durch cross-feeding-Experimenten mit Dethiobiotin (der unmittelbare Vorläufer des Biotins) festgestellt, dass die Gene funktional waren. Jedoch konnte der prototrophe Phänotyp ohne die Zugabe des Biotinvorläufers nicht aufgehoben werden. Die unter starker Promotorkontrolle gestellten bio-Konstrukte führten zum unstabilen Wachstum und verursachten Zellprezipitation unter **Biotin-limitierenden** Bedingungen (Abb. 27).

Biotin-Überexpression in S. meliloti 1021 ist in der Regel mit verringertem Überleben assoziiert. Um die wichtige Frage zu beantworten, ob eine Biotinproduktion in S. meliloti auf höherem Niveau möglich oder die Expression von bio-Genen möglicherweise toxisch ist, wurde das Überleben des Wildtyps im Vergleich zu rekombinanten Stämmen untersucht. Dazu wurden das Wachstum und Überlebensfähigkeit folgender rekombinanten S. meliloti 1021-Stämme die analysiert: Sm1021-1/2 (pBBR1MCS-2), Sm1021-3 (pPED1bio), Sm1021-17 (pPED3bio) und Sm1021-bio (pPEBBRbio). Die Stämme wurden 2, 4 und 6 Wochen auf biotinfreiem GTS-Medium inkubiert. Anschließend wurden Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻⁷ angesetzt und auf TY-Selektivagarplatten ausplattiert. Die Kolonien erschienen auf den Platten nach 3 bis 5 Tagen. Die meisten S. meliloti 1021-Stämme waren in Flüssigmedium ungleichmäßig gewachsen. Aus Abbildung 28 wird ersichtlich, dass Sm1021-1/2 (die Wildtyp-Kontrolle) die höchste Überlebenszellzahl-Rate (ÜZZ-Rate) zeigte. Dagegen lies die Zahl der überlebenden Zellen bei den rekombinanten bio-Stämmen nach. Die Tendenzen blieben nach einer 4- bzw. 6-wöchigen Inkubation auf GTS-Medium unverändert. Nach 2 Wochen in Sm1021-bio-Kultur (S. meliloti 1021/pPEBBRbio) wurden 2,2.10⁷ Zellen/ml/OD, in Sm1021-3-Kultur (S. meliloti 1021/pPED1bio)-0,074.10⁷ und in Sm1021-17-Kultur (S. meliloti 1021/pPED3bio)-0,88.10⁷ Zellen/ml/OD gezählt. Dagegen wurden in der Sm1021-1/2-Kultur 5,86.10⁷ Zellen/ml/OD gezählt.

Ersichtlich wird, dass die Zahl der überlebenden Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den rekombinanten Stämmen nicht so deutlich nachgelassen hat (Abb. 28).

Beispielsweise war bei Sm1021-bio die Überlebenszellzahl nach 4 Wochen bis zu 4,3-fach, bei Sm1021-3 bis zu 32-fach und bei Sm1021-17 bis zu 10-fach niedriger als nach 2 Wochen. Dagegen änderte sich bei Sm1021-1/2 die ÜZZ um 30 % zwischen 2 und 4 Wochen. Nach 6-wöchiger Kultivierung zeigte die Negativkontrolle fast die gleiche Zahl von überlebenden Zellen im Vergleich zu 4-wöchiger Inkubation (4,2.10⁷ Z/ml/OD bzw. 4,5.10⁷ Z/ml/OD). Jedoch bei Sm1021-bio sank die ÜZZ nach 6 Wochen um ca. 50 % verglichen mit 4-wöchiger Kultivierung. Bis zu 4,6-fach weniger Zellen überlebten nach 6 Wochen verglichen mit 4 Wochen in Sm1021-3-Kultur und bis zu 5,6-fach bei der Kultur von Sm1021-17 (s. Abb. 28, die letzten zwei Balken). Demzufolge wurde der Unterschied zwischen S. meliloti 1021/pBBR1MCS-2 und den Stämmen, die mit bio-Genen ausgestattet waren, nach 4-wöchiger Inkubation deutlich größer. Somit unterschieden sich Sm1021-1/2 und Sm1021-bio in den ÜZZ nach 2 Wochen um das 2,7-fache, nach 4 Wochen um das 8,9-fache und nach 6 Wochen wurde den Unterschied mehr als 13-fach (Abb. 28, erste 6 Balken). Besonders deutlich wurden die Unterschiede in den ÜZZ zwischen Sm1021-1/2 und Sm1021-3, ca. 80-fach nach 2 Wochen ca. 1970-fach nach 4 Wochen und mehr als 8500-fach nach 6 Wochen.



Abb. 27: Toxische Effekte, verursacht von der Expression des *bio*-Operons unter der Kontrolle von *nodD1*, *nodD3*, *tac* und *trp*-Promotoren. (1): *S. meliloti* 1021/pBBR1MCS-2; (2): *S. meliloti* 1021/pPED1bio; (3): *S. meliloti* 1021/pPED3bio; (4): *S. meliloti* 1021/pPEtacbio; (5): *S. meliloti* 1021/pPEtrpbio.

Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Zellen, in denen das *bio*-Operon exprimiert wird, eine schlechtere Überlebensfähigkeit haben. Zusammen mit den Daten von den *trp* und *tac*-kontrollierten *bio*-Konstrukten zeigten diese Ergebnisse, dass die Expression von *bio*-Genen für *S. meliloti* in der Regel toxische Effekte hatte (Abb. 27).



Abb. 28: Überlebensphänotyp verschiedener *S. meliloti* 1021-Stämme. ÜZZ: Überlebenszellzahl; Sm1021-1/2 (pBBR1MCS-2); Sm1021-bio (pPEBBRbio); Sm1021-3 (pPED1bio); Sm1021-17 (pPED3bio). Überlebende Zellen nach 14, 28 und 42 Tage pro ml pro OD. *: Die ÜZZ des Sm1021-3-Stammes nach 6 Wochen ist 0,0005x10⁶.

Weitere *Rhizobiaceae*

In weiteren Versuchen wurden ausgewählte *bio*-Konstrukte in unterschiedlichen Rhizobien exprimiert. Hierfür wurden solche Rhizobien-Stämme gewählt, die phylogenetisch weit entfernt von *S. meliloti* stehen (Abb. 22). Somit wurde erwartet,

dass mögliche toxische Effekte vermieden werden konnten. Beispielsweise wurden *Rhizobium* sp. NGR234 und *A. tumefaciens* C58 getestet.



Abb. 29: Plattentests verschiedener Rhizobia-*bio*⁺Stämme, die mit *bio*-Konstrukten transformiert wurden im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Stämmen. (A) Rhizobium Stämme ohne *bio*-Konstrukte: (1) *A. tumefaciens* C58, (2) *S. meliloti* 1021-B3, (3) *S. meliloti* 1021, (4) *Rhizobium* sp. NGR234; (B) *S. meliloti* 1021 biotinauxotroph Mutanten mit dem pPEBBRbio-Konstrukt: (1) *S. meliloti* 1021-B3, (2) *S. meliloti* 1021-B3/ pPEBBRbio, (3) *S. meliloti* 1021-B6, (4) *S. meliloti* 1021-B6/pPEBBRbio; (C) *A. tumefaciens* C58 mit *bio*-Konstrukten: (1) pBBR1MCS-2, (2) pPED3bio, (3) pPED1bio, (4) pPEtrpbio, (5) pPEtacbio, (6) pPEBBRbio; (D) Wachstum von (1) *Rhizobium* sp. NGR234 und (2) *Rhizobium* sp. NGR234 mit dem pPEBBRbio Konstrukt auf einer Mineralagarplatte. Das Wachstum wurde in der Regel nach 4 bis 6 Tagen überprüft.

Die rekombinanten *Rhizobium* sp. NGR234 und *A. tumefaciens* C58-Stämme, welche sowohl die *nodD1* und *nodD3* als auch die *trp-* und *tac-* regulierbaren *bio-*Konstrukte trugen, zeigten generell instabiles Wachstum in GTS-Mineralmedium, daher konnten die *bio-*Gene nach 2 bis 3-maligem Transfer in biotinfreies GTS-Medium mittels PCR nicht mehr nachgewiesen werden. In Abbildung 29 sind die allgemeinen toxischen Effekte, die bei den rekombinanten *Rhizobium-*Stämmen auf Platten beobachtet wurden, gezeigt.

Corynebacterium

Die für Gram-negative Bakterien geeigneten *bio*-Konstrukte wurden mit einem *ori* (*origin of replication*) für *C. glutamicum* ausgestattet und in dieses Bakterium elektroporiert (s. II.8.4.). Die *bio*-Gene konnten nach kontinuierlichem Transfer auf Mineralmedium mit Zugabe von Biotin mittels PCR nachgewiesen werden. Trotzdem zeigten alle rekombinanten Klone keine Komplementation des biotinauxotrophen Phänotyps dieses Bakteriums auf biotinfreiem Mineralmedium.

Da verschiedene Bakterien als Wirte für die Überexpression von *bio*-Konstrukten überprüft wurden und in der Regel die Biotinüberproduktion toxische Effekte gezeigt hat, ist in Tabelle 16 ein Überblick dargestellt, welche Mikroorganismen geeignet zu sein scheinen.

Tab. 16: Unterschiedliche Gram-negative und Gram-positive Bakterien, die als Wirtsstämme verwendet wurden und die *bio*-Konstrukte, die konjugiert bzw. elektroporiert wurden.

Mikroorganismen	<i>bio</i> -Konstrukt	Eignung als Produzenzen
K. planticola	pPEBBRbio	+
X. campestris	pPEBBRbio	-
<i>R. euthropha</i> H16	pPEBBRbio	-
R. tropici Stämme	pPEBBRbio	-
R. etli Stämme	pPEBBRbio	-

Rhizobium sp. NGR234	pPEBBRbio	_
1	pPEtrpbio	-
	pPEtacbio	-
	pPED1bio	-
	pPED3bio	-
	1	
S. meliloti GR4	pPEBBRbio	(+)
S. meliloti 1021	pPEBBRbio	(+)
	pPEtrpbio	-
	pPEtacbio	-
	pPEtrpBuD	-
	pPEtacBuD	-
	pPED1bio	-
	pPED3bio	-
	pPED1BuD	-
	pPED3BuD	-
S. meliloti 1021-B3/B6	pPEBBRbio	(+)
	pPEtrpbio	-
	pPEtacbio	-
	pPEtrpBuD	-
	pPED1BuD	-
	pPED3BuD	-
A. tumefaciens C58	pPEBBRbio	_
0	pPEtrpbio	-
	pPEtacbio	-
	pPED1bio	-
	pPED3bio	-
C alutamicum	pPEBBRbiog	
C. giuiumicum	p EDDKOUUS pDEDKhio	-
	pr cr NUIU	-
	preuppiocg	-
	pPEtacbiocg	-

K. pneumoniae-Mineralmedium für *K. planticola* (Schmitz et al., 1996); GTS-Mineralmedium für *X. campestris*, *R. euthropha* H16 und für die *Rhizobium* Stämme; "-": der Stamm mit den entsprechenden *bio*-Konstrukten war als Biotinproduzent nicht geeignet; "(+)": der Stamm mit den entsprechenden *bio*-Konstrukten war als Biotinproduzent geeignet, wobei die Produktionsrate als eher niedrig einzustufen war; "+": der Stamm mit den entsprechenden *bio*-Konstrukten war als Biotinproduzent geeignet, wobei die Produktionsrate als eher niedrig einzustufen war; "+": der Stamm mit den entsprechenden *bio*-Konstrukten war als Biotinproduzent sehr gut geeignet. pPEBBRbio: unverändertes *bio*-Operon in pBBR1MCS-2 Vektor; pPEtrpbio: *bio*-Operon unter *trp* Promotor Kontrolle in pBBR1MCS-2 Vektor; pPEtacbio: *bio*-Operon unter *tac* Promotor Kontrolle in pBBR1MCS-2 Vektor; pPED3bio: *bio*-Operon unter *nodD3* Promotor Kontrolle in pBBR1MCS-2 Vektor.

III.3.3. 2-D gelelektrophoretische Analyse von Proteinmuster

Bisher wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Biotinproduktion in der Mehrzahl der getesteten Bakterien zu toxischen Effekten führte. Daher wurde hierfür eine 2D-Gelanalyse durchgeführt, um diese Effekte zu untersuchen. Diese Methode hat sich in den letzten Jahren als leistungsfähige Technik für die Analyse von Unterschieden auf Proteinebene erwiesen zwischen Zellen, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogenen wurden.

Für 2-D-Gelanalysen wurden S. meliloti 1021-Wildtyp, S. meliloti 1021/ pBBR1MSC-2 und S. meliloti 1021/pPEBBRbio in GTS-Mineralmedium angeimpft und bis zum Erreichen der Stationärwachstumsphase inkubiert. Der rekombinante S. meliloti 1021 mit dem unveränderten bio-Operon aus pCosHE2 wurde unter biotin-limitierenden Bedingungen inkubiert, dagegen wurde S. meliloti 1021 mit dem leeren Vektor pBBR1MCS-2 mit 400 pM externen Biotin angezogen. Die Proteinextrakte wurden wie unter II.13 beschrieben hergestellt. In Abbildung 30 sind exemplarisch silbergefärbte 2-D-Gele der S. meliloti 1021/pBBR1MSC-2 und S. meliloti 1021/ pPEBBRbio-Stämme (s. oben) gezeigt. Dabei wurden erhebliche Unterschiede in dem Proteinmuster zwischen Zellen mit bio-Genen, die Biotin endogen produzierten und Wildtyp-Zellen, die mit exogenem Biotin wuchsen, beobachtet. Die Proteine, die in Abbildung 30 mit einer festen Linie umgekreist sind, wurden mit MALDI-TOF Analyse untersucht. Die Proteinspots wurden tryptisch verdaut und die Masse der dabei entstandenen Peptide wurden gemessen (MALDI-TOF Bruker, Deutschland). Mit dem Matrix Science Mascot Analyseprogramm [www.mascotscience.com] wurden die Massen der Peptide in der Datenbank verglichen. In Tabelle 17 sind die analysierten Proteine zusammen mit identifizierten korrespondierenden Proteinen und deren möglichen Funktionen aufgelistet. Es stellte sich heraus, dass in dem Sm1021-bio Stamm das Protein 1 (s. Abb. 30A), dessen Expression hochreguliert wird, ein konserviertes hypothetisches Protein mit Mr 12,65 kDa und pI 5,43 ist. Sequenzvergleiche mit NCBI und ERGO Datenbanken zeigten Homologien zu hypothetischen Proteinen aus M. loti und A. tumefaciens. Die Analyse der Peptidmassen des Proteins 2 haben keine signifikanten Homologien zu Proteine aus S. meliloti 1021 gezeigt. Bei den Proteinen 3 bis 5 (s. Abb. 30A und 30B) ergab die Peptidmassenanalyse Homologien zu bereits bekannten Proteine aus P. aeruginosa, M. loti und S. meliloti, respektiv. Weitere Untersuchungen in S.

meliloti Datenbanken [http://sequence.toulouse.inra.fr/meliloti] zeigten, dass in *S. meliloti* 1021 Proteine mit gleichen Funktionen, dessen Molekulargewicht und pI mit den ausgeschnittenen Spots (Abb. 30) übereinstimmt vorliegen. Dennoch trotz sind weitere Analysen in diese Richtung erforderlich.

Aus Tabelle 17 wird ersichtlich, dass es sich bei dem Proteinspot "3" möglicherweise um ein Protein, welches am Poly- β -hydroxybuttersäure-Abbau (PHB-Abbau) beteiligt ist, handelt. Weiterhin interessant ist, dass Protein "5", welches bei den Wildtyp Zellen überexprimiert zu sein scheint, Homologien zu *orf14* im Chemotaxsis-Operon zeigt. Bisher ist die Funktion des Proteins ORF14 nicht bekannt und weitere Sequenzanalysen in NCBI und ERGO haben keine Informationen in diese Richtung ergeben.

Andere Proteine werden ebenfalls mittels MALDI-TOF Analyse untersucht, um zu einem vollständigen Bild über die Proteinveränderungen in *S. meliloti* 1021 in Anwesenheit von externem und selbstproduziertem Biotin zu kommen.

Tab. 17: MALDI-TOF Analyse von tryptischverdauten Proteinspots aus *S. meliloti* 1201 (Abb. 30) mit den Matrix Science Mascot Programmpaket, *S. meliloti* Datenbank, NCBI und ERGO.

Protein Spot	<i>S. meliloti</i> Stamm	Score ^a	Putative Funktion in <i>S. meliloti</i> 1021	<i>Accession</i> Nummer ^b
1	Sm1021-bio	92	Nicht bekannt	CAC46064
2	Sm1021-bio	nd	nd	nd
3	Sm1021-bio	38	1. Dehydrogenase/Reductase; PhbB ähnlich	1. Y20493 2 Y20662
			2. Oxidoreduktase; BdhA ähnlich	2. 120002
4	Sm1021-bio	40	ATP-binde Protein ABC Transporter	Y21130
5	Sm1021	54	Nicht bekannt	AAB81407

Sm1021-bio: *S. meliloti* 1021/pPEBBRbio (pBBR1MCS-2 Vektor mit dem unveränderten *bio*-Operon aus pCosHE2) gewachsen ohne externes Biotin; Sm1021: *S. meliloti* 1021 Wildtyp gewachsen mit 400 pM Biotin; nd: keine homologen Proteine konnten nach der Analyse gefunden werden. ^a: *Score*-Wert nach der Mascot Analyse, zeigt die Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Zuordnung; ^b: *Accession* Nummern von den putativen Proteinen.





Abb. 30: 2-D gelelektrophoretische Analyse der Proteinextrakte von (A) *S. meliloti* 1021pPEBBRbio angezogen ohne exogenes Biotin; (B) *S. meliloti* 1021- pBBR1MCS-2 angezogen mit 400 pM Biotin; mit --- sind die Proteine aufgezeigt, die noch untersucht werden ; mit – sind die Proteine gekennzeichnet, die mittels MALDI-TOF Analyse untersucht wurden. Untersuchter p*I* Bereich zwischen 3 und 10.

III.4. Wachstumsanalysen von *bio*⁺Stämmen in der pflanzlichen Rhizosphäre

In dieser Arbeit wurden rekombinante Bakterien aus der Familie *Rhizobiaceae* konstruiert, welche *bio*-Gene unter unterschiedlicher Promotorkontrolle exprimierten. Dabei zeigte sich, dass die getesteten *Rhizobium*-Stämme in *batch* Kulturen für die Biotinüberproduktion nicht geeignet waren. Weiterhin wurden Versuche durchgeführt, um eine Rhizosphäre mit Hilfe von *bio*⁺ Rhizobien zu modellieren.

Biotin spielt als Bestand der Wurzelexudaten eine Signalrolle im Besiedlungsprozess bei den Luguminosen. Daher stellte sich die Frage, ob die wie oben beschrieben konstruierten rekombinanten Rhizobium-Stämme, die extrachromosomale bio-Gene enthielten, für das Modellieren von Rhizosphären und Bakterien-Pflanzen Interaktionen geeignet sind. Erste Versuche mit S. meliloti bio-Stämmen wurden in Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. D. A. Phillips (University of California, Davis) angesetzt. Luzerne-Pflanzen wurden mit S. meliloti bio-Stämmen, nämlich Sm1021-3 (pPED1bio), Sm1021-17 (pPED3bio), Sm1021-4 (pPED1bioBuD) und Sm1021-7 (pPED3bioBuD) infiziert. Als Kontrolle diente S. meliloti 1021pBBR1MCS-2. Nach 10-wöchigem Wachstum wurden die Knöllchen gezählt und die Zahl der Bakterien pro Wurzel wurde berechnet (Abb. 31). Aus Abbildung 31 ist ersichtlich, dass Sm1021-3 verbesserte Besiedlungsfähigkeiten in der Rhizosphäre aufweist. Bei Sm1021-3 wurde eine im Vergleich zu Sm1021-1/2 ca. 4-fach erhöhte Zahl von Knöllchen beobachtet. Auch der Stamm Sm1021-4 zeigte eine bis zu 10 % verbesserte Besiedlungsrate. Diese Daten deuten darauf hin, dass die bio-Konstrukte unter der Kontrolle des nodD1-Promotors in der Rhizosphäre angeschaltet werden. Dagegen zeigten die nodD3-Promotor kontrollierten Konstrukte keinen verbesserten Besiedlungsphänotyp im Vergleich zu dem S. meliloti 1021-Stamm mit dem pBBR1MCS-2 Vektor.



Abb. 31: Luzerne-Rhizosphäre Besiedlungsversuche mit verschiedenen *S. meliloti* 1021 rekombinanten Stämmen. Sm1021-1/2: *S. meliloti* 1021/pBBR1MCS-2; Sm1021-3: *S. meliloti* 1021/pPED1bio; Sm1021-17: *S. meliloti* 1021/pPED3bio, Sm1021-4: *S. meliloti* 1021/pPED1bioBuD, Sm1021-7: *S. meliloti* 1021/pPED3bioBuD. Auf der "y" Achse ist die Zahl der gebildeten Knöllchen auf eine Wurzel/ml Zellsuspension. CFU (*colony forming units*) entspricht in diesem Fall der Zahl der Knöllchen, die an einer Wurzel gebildet werden.

Wie zuvor berichtet wurde (Streit et al., 1996; Phillips et al., 1999), spielt Riboflavin zusammen mit Biotin eine stimulierende Rolle für die Besiedlung der Wurzeln. Demzufolge boten sich Rhizosphären-Experimente mit rekombinanten *S. meliloti* 1021-Stämmen an, die sowohl *bio*-Gene als auch *rib*-Gene exprimieren können. Hierfür wurde ein pSUP210-Derivat verwendet, welches die *ribBA*-Gene trug (D. A. Phillips, s. Tab. 2). Als Wirt wurde der bereits beschriebene *S. meliloti* 1021/pPEBBR-bio-Stamm verwendet. Der Vektor pSUP210 und seine Derivate sind nicht in der Lage in *S. meliloti* zu replizieren. Demzufolge kann nichtlegitime Integration stattfinden. Nach der Konjugation wurden vier verschiedene Größen von Kolonien isoliert: große, mittlere, kleine und sehr kleine.

Diese unterschiedlichen Phänotypen können mit der zufälligen Integration der pSUP210-Derivate im Chromosom erklärt werden. Dadurch werden diverse Gene unterbrochen und somit möglicherweise wichtige Zellfunktionen beeinflusst. Mit den Stämmen S. meliloti 1021 biorib-1-gross, S. meliloti 1021 biorib-2-mittelgross, S. meliloti 1021 biorib-9-klein, S. meliloti 1021 biorib-12-klein, S. meliloti 1021 klein wurden Wurzeln biorib-19-sehr von Luzerne infiziert und die Knöllchenbildung ermittelt (Abb. 32A). Aus Abbildung 32A ist ersichtlich, dass der Stamm Sm1021-biorib-1, welcher große Kolonien auf GTS-Mineralmediumplatten bildete, die besten Besiedlungsfähigkeiten zeigte. Es wurde die Biotinproduktion bei den oben beschriebenen rekombinanten "biorib"- Stämmen gemessen (Abb. 32B). Aus Abbildung 32B wird ersichtlich, dass im Kulturüberstand der meisten "biorib" rekombinanten Stämme, so wie bei der Vektorkontrolle kein Biotin gemessen werden konnte (die Biotinkonzentration war unterhalb des Messbereiches). Bei den S. meliloti 1021 biorib-1 und biorib-19-Stämmen wurde Biotin in einer Konzentration von 3 bzw. 1,5 µg/l im Überstand detektiert (Abb. 32B). Die Unterschiede in der Biotinproduktivität der verschiedenen "biorib"-Stämme kann auf die Integration des pSup205ribBA-Konstrukts und die daraus resultierende Unterbrechung von möglicherweise essenziellen Genen zurückgeführt werden. Aus Abbildung 32A und 32B wird ersichtlich. dass die verbesserten Besiedlungscharakteristika der rekombinannten S. meliloti 1021 biorib-1 und S. meliloti 1021 biorib-19 Stämmen mit ihren Biotinproduktionsfähigkeiten übereinstimmten.

Abb. 32: (s. folgende Seite) (A) Luzerne-Rhizosphäre-Besiedlungsversuche mit verschiedenen rekombinanten *S. meliloti* 1021 Stämmen. Auf der "y" Achse ist die Zahl der gebildeten Knöllchen auf eine Wurzel/ml Zellsuspension. CFU (*colony forming units*) entspricht in diesem Fall der Zahl der Knöllchen, die an einer Wurzel gebildet werden; (B) Biotinkonzentrations-Bestimmungen im Kulturüberstand. Mit "biorib" sind *S. meliloti* rekombinante Stämme, die das pPEBBRbio-Konstrukt und die *ribBA*-Gene für die Riboflavin-Biosynthese enthielten, gekennzeichnet. Sm1021-1/2- *S. meliloti* 1021-pBBR1MCS-2; *S. meliloti* 1021 biorib-1: große Kolonie, *S. meliloti* 1021 biorib-2: mittlere Kolonie, *S. meliloti* 1021 biorib-9: kleine Kolonie, *S. meliloti* 1021 biorib-12: kleine Kolonie, *S. meliloti* 1021 biorib-19: sehr kleine Kolonie.



IV. Diskussion

IV.1. Verbreitung und biotechnologisches Potential von prokaryotischen Mikroorganismen

Mikroorganismen spielen eine wichtige Rolle im biogeochemischen Zyklus in der Biosphäre (Whitman et al., 1998). Sie produzieren Komponenten der Erdatmosphäre und repräsentieren einen Teil des genetischen Reichtums unseres Planeten. Das genetische Potential dieser Mikroorganismen wird von einige Autoren (Handelsman et al., 1998) als Metagenom bezeichnet und umfasst weit mehr genetische Information als bisher angenommen. Es wird geschätzt, dass alle aquatischen Habitate insgesamt 1,18x10³⁰ prokaryotische Zellen enthalten, während Prokaryoten in terrestrischen Nischen zu $2,55 \times 10^{29}$ vorkommen (Whitman et al., 1998). Unter der Oberfläche (ab 10 cm), in den Meersedimenten und im Boden wurden bis zu 3,8x10³⁰ prokaryotische Organismen berechnet (Abb. 33). Die Mehrheit von ihnen bewohnt Tiefen bis zu 600 m mit einer Dichte zwischen 220x10⁶ und 0,95x10⁶ Zellen/ml (Whitman et al., 1998) (Abb. 34). Es wird angenommen, dass bis zu 1,46x10²⁷ prokaryotische Zellen das Grundwasser bewohnen. Weitere Habitate für Prokaryoten Körperoberflächen und Körperhüllen sind (insbesondere Intestinaltrakte) verschiedener Tiere. Beispielsweise befinden sich im Rinderdarm bis zu 2.1×10^{10} Zellen/g und auf der menschlichen Haut zwischen 10^3 und 10^6 Zellen/cm². Weiterhin stellen die Atmosphäre mit bis zu 5×10^{19} cfu (Koloniebildende Einheiten) und die Oberfläche von pflanzlichen Blättern mit bis zu 10¹¹cfu/m² ein Reservoir an prokaryotischen Mikroorganismen dar.



Abb. 33: Anzahl der Prokaryoten in verschiedenen Habitaten auf der Erde (nach Whitman et al., 1998). (A) Relativer Anteil der Prokaryoten, die verschiedene Habitate bewohnen; (B) Geschätzte Zahl $[x10^{30}]$. (1) Blau: Anzahl der Prokaryoten im Ozean; (2) hellblau: Zahl der Prokaryoten im Grundwasser; (3) dunkelblau: Zahl der Prokaryoten in Sedimenten; (4) grün: Zahl der Prokaryoten im Boden.



Abb. 34: Verbreitung der Prokaryoten in verschiedenen Tiefen der Sedimente (nach Whitman et al., 1998). Die Prokaryoten, deren Verbreitung in der Tiefe hier gezeichnet ist, sind in Abb. 30 dunkelblau gezeigt. 97 % aller Prokaryoten in Sedimenten sind in der ersten Schicht bis 600 m zu finden. Das sind umgerechnet $3,7x10^{30}$ Zellen.

Aus dieser Übersicht über die Menge und die Verbreitung der Prokaryoten in der Umwelt (alle Daten nach Whitman et al., 1998) wird ersichtlich, dass die Mikroorganismen auf der Erde eine wichtige Rolle im gesamten Stoffkreislauf spielen und ein großes genetisches Potential darstellen, das bisher nur unvollständig genutzt wird.

IV.2. Biodiversitäts-Biotechnologie

Die klassischen Methoden, um neue Enzyme und Stoffwechselwege zu entdecken, beruhen auf *Screening*, Anreicherung und Isolierung von bisher unbekannten Mikroorganismen. Dennoch ist die Vielfalt an Organismen, die in der Umwelt einzeln oder in Gemeinschaften (in Biofilmen oder verschiedenen symbiotischen Interaktionen) leben, bisher zu 99 % unerforscht. Mit den bereits bekannten Kultivierungsmethoden können nicht mehr als 1 % der Mikroorganismen identifiziert werden (Amann et al., 1995). Somit geht beim Kultivieren auf selektiven Medien ein großer Teil der Biodiversität verloren. Nach Amann et al. (1995) liegt der Anteil an kultivierbaren Mikroorganismen bei 0,001-0,1 % für Meerwasser und bei 1-15 % für Klärschlamm.

Um die Kultivierung zu umgehen wurden in den letzten Jahren neue molekularbiologische Methoden entwickelt, wie beispielsweise quantitative Dotblot-Hybridisierung, in situ Hybridisierung mit unterschiedlich markierten Sonden (Lee et al., 1999; Amann et al., 1995; DeLong et al., 1999), DGGE-fingerprinting (Griffiths et al., 2000), Mikroautoradiographie und FISH (fluorescent in situ hybridisation) (Amann et al., 1995; Lee et al., 1999; Spring et al., 2000). Diese Techniken helfen die Struktur mikrobiologischer Gemeinschaften zu ermitteln und das genetische Potential abzuschätzen (Lee et al., 1999; Amann et al., 1995; Ovreas and Torsvik, 1998; Whiteley and Bailey, 2000; Wimpenny et al., 2000; Nogales et al., 2001; Pace, 1997; Spring et al., 2000; Dojka et al., 2000). Solche Methoden sind besonders wichtig für die Umweltforschung, da die Organismen in situ (in deren natürlichen Habitaten) erforscht werden können. Einige Schwierigkeiten haben sich dadurch ergeben, dass die verschiedenen Umweltnischen ungleichmäßig bewohnt sind (zwischen 0,5x10⁵ Zellen/ml bis zu 10x10⁵ Zellen/ml in den aquatischen Habitaten und zwischen $4x10^7$ Zellen/g bis $2x10^9$ Zellen/g in der oberen 1 m-Schicht der unterschiedlichen Bodenarten) (Whitman et al., 1998). Außerdem verhindern die physikalisch-chemischen Charakteristika einiger Habitate die Anwendung von in situ Hybridisierung, wobei Probleme mit der Hintergrundreaktion der Umweltpartikel auftraten (Amann et al., 1995). Aus diesen Gründen wurde bisher eine Kombination verschiedener Methoden bevorzugt (Amann et al., 1995; Lee et al., 1999; Spring et al., 2000), um bisher unbekannte Mikroorganismen in situ und ohne Kultivierung zu identifizieren.

Eine andere Methode stellt die rRNA-Sequenzanalyse, kombiniert mit PCR mit spezifischen Primern für konservierte rRNA-Regionen dar (Eder et al., 1999; Keswani and Whitman, 2001; Johnsen et al., 1999). Mittels dieser Technik können Mikroorganismen verschiedenen phylogenetischen Gruppen zugeordnet und die Position der unterschiedlichen Mikroorganismen im Reich der *Bactera/Archaea/Eukarya* (Dojka et al., 2000; Griffiths et al., 2000) festgestellt werden. Andere Methoden bauen auf der Analyse der Membranlipide auf (Spring et al., 2000).

Alle bereits erwähnten Methoden haben eine Gemeinsamkeit: die Mikroorganismen werden *in situ* identifiziert und phylogenetisch zugeordnet, aber es werden weder Zellen noch funktionale Gene isoliert. Sie ermöglichen es, einen Eindruck über die Struktur des Ökosystems zu gewinnen, jedoch lässt sich wenig Information über das physiologische und biochemische Potential der Gemeinschaft gewinnen. Um dieses Problem zu lösen, wurde bisher eine auf PCR beruhende Methode angewendet, um Gene für bestimmte Enzyme direkt aus Umwelt-DNA zu amplifizieren (Eschenfeldt et al., 2001). Allerdings, hat diese Methode den Nachteil, dass die Primer für die amplifizierten Gene von bereits bekannten Sequenzen abgeleitet wurden und somit keine tatsächlich neuartige Enzyme gefunden werden können.

Um die oben beschriebenen Schwierigkeiten zu umgehen, wurden in den letzten 3 Jahren alternativ zu den *in situ* Techniken Methoden zur Konstruktion von Umwelt-Genbanken entwickelt. Bei dieser Vorgehensweise wurde DNA aus Umwelt-Habitaten gewonnen und kloniert. Anschließend wurden unbekannte Gene isoliert und exprimiert (Henne et al., 1999; Rondon et al., 2000; Entcheva et al., 2001). Bisher konnte diese Technik genutzt werden um kleine DNA-Fragmente, zumeist einzelne Gene, zu identifizieren.

Zwei verschiedene Strategien wurden bisher verfolgt, um Genbanken aus Umweltproben zu konstruieren. Eine basiert auf der Isolierung der Mikroorganismen aus Bodenpartikeln (Torsvik et al., 1990), eine andere auf der Isolierung von DNA direkt aus Umweltproben ohne vorher die Zellen aus den Bodenproben abzutrennen (Zhou et al., 1996). Beide Methoden wurden erfolgreich für die Extraktion von DNA aus unterschiedlichen Umweltproben angewendet (Cifuentes et al., 2000; Henne et al., 1999). Die Vorgehensweise hat einen gravierenden Nachteil. Huminsäuren und Mineralien, die zusammen mit der DNA aus Bodenpartikeln extrahiert werden (Frostegard et al., 1999; Griffiths et al., 2000; Miller et al., 1999), hemmen oft weitere Klonierungsschritte. Dadurch ist eine zusätzliche Reinigung der DNA erforderlich (Ogram et al., 1987; More et al., 1994). Diese Methoden sind zeitaufwendig und mit hohen DNA-Verlusten verbunden.

Alternativ zu den oben aufgeführten Plasmid-Genbanken wurden sog. BAC-Genkanken (*bacterial artificial chromosome*) (Rondon et al., 2000; MacNeil et al., 2001) angelegt, wobei DNA-Fragmente von 40-60 kb kloniert wurden. Jedoch ist die Expression der klonierten Gene wegen der niedrigen Kopienzahl der BACs pro Zelle nicht stark genug und es besteht somit generell die Gefahr, dass Enzymaktivitäten nicht detektiert werden können. Die Konstruktion von Cosmid-Genbanken stellt eine neue Möglichkeiten dar, um DNA-Fragmente zwischen 30 kb und 40 kb zu klonieren und in Wirtsstämmen zu exprimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Methode entwickelt, um große DNAreproduzierbar zu klonieren und neuartige Operons Fragmente und Stoffwechselwege zu identifizieren (Entcheva et al., 2001). Dies ist die erste Arbeit, in der Cosmid-Genbanken aus Umweltproben angelegt wurden. Anreicherungskulturen aus diversen Umweltproben wurden angesetzt und Gesamt-DNA aus den so entstandenen mikrobiologischen Konsortien isoliert. Dabei wurde eine chemische Zelllyse durchgeführt. Die DNA, die auf diese Weise aus den Anreicherungskulturen gewonnen wurde (Entcheva et al., 2001), war hochmolekular und frei von Huminsäuren und anderen Verunreinigungen und konnte problemlos für die Konstruktion von Cosmid-Genbanken verwendet werden. Mit der Kombination von Anreicherungskulturen und der direkten Klonierung wurden reproduzierbar Cosmid-Genbanken mit Fragmentgrößen von ca. 30 kb angelegt.

Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit war die Isolierung von neuartigen Biotinbiosynthese-Operons (*bio*-Operons) aus Umweltproben und deren Verwendung für die Konstruktion von biotinüberproduzierenden Bakterien. Für diese Zwecke werden hocheffektive bio-Operons benötigt. Organismen mit solchen Operons wurden mit Hilfe von Avidin während der Anreicherung gewonnen. Avidin bindet an Biotin (Stryer, 2000) und verringert dessen Konzentration im Medium. Biotinproduzenten Demzufolge setzten sich durch und bildeten ein "biotinproduzierendes" Konsortium. Diese Arbeit unterscheidet sich von den klassischen Anreicherungen, wie sie von Winogradsky und Beijerinck (Fuchs and Kroeger, 1999) durchgeführt worden sind, in einem wichtigen Punkt: Ziel dieser Arbeit war nicht die Isolierung einzelner Mikroorganismen. Es wurden mikrobielle Gemeinschaften denen die gewonnen. in Mikroorganismen bestimmte biotechnologisch interessante Eigenschaften besaßen. Die DNA, die aus diesen mikrobiellen Konsortien gewonnen wurde, enthielt keine Huminsäuren und war für Cosmid-Genbanken geeignet. Letztendlich wurden mit dieser Technik drei Umweltgenbanken aus Konsortien angelegt. Somit wurde zum ersten Mahl reproduzierbar die Klonierung und Identifizierung von Genclustern und Operons aus Umweltproben gezeigt.

Ein weiterer Schwerpunkt in der vorliegenden Atbeit war es, die Diversität der Anreicherungskulturen zu überprüfen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Kultivierung auf Mineralagarplatten zeigten (Abb. 7), dass trotz des relativ hohen selektiven Druckes in allen Fällen unterschiedliche mikrobielle Konsortien gebildet wurden (Tab. 4). Dabei war auffällig, dass in der Anreicherungskultur aus dem Intestinaltrakt (Pferdedung, HE) nur drei verschiedene Kolonientypen auftraten. In anderen Arbeiten wurden Versuche durchgeführt, die Biodiversität von ähnlichen Proben bestimmten (Dojka et al., 2000). Dabei stellte sich heraus, dass obwohl der Intestinaltrakt ein nahrungsreiches Habitat ist, er nur über eine begrenzte mikrobielle Diversität verfügt. Aus Tabelle 4 wird ersichtlich, dass aus einer Sandboden-Anreicherungskultur sieben verschiedene Kolonietypen auf Agarplatten gewachsen waren. Dieses ist die höchste Zahl an Kolonieformen im Vergleich zu anderen Anreicherungskulturen. Andere Arbeiten haben ebenfalls gezeigt (Whitman et al., 1998), dass sandiger Boden oder Wüstenboden ähnlich dicht von prokaryotischen Zellen bewohnt sind wie z.B. Savannenboden oder Ackerboden.

Ein weiterer zentraler Punkt war die Entwicklung einer zuverlässigen Screening-Methode für klonierte Biotinbiosynthese-Operons. Die Suche nach Enzymaktivitäten, wie z.B. Amylasen, Amidasen, Chitinasen (Cottrell et al., 1999; Cottrell et al., 2000), Lipasen und 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase-Aktivität (Henne et al., 1999; Henne et al., 2000) und Sekundärmetaboliten mit antibakterieller Wirkung (Rondon et al., 2000) beruht in der Regel auf Plattentest-Verfahren. Die Genbanken wurden in geeignete Klonierungsstämme wie z.B. E. coli XL1-blue, DH5α oder DH10B (für den Genotyp s. die Tab. 1), angelegt. Bei diesem Ansatz trat das Problem auf, dass der Wirtsstamm Hintergrundenzymaktivitäten aufweisen konnte und es so zur Isolierung falsch-positiver Klone kommen konnte. Da die üblichen E. coli Klonierungsstämme biotinprototroph sind und eigene bio-Gene besitzen, konnten diese nicht eingesetzt werden. Außerdem sind die meisten Agar-Chargen mit Spuren von Biotin kontaminiert, was einen Plattentest nahezu ausschloss.

Um ein intaktes, funktionierendes Biotin-Operon in den Umwelt-Genbanken zu isolieren, war somit ein anderes Verfahren notwendig. In dieser Arbeit wurde eine $\Delta(gal-uvrB)$ *E. coli*-Mutante verwendet (ATCC 33767, Abb. 9), bei der das komplette *bio*-Operon deletiert war. Im Gegensatz zu bereits erwähnten Arbeiten, wo die Umwelt-Genbanken in üblichen Labor-Klonierungsstämmen hergestellt wurden
(Rondon et al., 2000; Henne et al., 1999), wurden hier die Anreicherungskultur-Genbanken in einer *E. coli bio*⁻-Deletionsmutante angelegt. Der Vorteil dieses Verfahrens war, dass die Hintergrundbiotinproduktion des Wirtsstammes ausgeschlossen werden konnte. Außerdem wurde das *Screening* von Pools rekombinanter Klone in flüssigem, biotinfreiem Mineralmedium durchgeführt, um so den Durchsatz zu erhöhen. In den Umwelt-Genbanken, die auf diese Weise konstruiert worden waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit sieben neue Biotinsynthese-Operons identifiziert und vier davon detailliert charakterisiert.

IV.3. Sequenzanalyse der bio-Cosmide

Ein zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit war es, Biotinbiosynthese-Operons zu identifizieren, zu sequenzieren und molekular zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden über 40 kb Umwelt-Genbanken-DNA sequenziert (s. Tab. 7). BLAST (NCBI) Vergleiche zeigten, dass die meisten ORFs Ählichkeit zu solchen, die bereits bei verschiedenen Gram-negativen Bakterien beschrieben worden waren, aufweisen. Darunter waren außer den vier bio-Operons auch hut-Gene, uvrB-Gen, moa-Gene, mod-Gene, verschiedene ABC-Transporter und ORFs, die für hypothetische Proteine in und anderen Gram-negativen Bakterien kodieren (Schaffer et al., 2001) (Abb. 35). Die Sequenzanalysen haben vier vollständige bio-Operons, ein hut-Operon, ein moa-Operon, und drei ABC-Transporter-Gencluster ergeben. Damit wurde gezeigt, dass die Anreicherungstechnik erfolgreich zur Isolierung von Operons und Genclustern aus Umweltproben angewendet werden konnte. In anderen Arbeiten (Henne et al., 1999; Henne et al., 2000; Rondon et al., 2000; Cottrell et al., 2000) wurden bisher einzelne Gene und deren Aktivitäten identifiziert. Die oben präsentierten Ergebnisse haben gezeigt, dass die hier entwickelte Kombination von Anreicherung und Anlegen von Genbanken für die Isolierung großer DNA-Fragmente aus Umweltproben und deren reproduzierbare Klonierung gut geeignet war.

Alle vier *bio*-Operons zeigten erhebliche Homologien (Identität) zu denen der *Enterobacteriaceae (E. coli, E. herbicola* und *S. marcescens*). Obwohl relativ hohe Ähnlichkeiten gefunden wurden (bis zu 92 % auf Proteinebene beim pCosHE2 *bio*-Operon und bis zu 80 % bei den anderen ORFs), können die Sequenzen nicht bestimmten Bakterien-Species zugeordnet werden. Die Tatsache, dass die

Genbanken in einer *E. coli bio*⁻-Mutante (ATCC 33767) angelegt wurden und nach funktionalen *bio*-Operons gesucht wurde, erklärt die hohen Homologien zu den *Enterobacteriaceae bio*-Genen. Insgesamt wurden ca. 71.000 rekombinante Klone nach einem biotinkomplementierenden Phänotyp (gegenüber der *E. coli* ATCC 33767-Mutante) gescreent. Davon haben sich nur sieben als *bio*⁺ erwiesen. Diese relativ niedrige Zahl könnte mit der Verwendung eines *E. coli*-Stamms als Wirt für die Genbanken erklärt werden. Möglicherweise wurden die zu den Gram-positiven Bakterien gehörenden *bio*-Gene mit dem hier gewählten *Screening* nicht identifiziert. Hierbei ist zu beachten, dass nicht bei allen Mikroorganismen die *bio*-Gene in einem, sondern wie bei *B. sphaericus* in zwei (Gloeckler et al., 1990) oder wie bei *Kurthia* sp. In drei (Kiyasu et al., 2001) entfernt voneinander liegenden Genclustern vorkommen (s. Abb. 4).

Die Proteinsequenzen aller Biotinbiosynthese-Proteine, deren ORFs auf den Cosmiden pCosHE1, pCosHE2, pCosAS1 und pCosFS1 gefunden worden waren, wurden mit dem DIALIGN 2.1 (BiBiServ, Bielefeld) Programm mit den entsprechenden Proteinen aus bereits bekannten Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien, Archaea und Eukaryonten (Hefe oder Arabidopsis thaliana) verglichen. Auf Grund dieser multiplen Vergleiche wurden sog. rooted Stammbäume für jedes der Proteine konstruiert (Phylip; DeSalle et al., 1994; Abb. 36). Ersichtlich wird, dass die auf den isolierten bio⁺Cosmiden kodierten Biotinsynthese-Enzyme Gramnegativen Bakterien zugeordnet werden können. Interessant ist, dass das auf pCosHE1 kodierte BioA-Protein im Stammbaum relativ weit vom E. herbicola BioA Protein entfernt liegt (Abb. 36A), obwohl nach dem BLASTP Vergleich mit der NCBI-Datenbank beide Sequenzen 85 % Identität über die gesamte Länge zeigen (Tab. 7). Das auf pCosAS1 kodierte BioC-Protein zeigte nach dem Vergleich mit der Datenbank (BLASTP, NCBI, Tab. 7) 56 % Identität zu E. herbicola BioC über die gesamte Länge des Proteins, es wird jedoch in dem Stammbaum (Abb. 36D) zu den E. coli und S. marcescens BioC-Proteinen zugeordnet. Somit ergab die Proteinanalyse mit Hilfe der Stammbäume keine festen Beweise, zu welchen Organismen die identifizierten *bio*-Gene gehören.



Abb. 35: Schematische Darstellung der sequenzierten ORFs auf vier als *bio*+ identifizierten Cosmiden. Die *bio*-Gene sind gelb markiert; *moaA-moaE*: Molybdäncofactor Biosynthese-Operon; *hutG-hutH*: Histidin Aufnahme Operon (*hut*-Operon); *elsB-elsC*; *elsD-elsF*; *elsG-elsH*: ABC-Transporter-Gencluster; *uvrB*-Gen: UV-Reparatur Protein B. Alle ORFs mit dementsprechenden homologen Genen und die *accession* Nummern aus der GenBank sind in Tabelle 7 aufgelistet.







Abb. 36: Stammbäume der Biotinbiosynthese-Proteine von 15 bis 17 Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien, Archaea und Eukaryonten (DIALIGN 2.1; Morgenstern, 2000 und Phylip 3.6; DeSalle et al., 1994). (A) BioA Protein; (B) BioB Protein; (C) BioF Protein; (D) BioC Protein; (E) BioD Protein. Abkürzungen: EC, *Escherichia coli*; EH, *Erwinia herbicola*; Smar, *Serratia marcescens*; Xrabd, *Xenorhabdus nematophila*; Psaer, *Pseudomonas aeruginosa*; Psflu, *Pseudomonas fluorescens*; Xifast, *Xylella fastidiosa*; HinfRd, *Haemophilus influenzae* Rd, D1-*bioD1*, D2-*bioD2*; Pasmil, *Pasteurella multocida*; Vich, *Vibrio cholerae*; Mloti, *Mezorhizobium loti*; NGR234, *Rhizobium* sp. NGR234; AtC58, *Agrobacterium tumefaciens* C58; PCC6803, *Synechocystis* sp. PCC6803; Kurthia, *Kurthia* sp., F1-*bioF1*, F2-*bioF2*; Cg, *Corynebacterium glutamicum*; Brflav, *Brevibacterium flavum*; MtubH37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; Bsub, *Bacillus subtilis*; Bsph, *Bacillus sphaericus*; Clac, *Clostridium acetobutylicum* ATCC824; Susol, *Sulfolobus solfataricus*; Arful, *Archaeoglobus fulgidus*; Mjan, *Methanococcus jannashii*; Metterm, *Methanothermobacter thermautotrophicus*; StrcolA3, *Streptomyces coelicolor* A3; Athal, *Arabidopsis thaliana*; Drad, *Deinococcus radiodurans*; Ricon, *Rickettsia conorii*.

Wie bereits erwähnt wurde, war auf dem Cosmid pCosAS1 ein hut-Operon (für Histidin-Aufnahme) identifiziert und sequenziert worden (Tab. 7, Abb. 35). Sequenzanalysen haben Homologien zu K. aerogenes und P. putida ergeben. Nachdem die Organisation der bereits bekannten hut-Operons (Hagen et al., 1975; Yoshida et al., 1995; Boylan and Bender, 1984; Allison and Phillips, 1990) mit dem Aufbau des pCosAS1-hut-Operons verglichen wurde, zeigte sich eine ungewöhnliche Anordnung der Gene. Das hut-Operon wurde stromabwärts von dem bioA-orfl-Cluster (der linke Arm des bio-Operons, Abb. 35) gefunden. Die Sequenzvergleiche sowohl auf Protein- als auch auf DNA-Ebene zeigten, dass die bio-Gene auf dem pCosAS1 ähnlich zu E. herbicola (Tab. 7), allerdings wurde bisher bei diesem Gramnegativen Bakterium kein hut-Operon beschrieben (Daten aus GenBank; IGwit; TIGR). Aus den Sequenzabgleichen ergab sich, dass die HutG- und HutC-Proteine 65 % bzw. 76 % identisch zu den entsprechenden K. aerogenes sind, dagegen zeigten HutH- und HutU-Proteinsequenzen 75 % bzw. 84 % Identität zu P. putida Hut-Proteine. Außerdem waren die hut-Gene aus der AS-Genbank anders geclustert (Abb. 37). Die Sequenzen wurden auf mehreren shotgun-Klonen identifiziert und somit wurde die Möglichkeit des Entstehens chimärer DNA (Amann et al., 1995), welche aus verschiedenen hut-Operons amplifiziert worden war, ausgeschlossen. Es ist somit anzunehmen, dass die bio- und hut-Operons auf dem pCosAS1-Cosmid aus einem bis jetzt noch nicht identifizierten Bakterium stammen.

Auf dem pCosFS1 Cosmid wurden *bio*-Gene gefunden, deren Transkriptionsprodukte ähnlich zu Produkten des *S. marcescens bio*-Operons waren (Abb. 35). Bis jetzt wurde bei diesem Bakterium kein *uvrB*-Gen in der genetischen Umgebung des *bio*-Operons identifiziert (Daten aus GenBank; IGwit und TIGR), wie es bei pCosFS1 der Fall war. Die DNA dieses Cosmids entstammte wohl ebenfalls der Anreicherung eines bisher unbekannten Mikroorganismus.

Es kann nur spekuliert werden, ob *bio*-Operons, die zu anderen phylogenetischen Gruppen gehören, mittels Verwendung verschiedener Wirtsstämme gefunden werden können. Ein alternativer Ansatz wäre die Konstruktion der Umwelt-Genbanken in einem mobilisierbaren Cosmid, wie beispielsweise pLAFR3.



Abb. 37: Organisation des *hut*-Operons in verschiedenen Gram-negativen und Grampositiven Bakterien. (A) *hut*-Operon auf dem pCosAS1-*bio*⁺Cosmid; die Translationen ORFs zeigten Ähnlichkeit zu *P. putida* und *K. aerogenes hut*-Genprodukten (s. Tab. 7); (B) *P. putida hut*-Operon; (C) *S. typhimurium hut*-Operon; (D) *K. aerogenes hut*-Operon; (E) *B. subtilis hut*-Operon. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtungen der Gene.

Beim bio^+ Cosmid pCosHE2, das für die Konstruktion weiterer Stämme ausgewählt wurde, wurde eine detaillierte Sequenzanalyse des Promotor-Operator-Bereiches des bio-Operons im Vergleich zum *E. coli* K12 *bio*-Operon durchgeführt. Dabei konnten innerhalb des für *E. coli* definierten Promotor-Operator-Bereiches von 108 bp (Ifuku et al., 1993) mit Hilfe von BLASTN keine Sequenzunterschiede zwischen den beiden *bio*-Operons festgestellt werden. Andererseits produzierte der Stamm mit dem pCosHE2-Cosmid bis zu 3800 ng/l Biotin, was verglichen mit *E. coli* K12 (47 ng/l) eine bis zu 80-fache Überproduktion darstellte. Um mehr über die Ursache für die erhöhte Produktivität des Stamms *E. coli* ATCC 33767/pCosHE2 zu erfahren, wurden die Proteinsequenzen der auf dem Cosmid kodierten Biotinbiosynthese-Enzyme näher untersucht. Es stellte sich heraus, dass bis zu 92 % Identität zu den entsprechenden *E. coli* Proteine vorlag. Zwischen den pCosHE2-kodierten Proteinsequenzen und den *E. coli*-Proteinen waren insgesamt 22 Aminosäuren unterschiedlich. Ob einzelne dieser Unterschiede von Bedeutung sind für die Biotinüberproduktion in mit pCosHE2 transformiertem *E. coli* bedarf der experimentellen Klärung.

IV.4. Konstruktion von biotinüberproduzierenden Bakterien

Die *bio*-Gene auf dem Cosmid pCosHE2 wurden als Bausteine für die Konstruktion biotinüberproduzierender Stämmen verwendet. Drei wichtige Argumente sprechen für eine Entwicklung von derartigen Stämmen. Hierunter fallen biotechnologische, ökologische und landwirtschaftliche Aspekte, die im Folgenden kurz erläutert werden.

• In den letzten Jahren wurde intensiv an der Etablierung einer mikrobiellen Biotinproduktion geforscht (Lonza AG, Schweiz; Roche Chemicals, Japan; Entcheva et al., 2001). Dieses Verfahren ist, im Gegensatz zur chemischen Synthese umweltfreundlich und benötigt nur niedrige Produktionskosten. Darüberhinaus wird die Emission von toxischen Abgasen vermindert. Ein Stamm für die Biotinproduktion könnte kostendeckend eingesetzt werden, sobald dieser eine Ausbeute von ca. 1 g Biotin pro Liter Kulturüberstand aufweisen würde (Shaw et al., 1999).

• Ein zweiter Grund, der für die Konstruktion von vitaminproduzierenden Stämmen spricht, ist deren Anwendung für Bioremediation. Viele Boden-Mikroorganismen sind nicht in der Lage, Biotin selber zu produzieren und sind darauf angewiesen, es aus der Umwelt aufzunehmen (beispielsweise aus Wurzelexudaten). Unter Biotin-limitierenden Bedingungen wird das Wachstum verlangsamt. Deswegen wären solche Bakterien vorteilhaft, die nicht Biotin-limitiert sind und dadurch einen Selektionsvorteil in der Natur haben. Diese verbesserten und zugleich hochspezialisierten Stämme könnten in kontaminierten (z.B. mit aromatischen Stoffen oder Trichlorethylen) Boden- oder Wasserhabitaten ausgebracht werden und dort unter Umständen besser wachsen (Keasling and Bang, 1998; Yee et al., 1998). Solche Mikroorganismen, die in der Lage sind Biotin zu produzieren und gleichzeitig Abbau-Wege besitzen, hätten Vorteile bei der Besiedlung solcher Habitate und würden somit zu einem schnellen Abbau von chemischen Substanzen führen.

Unter diesen ökologischen Aspekt fällt auch die Modifizierung mikrobieller Konsortien. Neuere Erkenntnisse zeigten, dass Biofilme einen erheblichen Teil der Umwelthabitate darstellen (Costerton et al., 1999; Wimpenny et al., 2000). Hierzu zählen die Rhizosphäre, die Oberflächen zwischen Wasser und sowohl künstlichen als auch natürlichen festen Phasen (Flemming and Wingender, 2001a; Flemming and Wingender, 2001b). Ein möglicher Ansatzpunkt in diese Richtung wäre die Konstruktion von biotinproduzierenden Stämmen mit verbesserter Wachstumscharakteristika.

• Ein anderes Argument, das für die Konstruktion von biotinüberproduzierenden Boden-Bakterien, insbesondere solcher, die in symbiotischen Interaktionen mit diversen Leguminosen leben, spricht, ist die Möglichkeit zur Biotin-Anreicherung im Pflanzengewebe. Pflanzen, die in der Lage sind, Biotin überzuproduzieren oder die Biotin aus symbiontischen Bakterien in erhöhter Menge erhalten, haben unter Umständen einen größeres wirtschaftliches Potential. Somit könnten beispielsweise die Kosten für das Zusetzen von Biotin in der Futtermittelindustrie erheblich gesenkt werden (Patton, 1995; Patton, 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um mit Hilfe der aus Umweltproben isolierten *bio*-Gene biotinüberproduzierende Stämme zu erhalten (Abb. 38).



Abb. 38: Schematische Darstellung der Anwendung von umweltisolierten *bio*-Genen. Als potenzielle Produktionsstämme kommen verschiedene Organismen wie *E. coli, K. planticola, Rhizobium* sp. und *C. glutamicum* in Frage. *Rhizobium* sp. ist als potenzieller Stamm geeignet beispielsweise für Bioremediation, Biomodifizierung oder Biotinproduktion in seinem natürlichen Habitat im Boden und in Symbiose mit Pflanzen dargestellt.

IV.4.1. Produktionsstämme und Produktionsraten

Bisher wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt, um die Biotinproduktion von Bakterien zu optimieren. Eine von diesen basierte auf der Kultivierung bakterieller Stämme, die gegen verschiedene Biotin- oder Threonin-Analoga (Ohsawa et al., 1989; Kanzaki et al., 1997) wie z.B. Acidomycin (ACM), 5-(2-Thienyl)-Valeriansäure (TVA), α -Methyl-Dethiobiotin (MeDTB) oder andere Mutagene, wie beispielsweise N-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidin (NTG; Kanzaki et al., 1997) resistent waren. In Tabelle 18 sind bisher patentierte biotinüberproduzierende Stämme und bei deren Herstellung eingesetzte Mutagene aufgelistet. Die andere Methode, Bakterien mit erhöhten Biotinproduktionsraten zu konstruieren, ist, einzelne *bio*-Gene oder unveränderte *bio*-Operons zu klonieren und homolog oder heterolog zu exprimieren.

In dieser Arbeit wurde ein alternativer Weg gewählt um Produktionsstämme zu konstruieren. Es wurden hoch effektive Biotinbiosynthesegene aus Umwelt-Genbanken isoliert und charakterisiert (s. Kapitel III.2 und III.3). Dabei wurde gezeigt, dass eines der gefundenen bio-Operons (das auf dem pCosHE2) zu besonders hoher Produktion führte und somit als Grundlage für die Konstruktion von biotinüberproduzierenden Bakterien geeignet war. Als potenzielle Wirte für die Expression wurden hier sowohl E. coli-Stämme als auch andere Gram-negative und Gram-positive Bakterien in Betracht gezogen (Tab. 14). Als Stämme mit potenzieller industrieller Bedeutung haben sich folgende herausgestellt: E. coli ATCC 33767, komplementiert mit einem pBSSK+-Derivat, welches ein unverändertes bio-Operon aus pCosHE2 trug (pPESKbio, Abb. 17); E. coli BM 4062, dessen Biotin-Phänotyp von einem pBBR1MCS-2-bio-Konstrukt (pPEBBRbio, Abb. 17) aufgehoben wurde; K. planticola, die nach der Transformation mit pPEBBRbio bis zu 200-fach höhere Produktion im Vergleich zu dem Wildtyp-Stamm (Abb. 23) zeigte. Aus den Abbildungen 11, 23 und Tabellen 6, 9, 11, 12 und 13 wird ersichtlich, dass das *bio*⁺Cosmid pCosHE2 und seine Derivate für eine Biotinüberproduktion geeignet zu sein scheinen. Nachdem die Gene umkloniert und überexprimiert worden waren, wurden Werte zwischen 0,2 und 3,5 mg/l Biotin im Überstand unter batch-Bedingungen ermittelt. In Fermenter unter fed-batch Bedingungen wurden sogar bis zu 7,1 mg/l Biotin produziert. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 19 mit den bereits bekannten Produktionsmengen von anderen Arbeiten vergleichend dargestellt. Es ist

daraus ersichtlich, dass die biotinüberproduzierenden Stämme, die in einige Arbeitsgruppen konstruiert wurden, bis zu 970 mg/l Biotin produzierten (Tab. 18 und 19). Jedoch nach einer genaueren Analyse wird es deutlich, dass nur die bio-Konstrukte von Shaw und Mitarbeitern (Shaw et al., 1999) und Sakurai et al. (1993b) (in Tabelle 18 in grau dargestellt) nach einem ähnlichen Konzept, nämlich die Klonierung eines nicht mutierten bio-Operons, entwickelt wurden. Bei den von Shaw entwickelten Konstrukten handelte es sich um ein E. coli bio-Operon, welches umstrukturiert und überexpemiert wurde. Das einzige vergleichbare bio-Konstrukt ist pBO3 (Birch et al., 1995; E. coli-wt unverändertes bio-Operon kloniert auf einem high copy Vektor), wobei aber nach der Expression in E. coli JM109 und Wachstum in Komplexmedium nur 0,03 mg/l gewonnen wurden. In der Arbeit von Sakurai wurde ein rekombinanter S. marcescens-Stamm ohne Anwendung von Mutagenen entwickelt. Dieser S. marcescens bio-Stamm produzierte 0,45 mg/l (in Tabelle 18 grau gekennzeichnet). Die Produktivitäten der in der hier vorliegenden Arbeit konstruierten Stämme zeigten, dass die rekombinanten *E. coli* ATCC 33767/pPESKbio und E. coli BM 4062/pPEBBRbio eine 2 bis 10-fach höhere Biotinkonzentration aufwiesen (2,3 mg/l bzw. 3,5 mg/l) als die E. coli-Stämme aus der Arbeit von Shaw et al. (0,03 mg/l bis 1,61 mg/l) und 4,9 bis 7,8-fach höher lagen als die Produktivität von S. marcescens (Tab. 18 und 19).

Hierbei muss bedacht werden, dass die Kultivierungsmedien nicht gleich waren. Die Wachstumsversuche und die Biotinproduktion wurden generell in Biotin-freiem Mineralmedium ohne Zugabe von Biotin durchgeführt, während die meisten Daten aus anderen Arbeitsgruppen bei Wachstum auf Komplexmedium gesammelt wurden (in Tabelle 18 mit * gekennzeichnet). In einigen Fällen versuchten die Autoren, die Produktionsraten mit Zugabe von Dethiobiotin oder anderen Vorläufern von Biotin zu erhöhen (Shaw et al., 1999; Ohsawa et al., 1989). Ein weiterer wesentlicher Unterschied muss hier erwähnt werden: die *bio*-Konstrukte in der vorliegenden Arbeit wurden in einen *E. coli* Δbio -Mutante exprimiert, während andere Gruppen (Shaw et al., 1999; Ohsawa et al., 1993) biotinprototrophe *E. coli* Stämme verwendeten.

Bakterium	Mutation des chrom. <i>bio-</i> Operons durch ¹	Ursprung des zusätzlichen <i>bio</i> -Operons ²	Mutation des zusätzlichen <i>bio</i> -Operons durch ³	Biotin im Überstand [mg/l]	Referenz
Agrobacterium/ RhizobiumHK4	-	E. coli-wt	-	110**	(Shaw et al., 1999)
B. sphaericus	wt	-	-	0,16#	(Ohsawa et al 1989)
B. sphaericus	wt	B. sphaericus	ACM+TVA	3,8-15#	(Ohsawa et
B. sphaericus	TVA	-	-	0,98#	(Yamada et al., 1983)
B. sphaericus	TVA; ACM	-	-	3,04#	(Yamada et al 1983)
B. sphaericus	TVA; ACM; TVA+ACM	-	-	5,35#	(Yamada et al., 1983)
B. subtilis	wt	-	-	0,01#	(Ohsawa et al 1989)
B. subtilis	wt	B. sphaericus	ACM+TVA	2-15#	(Ohsawa et al 1989)
B. subtilis	wt	B. subtilis	ACM+TVA integriert, starkes Promotor	0,125-1,57	(Bower et al., 1996b)
E. coli	wt	-	-	<0,01#	(Ohsawa et al 1989)
E. coli	wt	B. sphaericus	ACM+TVA	16#~	(Ohsawa et al., 1989)
E. coli	wt	E. coli	umkloniert	0,03-1,61*#	(Shaw et al., 1999)
E. coli	derepremiert	-	-	0,4*	(Ifuku et al., 1993)
E. coli	derepremiert; TVA+ACM	-	-	0,9-4,5*	(Ifuku et al., 1993)
E. coli	β-CD-A; NTG 6-ANA · β-HN	E. coli	ACM+TVA	160-970**	(Kanzaki et al., 1997)
E. coli	bioB ⁻	E. coli	TVA+ACM	3,1-11,1*	(Ifuku et al., 1993)
E. coli	wt	B. subtilis	ACM+TVA	0,01	(Bower et al., 1996b)
Kurthia sp.	wt	-	-	<0,001	(Hoshino et al., 1997)
Kurthia sp.	ACM+TVA	-	-	26,3	(Hoshino et
Kurthia sp.	ACM+TVA+ MeDTB	-	-	41,5-126	(Hoshino et al., 1997)

Tab. 18: Biotinproduktion durch verschiedene bisher patentierte Biotinüberproduktions

 Stämme und deren Mutterstämme.

Fortsetzung Tab. 18

S. marcescens	wt	-	-	< 0.001	(Sakurai et
				,	al 1993a)
C	ACM			2151	(Salarmai at
S. marcescens	ACM	-	-	2,1-3,1	(Sakural et
					al., 1993a)
S. marcescens	ACM; TVA	-	-	2,1-20	(Sakurai et
	,			,	al 1993a)
C managagagag	xx.t	C managagagag	wit	0.45	(Salaraj at
S. marcescens	wi	S. marcescens	wt	0,45	(Sakulai et
					al., 1993b)
S. marcescens	wt	S. marcescens	ACM	0,89	(Sakurai et
					al., 1993b)
S marcoscons	wt	S marcoscons	$\Delta C M \cdot T V \Delta$	18	(Sakurai et
5. marcescens	vv c	5. marcescens		1,0	(1 1002h)
		~			al., 1993b)
S. marcescens	ACM	S. marcescens	ACM	130	(Sakurai et
					al., 1993b)
S marcescens	$ACM \cdot TVA$	S marcescens	wt	92	(Sakurai et
S. mar ceseens		S. mai ceseens		2	(1003b)
G		G		200	al., 19930)
S. marcescens	ACM; IVA	S. marcescens	ACM	200	(Sakurai et
					al., 1993b)
S. meliloti	bioNMB	E. coli	wt	0.001	(Streit and
	Mutante			- 2	Phillips 1996)
	muunic				1 mmps, 1770)

*-Kultiviert in reichem Medium ; **-Kultiviert in Fermenter unter *fed-batch* Bedingungen; #: die Zellen wurden mit Zugabe von Vorläufern angezogen; ~: es wurde nur *bioB* überexprimiert; 6-ANA: 6-Aiminonicotinamid ACM: Acidomycin; β -HN: β -Hydroxynorvalin; TVA: 5-(2-Thienyl)-Valeriansäure; MeDTB: α -Methyl-Dethiobiotin; β -CD-A: β -Chloro-D-alanin; ¹: es sind die Mutationen im chromosomalen *bio*-Operon des Wirtsstammes aufgelistet; ²: es sind die Bakterien aufgelistet, aus welchen die *bio*-Gene isoliert worden sind; ³: hier sind die Mutationen in den klonierten *bio*-Gene aufgelistet.

Bakterium	Biotin im Überstand [mg/l]	Referenz	
Agrobacterium/RHK4	110**	(Shaw et al., 1999)	
B. sphaericus	0,1-15	(Ohsawa et al., 1989)	
B. subtilis	0,004-1,57	(Bower et al., 1996b)	
	0,01-15	(Ohsawa et al., 1989)	
E. coli	160-970**	(Kanzaki et al., 1997)	
	0,03-1,39*	(Shaw et al., 1999)	
	0,4-11,1*	(Ifuku et al., 1993)	
Kurthia sp.	0,001-126	(Hoshino et al., 1997)	
S. marcescens	18-200	(Sakurai et al., 1993b)	
Umwelt-isolierten bio-			
Cosmid	3,8.10 ⁻³	(Entcheva et al., 2001)	
Subkloniert in <i>E. coli birA</i> ⁻	3,5	Diese Arbeit	
in E. coli	2,2	Diese Arbeit	
in E. coli birA ⁻	7,1**	Diese Arbeit	
in K. planticola	0,2	Diese Arbeit	
in S. meliloti	4.10 ⁻³	Diese Arbeit	

*-Kultiviert in Komplexmedium; **-Kultiviert in Fermenter unter *fed-batch* Bedingungen. Bei allen überproduzierenden Stämmen handelt es sich um Bakterien, die gegen biotinanaloge Stoffe resistent waren oder zusätzlich mutierte *bio*-Gene trugen. Einzige Ausnahme waren die Stämme *E. coli* und *Agrobacterium/Rhizobium* HK4 im Rahmen der Arbeit von Shaw und Mitarbeitern (1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten mal umweltisolierte, natürlich hocheffiziente *bio*-Gene ohne genetische Manipulierung zur Konstruktion biotinüberproduzierender Bakterien verwendet. Dabei wurden Produktivitäten im mg/l-Messbereich ermittelt, welche den bereits beschriebenen Biotinproduktionsraten von mehrfach mutierten Industrie-Stämme entsprachen.

Neben *E. coli* wurde die Konstruktion von biotinüberproduzierenden Bakterien, die zu anderen Familien gehören, vorangetrieben. Hierzu zählten Bakterien aus der Gattungen *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* und *Corynebacterium*. Anschließend wurden sowohl stabile, biotinüberproduzierende *E. coli*-Stämme als auch rekombinante *K. planticola*- und *Sinorhizobium meliloti*-Biotinproduzenten konstruiert.

IV.4.2. Konstruktion rekombinanter, biotinproduzierender Rhizobium-Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von umweltisolierten *bio*-Genen solche *Rhizobium*-Stämme konstruiert, die in der Lage waren, Biotin zu produzieren und somit im Boden besser überlebten und die Pflanzen infizierten. Das *bio*-Operon auf pCosHE2 wurde unter der Wildtyp-Promotor Kontrolle in *S. meliloti* 1021 exprimiert und Rhizosphären-Experimente wurden mit solchen Stämmen durchgeführt. Die Daten aus diesen Experimenten bestätigten die, früher publizierte Ergebnisse (Streit et al., 1996), nämlich, dass *S. meliloti*-Stämme mit zusätzlichen *bio*-Genen verbesserte Besiedlung aufweisen (s. Abb. 31).

Ein weiterer Aspekt war die Verwendung der rekombinanten *bio*⁺Rhizobien für die Modifizierung einer Rhizosphäre. Hier wurden solche *S. meliloti*-Stämme verwendet, die *bio*-Operons unter der Kontrolle von wirtsspezifischen Promotoren, wie beispielsweise von den *nodD1*- und *nodD3*-Genen trugen. Es wurden Stämme konstruiert, die das *bio*-Operon oder die *bioB*- und *bioD*-Gene unter *nodD1*- bzw. *nodD3*-Promotorkontrolle zusätzlich haben. Bekanntermaßen befinden sich die *nodD1* und *nodD3*-Promotoren unter der Kontrolle von Flavonoiden und Isoflavone (Swanson et al., 1993; Gyorgypal et al., 1991; Dusha et al., 1999). Somit würden die *bio*-Gene unter bestimmten ökologischen Bedingungen, beispielsweise in dem Umfeld einer Rhizosphäre, angeschaltet. Demzufolge würde eine gezielte Expression der Gene in der Rhizosphäre gewährleistet. Erste Daten zeigten, dass *nodD1*- regulierte *bio*-Konsrukte einen bis zu 4-fach verbesserten Besiedlungseffekt aufwiesen. Dies deutete daraufhin, dass kontrollierbare *bio*-Konstrukte im Rahmen von Rhizosphäre-Experimenten als Beispiel für die Modifizierung eines mikrobiellen Konsortiums geeignet sind.

Untersuchungen zur Nutzung von Bakterien aus der Familie *Rhizobiaceae* als Wirte für eine Biotinüberproduktion haben ergeben, dass *S. meliloti*-Stämme, die das *E. coli bio*-Operon trugen, bis zu 1 μ g/l Biotin synthetisieren konnten (Streit and Phillips, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden *S. meliloti-bio*⁺Stämme mit einem umweltisolierten *bio*-Operon konstruiert, die in Mineralmedium zwischen 2,4 und 7 μ g/l Biotin produzieren. Diese Produktionsraten waren für eine biotechnologische Produktion eher als niedrig einzustufen. Andere Bakterien aus den *Rhizobiaceae*

wurden ebenfalls als Wirte getestet, wobei die Expression des *bio*-Operons in verschiedenen Rhizobien im Allgemeinen mit toxischen Effekten begleitet war. Weitere *bio*-Konstrukte, in denen die *bio*-Gene unter der Kontrolle von allgemein starken Promotoren wie Ptrp und Ptac oder wirtsspezifischen Promotoren wie *nodD1* und *nodD3* standen, führten in diversen Rhiziobien zur Zellprezipitation. Dies deutete daraufhin, dass regulatorische Probleme bei der Überexpression von Biotinbiosynthesegenen auftraten. Weitere Versuche in diese Richtung bestätigten die Vermutungen, dass Rhizobien, die Biotin überproduzierten, in geringerem Titer überleben konnten (s. III.3.2.3.2). In dieser Arbeit hat sich demzufolge die Familie *Rhizobiaceae* als nicht optimal geeignet für eine Biotinüberproduktion unter *batch* Bedingungen herausgestellt. Überraschend ist jedoch die Beobachtung, dass Lonza AG 110 mg/l Biotin in einem *Agrobacterium/Rhizobiun* HK4 Isolat produziert hat (Shaw et al., 1999).

IV.4.3. 2-D gelelektrophoretische Analyse und Sequenzvergleiche

Mit Hilfe von *Proteomics* wurden *S. meliloti* Stämme, die in der Zelle Biotin produzierten und solche, die Biotin aus den Medium aufnehmen, bezüglich der Genexpression verglichen. Vier Proteine aus dem *S. meliloti* 1021/pPEBBRbio-Stamm und ein Protein aus dem Wildtyp, die eine erhöhte Expression auf den 2D-Gelen aufwiesen, wurden mit MALDI-TOF analysiert.

Die ausführliche Analyse der Proteine in NCBI, ERGO und Sinorhizobium meliloti-[http://sequence.toulouse.inra.fr/meliloti] Datenbanken ergab interessante Informationen. Beispielsweise Protein "3" zeige in S. meliloti 1021 Homologien zu Proteinen aus der sog. "short chain dehydrogenase/reductase"und Oxidoreduktasen-Familie. Andere Proteine aus dieser Gruppe sind PhbB- und BdhA-Proteine. Diese zeigen wiederum Ähnlichkeiten zu dem hier identifizierten Protein "3" (Score von 317 und e-Wert von e⁻³⁰ für PhbB bzw. Score von 241 und e-Wert von 4e⁻²³ für BdhA). Wie aus früheren Arbeiten bekannt, wurde die Expression des *bdhA*-Gens (nimmt teil an der Poly-β-hydroxybuttersäure Abbau) durch erhöhte Biotinkonzentrationen gesteigert (Hofmann et al., 2000; Aneja and Charles, 1999). Die in dieser Arbeit präsentierten Beobachtungen (Tab. 17) bestätigen die bereits publizierten Daten. Bisher gibt es jedoch keine experimentelle Beweise auf Transkriptionsebene, die auf einer biotinabhängigen Expression anderer Proteine aus der o. a. Familie hinweisen.

Bei einem weiteren Protein (Nummer 5 in Abb. 30B), dessen Expression in Zellen von *S. meliloti* 1021-Wildtyp erhöht war, handelt es sich möglicherweise um ein bisher unbekanntes Protein, dessen Gen im Chemotaxis-Operon liegt (s. Tab. 17; *orf14*, [http://sequence.toulouse. inra.fr/meliloti]). Jedoch kann über die Funktion dieses Proteins nur spekuliert werden.

IV.5. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Technik der Kombination von Anreicherungskultur und Genbanken-Herstellung aus Umweltproben sollte in Zukunft weiter optimiert werden. Die auf Avidin-Zugabe basierte Anreicherung wurde hier für die Selektion hocheffektiver Biotinbiosynthesegene angewendet. Andere sinnvolle Anwendungen wären Anreicherungen in denen unterschiedliche mikrobielle Konsortien gewonnen werden, die in der Lage sind antibakterielle Wirkstoffe oder Enzyme für Polymer-Abbau zu bilden. Das Vektorsystem könnte auf den sog. *broad host range* Cosmiden basieren, um anschließend die Mobilisierung der Genbanken in verschiedene Bakterien durchführen zu können, oder auf den sog. BACs (*bacterial artificial chromosomes*), womit die Klonierung von DNA-Fragmenten größer als 40 kb erreicht werden könnte.

Die Umwelt-Genomik wird in Zukunft eine immer größere Rolle bei der Untersuchung verschiedener Habitate spielen. Neue bisher unbekannte Habitate sollten in Betracht gezogen werden, wie z.B. Saline, Thermalquellen und verschiedene Biofilme. Die Biofilme stellen ein großes genetische Reservoir dar und sind somit für die Konstruktion von Genbanken und Identifizierung von neuartigen Biotinbiosynthesewegen geeignet.

Für die Konstruktion von biotinüberproduzierenden Stämmen können weitere bio-Operons aus Umwelt-Genbanken isoliert werden, auch sollte eine zusätzliche Mutagenese der bio-Gene in Betracht gezogen werden. Eine möglicherweise gut geeigneter Mikroorganismus für Biotinüberproduktion ist Klebsiella planticola, wobei die Konstruktion einer Regulations-Mutante, ähnlich wie die birA-Mutante bei E. coli. denkbar und notwendig Die Optimierung wäre. der Kultivierungsbedingungen, wie beispielsweise durch Veränderungen von Medienzusätzen und pH sollte ein Ziel weiterer Versuche sein. Die Zugabe von bestimmten Biotin-Vorstufen ins Medium könnte die Biotinproduktivität steigern.

Erste Versuche mit Hilfe von 2-D gelelektrophoretischen Analysen Veränderungen in dem Proteinmuster von biotinproduzierenden Stämmen im Vergleich zu solchen, die mit externen Biotin gewachsen waren, aufzuspüren, haben erhebliche Unterschiede in der Genexpression gezeigt. Weitere 2-D Gel- und MALDI-TOF-Analysen, sowie unter Umständen N-terminales Ansequenzieren einiger Proteinspots aus *S. meliloti* 1021 könnten zusätzliche Hinweise für künftige Strategien zur Konstruktion von Biotin-Überproduzenten liefern.

V. Zusammenfassung

Hauptziel dieser Arbeit war die Isolierung von neuartigen Biotinbiosynthese-Operons (*bio*-Operons) aus Umweltproben und deren Anwendung für die Konstruktion von biotinüberproduzierenden Bakterien.

Es wurde eine Methode entwickelt, um große DNA-Fragmente reproduzierbar aus unterschiedlichen und zum Teil mit Huminsäuren kontaminierten Umweltproben zu klonieren. Dies ist mit Hilfe der Kombination einer mikrobiologischen Anreicherungstechnik und der Konstruktion von Genbanken erreicht worden. Dazu wurden Anreicherungskulturen mit Umweltproben inokuliert. Um bei der einen hohen Selektionsdruck auf biotinsynthetisierende Anreicherung Mikroorganismen zu erzeugen, wurde das Medium mit dem Biotin-bindenden Protein Avidin supplementiert. Auf diese Weise wurden mikrobielle Konsortien gewonnen, die signifikante Mengen an Biotin produzierten. Diese positive Selektion konnte sowohl mittels Bestimmung von Biotin in Kulturüberständen (zwischen 50 und 1.040 pg/ml/OD) als auch auf Ebene der DNA nachgewiesen werden.

Insgesamt wurden sieben Anreicherungskulturen mit Proben unterschiedlicher Herkunft angeimpft und zur Konstruktion von Cosmid-Genbanken genutzt. Die Cosmide trugen in der Regel Fragmente einer Größe von ca. 30 kb. Pro Genbank wurden zwischen 6.000 und 35.000 Klone generiert und auf das Vorhandensein von Biotinbiosynthese-Operons untersucht.

Dabei wurden sechs rekombinante Cosmide erhalten, die eine *E. coli bio*-Deletionsmutante komplementierten: pCosHE1, pCosHE2, pCosAS1, pCosAS2, pCosFS1 und pCosFS2. Klone mit diesen Cosmiden produzierten zwischen 42 pg/ml und 3.800 pg/ml Biotin in definiertem Medium in der stationären Wachstumsphase.

Die DNA-Sequenzanalyse von vier der isolierten *bio*-Cosmide zeigte, dass klassische Gram-negative *bio*-Operons auf den Cosmiden vorlagen. Zusätzlich wurden auf den *bio*-Cosmiden weitere Gene und andere Operons identifiziert, die nicht in unmittelbarem Zusammenhang zur Biotin-Biosynthese standen. Hierzu zählten beispielsweise Operons für die Histidinverwertung und die Molybdopterin Biosynthese. Hierdurch wurde belegt, dass die entwickelte Technik der Anreicherung in Kombination mit direktem Klonieren generell zur Isolierung von mikrobiellen Operons geeignet ist.

Die von den offenen Leserahmen der identifizierten *bio*-Operons abgeleiteten Proteinsequenzen zeigten zwischen 56 % und 92 % Identität zu korrespondierenden Proteinen der Biotinbiosynthese von *E. coli, E. herbicola* und *S. marcescens*. Trotz dieser signifikanten Ähnlichkeiten konnten die isolierten *bio*-Operons jedoch keinem bekannten bisher kultivierten Mikroorganismus zugeordnet werden.

Ein *E. coli*-Stamm mit dem *bio*-Cosmid pCosHE2 zeigte die höchsten Biotinproduktivität in definiertem Mineralmedium und wurde daher zur Stammkonstruktion eines Biotinüberproduzierers eingesetzt. Dabei wurden unterschiedliche Strategien verfolgt: (i) Mobilisierung des unveränderten *bio*-Operons aus pCosHE2 in *E. coli* und andere Mikroorganismen, (ii) Mobilisierung eines *bio*-Operons mit umgestellter Genanordnung unter der Kontrolle des *tac*, *trp*, *nodD1* und *nodD3* Promotoren in verschiedene Gram-negative und Gram-positive Bakterien, sowie (iii) Mobilisierung ausgewählter *bio*-Gene unter Kontrolle des *tac*, *trp*, *nodD1* und *nodD3* Promotoren in *S. meliloti* 1021.

Als Wirte für die unterschiedlichen Konstrukte wurden *Escherichia coli, Klebsiella planticola, Ralstonia eutropha, Rhizobium* spp., *Xanthomonas campestris, Agrobacterium tumefaciens* und *Corynebacterium glutamicum* ausgewählt. Dabei zeigten sich zum Teil sehr hohe Toxizitäten bei der Überexpression der *bio*-Gene. Insbesondere *Rhizobium* sp. NGR234, *A. tumefaciens, X. campestris* und *C. glutamicum* waren in ihrem Überleben stark eingeschränkt oder verloren die jeweiligen *bio*-Konstrukte.

Weitere Untersuchungen mittels 2-D gelelektrophoretischer Analyse und MALDI-TOF Massenspektroskopie zeigten, dass die Expression solcher Proteine, die im Speicherstoffeabbau beispielsweise von Poly-β-hydroxybuttersäure oder als ABC-Transporter eine Rolle spielen können, unter bestimmten Bedingungen verändert war.

Die Konstrukte pPESKbio (das unveränderte *bio*-Operon in pSK+) und pPEBBRbio (das unveränderte *bio*-Operon in pBBR1MCS-2) waren besonders geeignet für die Expression in *E. coli* und *K. planticola*. Dabei wurde unter Verwendung des pPESKbio-Konstruktes in *E. coli* eine maximale Produktion von 2,3 mg/l nach 24 Stunden in definierten Medium erzielt. Nach der Mobilisierung des pPEBBRbio-Konstruktes in *K. planticola* wurde bis zu 0,2 mg/l Biotin in der stationären Wachstumsphase gemessen.

Die Verwendung einer *E. coli* Regulatormutante als Wirt erzielte eine Ausbeute von 3,5 mg/l und eine Fermentation mit diesem Stamm in Mineralmedium in einem 3-Liter Fermenter resultierte in der Produktion von 7,1 mg/l/24 Std.

VI. Literaturverzeichnis

- Alexeev, D., Baxter, R.L., and Sawyer, L. (1994a). Mechanistic implications and family relationships from the structure of dethiobiotin synthetase. Structure 2, 1061-1072.
- Alexeev, D., Bury, S.M., Boys, C.W., Turner, M.A., Sawyer, L., Ramsey, A.J., Baxter, H.C., and Baxter, R.L. (1994b). Sequence and crystallization of *Escherichia coli* dethiobiotin synthetase, the penultimate enzyme of biotin biosynthesis. J Mol Biol 235, 774-776.
- Alexeev, D., Baxter, R.L., Smekal, O., and Sawyer, L. (1995). Substrate binding and carboxylation by dethiobiotin synthetase-a kinetic and X-ray study. Structure 3, 1207-1215.
- Alexeev, D., Alexeeva, M., Baxter, R.L., Campopiano, D.J., Webster, S.P., and Sawyer, L. (1998). The crystal structure of 8-amino-7-oxononanoate synthase: a bacterial PLP-dependent, acyl-CoA-condensing enzyme. J Mol Biol 284, 401-419.
- Allison, S.L., and Phillips, A.T. (1990). Nucleotide sequence of the gene encoding the repressor for the histidine utilization genes of *Pseudomonas putida*. J Bacteriol 172, 5470-5476.
- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 59, 143-169.
- Aneja, P., and Charles, T.C. (1999). Poly-3-hydroxybutyrate degradation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*: isolation and characterization of a gene encoding 3- hydroxybutyrate dehydrogenase. J Bacteriol 181, 849-857.
- Barker, D.F., and Campbell, A.M. (1980). Use of *bio-lac* fusion strains to study regulation of biotin biosynthesis in *Escherichia coli*. J Bacteriol 143, 789-800.
- **Barker, D.F., and Campbell, A.M.** (1981). The *birA* gene of *Escherichia coli* encodes a biotin holoenzyme synthetase. J Mol Biol **146**, 451-467.
- Berlyn, M.K. (1998). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 10: the traditional map. Microbiol Mol Biol Rev 62, 814-984.
- Birch, O., Brass, J., Fuhrmann, M., and Shaw, N. (1995). Biotechnological method of producing biotin. US Patent and trademark office Patent Application Number 411768.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. Electrophoresis 8, 93-99.

- Bower, S., Perkins, J.B., Yocum, R.R., Howitt, C.L., Rahaim, P., and Pero, J. (1996a). Cloning, sequencing, and characterization of the *Bacillus subtilis* biotin biosynthetic operon. J Bacteriol **178**, 4122-4130.
- Bower, S.G., Perkins, J.B., Yocum, R.R., and Pero, J.G. (1996b). Biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. US Patent and trademark office Patent Applicatin Number 676818.
- Boylan, S.A., and Bender, R.A. (1984). Genetic and physical maps of *Klebsiella aerogenes* genes for histidine utilization (*hut*). Mol Gen Genet 193, 99-103.
- Broughton, W.J., and Perret, X. (1999). Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. Curr Opin Plant Biol 2, 305-311.
- Brown, S.W., and Kamogawa, K. (1991). The production of biotin by genetically modified microorganisms. Biotechnol Genet Eng Rev 9, 295-326.
- Bruce, K.D., Osborn, A.M., Pearson, A.J., Strike, P., and Ritchie, D.A. (1995). Genetic diversity within *mer* genes directly amplified from communities of noncultivated soil and sediment bacteria. Mol Ecol 4, 605-612.
- **Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M.** (1987). XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA⁻* Escherichia coli strain with betagalactosidase selection. BioTechniques **5**, 345-381.
- Chang, Y.S., Wu, C.H., Chang, R.J., and Shiuan, D. (1994). Determination of biotin concentration by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. J Biochem Biophys Methods 29, 321-329.
- Cifuentes, A., Anton, J., Benlloch, S., Donnelly, A., Herbert, R.A., and Rodriguez-Valera, F. (2000). Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. Appl Environ Microbiol 66, 1715-1719.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284, 1318-1322.
- Cottrell, M.T., Moore, J.A., and Kirchman, D.L. (1999). Chitinases from uncultured marine microorganisms. Appl Environ Microbiol 65, 2553-2557.
- Cottrell, M.T., Wood, D.N., Yu, L., and Kirchman, D.L. (2000). Selected chitinase genes in cultured and uncultured marine bacteria in the alpha- and gamma-subclasses of the proteobacteria. Appl Environ Microbiol 66, 1195-1201.
- Cronan, J.E., Jr. (1989). The *E. coli bio* operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. Cell **58**, 427-429.
- Davey, M.E., and O'Toole G, A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 64, 847-867.

- **DeLong, E.F., Taylor, L.T., Marsh, T.L., and Preston, C.M.** (1999). Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. Appl Environ Microbiol **65**, 5554-5563.
- **DeMoll, E., and Shive, W.** (1986). Assay for Biotin in the presence of dethiobiotin with *Lactobacillus plantharum*. Analytical Biochemistry **158**, 55-58.
- DeSalle, R., Wray, C., and Absher, R. (1994). Computational problems in molecular systematics. Exs 69, 353-370.
- **Dojka, M.A., Harris, J.K., and Pace, N.R.** (2000). Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. Appl Environ Microbiol **66**, 1617-1621.
- **Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., and Rousselier, P.** (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol **51**, 925-932.
- Dunn, M.F., Araiza, G., Cevallos, M.A., and Mora, J. (1997). Regulation of pyruvate carboxylase in *Rhizobium etli*. FEMS Microbiol Lett **157**, 301-306.
- **Dusha, I., Austin, S., and Dixon, R.** (1999). The upstream region of the *nodD3* gene of *Sinorhizobium meliloti* carries enhancer sequences for the transcriptional activator NtrC. FEMS Microbiol Lett **179**, 491-499.
- Eder, W., Ludwig, W., and Huber, R. (1999). Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of kebrit deep, red Sea. Arch Microbiol 172, 213-218.
- Eisenberg, M.A., and Star, C. (1968). Synthesis of 7-oxo-8-aminopelargonic acid, a biotin vitamer, in cell-free extracts of *Escherichia coli* biotin auxotrophs. J Bacteriol **96**, 1291-1297.
- Eisenberg, M.A. (1985). Regulation of the biotin operon in *E. coli*. Ann N Y Acad Sci 447, 335-349.
- Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T., and Streit, W.R. (2001). Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. Appl Environ Microbiol 67, 89-99.
- Entcheva, P., D. A. Phillips, W. R. Streit. 2001. Functional analysis of *Rhizobium meliloti* strain 1021 genes involved in biotin biosynthesis and bradytrophic growth. Appl Environ Microbiol, eingereicht.
- Eschenfeldt, W.H., Stols, L., Rosenbaum, H., Khambatta, Z.S., Quaite-Randall, E., Wu, S., Kilgore, D.C., Trent, J.D., and Donnelly, M.I. (2001). Dna from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-d-gluconic acid reductases. Appl Environ Microbiol 67, 4206-4214.

- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2001a). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects. Water Sci Technol 43, 9-16.
- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2001b). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. Water Sci Technol 43, 1-8.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., and Simonet, P. (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. Appl Environ Microbiol 65, 5409-5420.
- Fuchs, G., and Kroeger, A. (1999). Selective culture methods, enrichment, and isolation are permanent tasks of microbiologists. In: Biology of the prokaryotes (Lengeler, J.W., Drews, G., and Schlegel, H.-G.). pp. 102-103; Thieme, Stuttgart, New York 1999.
- Gloeckler, R., Ohsawa, I., Speck, D., Ledoux, C., Bernard, S., Zinsius, M., Villeval, D., Kisou, T., Kamogawa, K., and Lemoine, Y. (1990). Cloning and characterization of the *Bacillus sphaericus* genes controlling the bioconversion of pimelate into dethiobiotin. Gene 87, 63-70.
- **Goldberg, M.W., and Sternbach, L.H.** (1949). US Patent and trademark office, 2,489,232-482,489,238.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., and Bailey, M.J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. Appl Environ Microbiol 66, 5488-5491.
- Gyorgypal, Z., Kiss, G.B., and Kondorosi, A. (1991). Transduction of plant signal molecules by the *Rhizobium* NodD proteins. Bioessays 13, 575-581.
- Hagen, D.C., Gerson, S.L., and Magasanik, B. (1975). Isolation of super-repressor mutants in the histidine utilization system of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 121, 583-593.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., and Goodman, R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem Biol 5, R245-249.
- Hashimoto-Gotoh, T., Kume, A., Masahashi, W., Takeshita, S., and Fukuda, A. (1986). Improved vector, pHSG664, for direct streptomycin-resistance selection: cDNA cloning with G:C-tailing procedure and subcloning of double-digest DNA fragments. Gene **41**, 125-128.
- Heinz, E.B., Phillips, D.A., and Streit, W.R. (1999). BioS, a biotin-induced, stationary-phase, and possible LysR-type regulator in *Sinorhizobium meliloti*. Mol Plant Microbe Interact **12**, 803-812.

- Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R.A., and Gottschalk, G. (1999). Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol 65, 3901-3907.
- Henne, A., Schmitz, R.A., Bomeke, M., Gottschalk, G., and Daniel, R. (2000). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol **66**, 3113-3116.
- Hofmann, K., Heinz, E.B., Charles, T.C., Hoppert, M., Liebl, W., and Streit, W.R. (2000). *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 *bioS* and *bdhA* gene transcriptions are both affected by biotin available in defined medium. FEMS Microbiol Lett 182, 41-44.
- Hohn, B. (1979). In vitro packaging of lambda and cosmid DNA. Methods Enzymol 68, 299-309.
- Hoshino, T., Noro, A., and Tazoe, M. (1997). Process for the production of dbiotin. US Patent and trademark office Patent Applicatin Number 833411.
- Ifuku, O., Haze, S., Kishimoto, J., and Yanagi, M. (1992). Biotin production by using recombinant DNA technology. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) Spec No, 263-266.
- Ifuku, O., Haze, S., Kishimoto, J., Koga, N., Yanagi, M., and Fukushima, S. (1993). Sequencing analysis of mutation points in the biotin operon of biotinoverproducing *Escherichia coli* mutants. Biosci Biotechnol Biochem 57, 760-765.
- Ifuku, O., Koga, N., Haze, S., Kishimoto, J., Arai, T., and Wachi, Y. (1995). Molecular analysis of growth inhibition caused by overexpression of the biotin operon in *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem **59**, 184-189.
- Johnsen, K., Enger, O., Jacobsen, C.S., Thirup, L., and Torsvik, V. (1999). Quantitative selective PCR of 16S ribosomal DNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas* spp. in soil hot spots. Appl Environ Microbiol **65**, 1786-1788.
- Kack, H., Sandmark, J., Gibson, K., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1999). Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. J Mol Biol **291**, 857-876.
- Kanzaki, N., Kawamoto, T., Matsui, J., Nakahama, K., and Ifuku, O. (1997). Microorganism resistant to threonine analogue and production of biotin. US Patent and trademark office Patent Application Number 793119.
- Keasling, J.D., and Bang, S.W. (1998). Recombinant DNA techniques for bioremediation and environmentally-friendly synthesis. Curr Opin Biotechnol 9, 135-140.

- Keswani, J., and Whitman, W.B. (2001). Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol 51, 667-678.
- Kiss, G.B., Vincze, E., Kalman, Z., Forrai, T., and Kondorosi, A. (1979). Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in Rhizobium meliloti. J. Gen. Microbiol. **113**, 105-118.
- Kiyasu, T., Nagahashi, Y., and Hoshino, T. (2001). Cloning and characterization of biotin biosynthetic genes of *Kurthia* sp. Gene 265, 103-113.
- Knowles, J.R. (1989). The mechanism of biotin-dependent enzymes. Annu Rev Biochem 58, 195-221.
- Kolmar, H., Friedrich, K., Pschorr, J., and Fritz, H.J. (1990). Hybrids of circular DNA single strands as intermediates in DNA cloning, sequence analysis and direct mutagenis. BioTechnique 2, 237-245.
- Kondorosi, E., Buire, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffmann, B., and Kondorosi, A. (1991). Involvement of the *syrM* and *nodD3* genes of *Rhizobium meliloti* in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the plant host. Mol Microbiol 5, 3035-3048.
- Köthe, M. (2000). Ein modulares Vektorsystem für genetische Untersuchungen in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, and Peterson, K.M. (1995). Four new derivatives of the broad-hostrange cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166, 175-176.
- Kuzuhara, H., Orui, H., and Emoto, S. (1970). Conversion of D-glucose to (+)desthiobiotin. Tetrahedron Lett 14, 1185-1188.
- Lee, N., Nielsen, P.H., Andreasen, K.H., Juretschko, S., Nielsen, J.L., Schleifer, K.H., and Wagner, M. (1999). Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. Appl Environ Microbiol 65, 1289-1297.
- Liebl, W., Sinskey, A.J., and Schleifer, K.H. (1992). Expression, secretion, and processing of staphylococcal nuclease by *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol 174, 1854-1861.
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U., and Schleifer, K.H. (1989). High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. FEMS Microbiol Lett **53**, 299-303.

- MacNeil, I.A., Tiong, C.L., Minor, C., August, P.R., Grossman, T.H., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., Phillips, T., Narula, S., Sundaramoorthi, R., Tyler, A., Aldredge, T., Long, H., Gilman, M., Holt, D., and Osburne, M.S. (2001). Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. J Mol Microbiol Biotechnol 3, 301-308.
- Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E., and Ausubel, F.M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. J Bacteriol **149**, 114-122.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L., and Ghiorse, W.C. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Appl Environ Microbiol 65, 4715-4724.
- More, M.I., Herrick, J.B., Silva, M.C., Ghiorse, W.C., and Madsen, E.L. (1994). Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. Appl Environ Microbiol **60**, 1572-1580.
- Morgenstern, B. (2000). A space-efficient algorithm for aligning large genomic sequences. Bioinformatics 16, 948-949.
- Nakano, Y., Yoshida, Y., Yamashita, Y., and Koga, T. (1995). Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors. Gene 162, 157-158.
- Nogales, B., Moore, E.R., Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R., and Timmis, K.N. (2001). Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. Appl Environ Microbiol 67, 1874-1884.
- Ogram, A., Sayler, G.S., and Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. J. Microbiol. Meth. 7, 57-66.
- Ohsawa, I., Speck, D., Kisou, T., Hayakawa, K., Zinsius, M., Gloeckler, R., Lemoine, Y., and Kamogawa, K. (1989). Cloning of the biotin synthetase gene from *Bacillus sphaericus* and expression in *Escherichia coli* and Bacilli. Gene 80, 39-48.
- O'Regan, M., Gloeckler, R., Bernard, S., Ledoux, C., Ohsawa, I., and Lemoine,
 Y. (1989). Nucleotide sequence of the *bioH* gene of *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res 17, 8004.
- **Ovreas, L., and Torsvik, V.V.** (1998). Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. Microb Ecol **36**, 303-315.
- Pace, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 276, 734-740.
- Pai, C.H. (1972). Mutant of *Escherichia coli* with derepressed levels of the biotin biosynthetic enzymes. J. Bacteriol. **112**, 1280-1287.

- **Patton, D.A.** (1995). Enhanced biotin biosynthesis in plant tissue. US Patent and trademark office **Patent Application Number 401068**.
- **Patton, D.A.** (1997). Transgenic plants having inceased biotin content. US Patent and trademark office **Patent Applicatin Number 846338**.
- Phillips, D.A., Joseph, C.M., Yang, G.P., Martinez-Romero, E., Sanborn, J.R., and Volpin, H. (1999). Identification of lumichrome as a sinorhizobium enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth [In Process Citation]. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 12275-12280.
- **Pueppke, S.G., and Broughton, W.J.** (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. Mol Plant Microbe Interact **12**, 293-318.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J., and Goodman, R.M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl Environ Microbiol 66, 2541-2547.
- **Rosado, A.S., Duarte, G.F., Seldin, L., and Van Elsas, J.D.** (1998). Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. Appl Environ Microbiol **64**, 2770-2779.
- Sakurai, N., Imai, Y., Masuda, M., Komatsubara, S., and Tosa, T. (1993a). Construction of a biotin-overproducing strain of *Serratia marcescens*. Appl Environ Microbiol **59**, 2857-2863.
- Sakurai, N., Imai, Y., Masuda, M., Komatsubara, S., and Tosa, T. (1993b). Molecular breeding of a biotin-hyperproducing *Serratia marcescens* strain. Appl Environ Microbiol **59**, 3225-3232.
- Sakurai, N., Akatsuka, H., Kawai, E., Imai, Y., and Komatsubara, S. (1996). Complete sequence and organization of the *Serratia marcescens* biotin operon. Microbiology 142 (Pt 11), 3295-3303.
- Sambrook, J., F., F.E., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laborativy manual. (New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor).
- Serebriiskii, I.G., Vassin, V.M., and Tsygankov, Y.D. (1996). Two new members of the *bio B* superfamily: cloning, sequencing and expression of *bio B* genes of *Methylobacillus flagellatum* and *Corynebacterium glutamicum*. Gene 175, 15-22.

- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Puhler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene 145, 69-73.
- Schaffer, A.A., Aravind, L., Madden, T.L., Shavirin, S., Spouge, J.L., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., and Altschul, S.F. (2001). Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. Nucleic Acids Res 29, 2994-3005.
- Schmitz, R.A., He, L., and Kustu, S. (1996). Iron is required to relieve inhibitory effects on NifL on transcriptional activation by NifA in *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol 178, 4679-4687.
- Shaw, N., Lehner, B., Fuhrmann, M., Kulla, H., Brass, J., Birch, O., Tinschert, A., Venetz, D., Venetz, V.V., Sanchez, J.C., Tonella, L., and Hochstrasser, D. (1999). Biotin production under limiting growth conditions by *Agrobacterium/Rhizobium* HK4 transformed with a modified *Escherichia coli bio* operon. J Ind Microbiol Biotechnol 22, 590-599.
- Seidler, R.J., Knittel, M.D., and Brown, C. (1975). Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. Appl Microbiol 29, 819-825.
- Seow, K.T., Meurer, G., Gerlitz, M., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C.R., and Davies, J. (1997). A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. J Bacteriol 179, 7360-7368.
- Shiuan, D., and Campbell, A. (1988). Transcriptional regulation and gene arrangement of *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Salmonella typhimurium* biotin operons. Gene 67, 203-211.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Bio/Technol. 1, 784-791.
- Slodki, M.E., and Cadmus, M.C. (1978). Production of microbial polysaccharides. Adv Appl Microbiol 23, 19-54.
- Spaink, H.P., Kondorosi, A., and Hooykaas, P.J.J. (1998). The *Rhizobiaceae*. (Dordrecht/Boston/London).
- Spring, S., Schulze, R., Overmann, J., and Schleifer, K. (2000). Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. FEMS Microbiol Rev 24, 573-590.

- Stafford, K. (1986). Continuous fermentation. In: Manual of industrial microbiology and biotechnology (Demain, A.L., and Solomon, N.). pp. 137-151; ASM Press, Washington, D. C. 1986.
- Streit, W., Bjourson, A.J., Cooper, J.E., and Werner, D. (1993). Application of subtraction hybridization for the development of a *Rhizobium legominosarum* biovar *phaseoli* and *Rhizobium tropici* group-specofic DNA-probe. FEMS Microbiology Ecology 13, 59-68.
- Streit, W.R., and Phillips, D.A. (1996). Recombinant *Rhizobium meliloti* strains with extra biotin synthesis capability. Appl Environ Microbiol **62**, 3333-3338.
- Streit, W.R., Joseph, C.M., and Phillips, D.A. (1996). Biotin and other watersoluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. Mol Plant Microbe Interact 9, 330-338.
- Stryer, L. (2000). Pentose phosphate pathway and gluconeogenesis. In: Biochemistry. pp 572-580. New York: W.H. Freeman and Co. 2000.
- Swanson, J.A., Mulligan, J.T., and Long, S.R. (1993). Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. Genetics **134**, 435-444.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. Appl Environ Microbiol 56, 782-787.
- Whiteley, A.S., and Bailey, M.J. (2000). Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. Appl Environ Microbiol 66, 2400-2407.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 6578-6583.
- Wimpenny, J., Manz, W., and Szewzyk, U. (2000). Heterogeneity in biofilms. FEMS Microbiol Rev 24, 661-671.
- Wu, C.H., Chen, H.Y., and Shiuan, D. (1996). Isolation and characterization of the *Erwinia herbicola bio* operon and the sequences of the *bioA* and *bioB* genes. Gene 174, 251-258.
- Yamada, H., Osakai, M., Tani, Y., and Izumi, Y. (1983). Biotin overproduction by biotin analog-resistant mutants of *Bacillus sphaericus*. Agric Biol Chem 47, 1011-1016.
- Yee, D.C., Chauhan, S., Yankelevich, E., Bystritskii, V.V., and Wood, T.K. (1998). Degradation of perchloroethylene and dichlorophenol by pulsed-electric discharge and bioremediation. Biotechnol Bioeng 59, 438-444.
- Yoshida, K., Sano, H., Seki, S., Oda, M., Fujimura, M., and Fujita, Y. (1995). Cloning and sequencing of a 29 kb region of the *Bacillus subtilis* genome containing the *hut* and *wapA* loci. Microbiology 141 (Pt 2), 337-343.

- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., and Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int J Syst Evol Microbiol 51, 89-103.
- Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol 62, 316-322.

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Liebl für die Überlassung des Themas und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Außerdem möchte ich ihm für seine freundliche Unterstützung in jeder Hinsicht und die hilfreichen Diskussionen danken.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. W. Streit für das interessante Thema, das er mir anvertraut hat, für die zahlreichen und kreativen Ideen, für seine Hilfe im Umgang mit diverser Software und seine Unterstützung bei der Teilnahme an internationalen Kursen. Darüber hinaus will ich ihm für seine Ratschläge im Lösen allgemeiner Probleme, die für mich als Ausländern alltäglich auftreten, danken. Außerdem danke ich ihm für die hilfreiche Kritik beim Lesen dieses Manuskriptes.

Herrn Prof. Dr. Gottschalk möchte ich besonderen Dank ausdrücken für sein offenes Ohr bei jeder Art von Problemen, sowohl wissenschaftlicher als auch administrativer Art.

Herrn Prof. Dr. Schlegel danke ich für sein "Tu was!", das mich zusätzlich motiviert hat.

Frau Dr. Ruth Schmitz danke ich für ihre wertvollen Ratschläge, die mir in schwierigen Momenten wieder auf die Beinen geholfen haben, sowie die Diskussionen über das Gerechte und Ungerechte im Leben.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Michael Hoppert für seine Hilfe bei der Präparation von elektronmikroskopischen Aufnahmen.

Die Kolegen im Lab. 44, Martin Armbrecht, Maike Rudolph und Kirsten Kerkhoff, möchte ich für die liebe Arbeitsatmosphäre "in dem kleinen Labor" danken und "den Leuten von drüben" (Labor 37), Elke Heinz, Jörg Kleine, Carsten Raasch, Meike Ballschmiter, Katrin Grage, Nina Fricke, Mladen Tzwetkov, Volker Hoffmann, Manuela Köthe, Karin Türk, Ole Fütterer, Christel Schmeißer, Catrin Weber, Birgit Veith danke ich für die nette Zusammenarbeit.

Ute Ludwig und Martin Armbrecht schulde ich besondern Dank für das gründliche und mehrfache Lesen dieses Manuskriptes und Verbesserungsvorschläge.

Martin verdient ein riesiges Dankeschön für seine 100 %-ige Hilfsbereitschaft in jeder Hinsicht und dass er immer für Gespräche aller Art offen war. Weiterhin danke ich Elke, Katrin und Nina für die wissenschaftlichen Diskussionen, die unsere "Haustierchen" *Rhizobium* oder *Coryne*- betrafen. Außerdem danke ich "meiner Diplomandin" Maike Rudolph für die Mitarbeit an dem Projekt und ihre Hilfe beim Klären der Frage "Ist er (*S. meliloti*) ... oder ist er nicht...?".

Den TAs in unserem Team, Ute Ludwig und Julia Busse gilt ein großer Dank für die Hilfe beim Lösen von Problemen aller Art. Vor allem Ute sei gedankt für das schnelle Besorgen von "Biotin-freien Glasswahren", ohne denen meine Forschung verunreinigt bliebe, und ihre Einsatzbereitschaft.

Ein Dankeschön auch an den "guten Geist" des Instituts Charlie Bertram und die anderen Mitarbeiter der Werkstatt Jürgen Steckel und Gerd Birke für die Hilfe bei allen technischen Problemen und Herrn Manfred Hellwig für die schnelle Reparatur unseres wichtigen Werkzeugs - die Pippeten - und die nette Hilfe im Kurs-Raum.

Schließlich möchte ich meiner Mutter ein riesiges Dankeschön sagen. Ohne ihre geistige und finanzielle Unterstützung meines Studiums, ohne den Glauben an mich in zahlreichen Höhen und Tiefen während all der Jahre, wäre es nie zur Anfertigung dieser Dissertation gekommen.
Lebenslauf

Name	Plamena Entcheva
Geburtsdatum	14.07.1974
Geburtsort	Gabrovo, Bulgarien

Schulausbildung

1981 bis 1989	Besuch der Grundschule in Sofia, Bulgarien
1989 bis 1992	Besuch des Slaveikov-Gymnasiums in Sofia, Bulgarien
Juni 1992 Abitu	r

Hochschulausbildung

Juli 1998	Prüfungen für die Einnahme an der "St. Kliment Ohridski"
	Universität, Sofia
Oktober 1998	Immatrikulation an der "St. Kliment Ohridski" Universität, Sofia,
	Studiengang Molekularbiologie
1995 bis 1997	Spezialisierung im Fach Mikrobiologie in der Abteilung für
	Allgemeine Mikrobiologie an der Biologischen Fakultät der
	Universität Sofia
Oktober 1996	Diplomarbeit in der Mikrolab-GmbH, Sofia unter der Leitung von
	Prof. Dr. MD G. Tersiiski in Kooperation mit dem Diagnostischen
	Labor des Medizinischen Instituts, Sofia und dem Anaeroben
	Diagnostischen Labor des Instituts für Infektions- und Parasiten-
	Krankheiten, Sofia
Juli 1997	Öffentlich Verteidigung der Diplomarbeit mit dem Titel:
	"Vergleichende Studien zwischen der Gram-Färbung und anderen
	nicht-mikroskopischen Methoden zur Unterscheidung der Gram-
	Reaktion von Mikroorganismen mit medizinischer Bedeutung" und
	Abschluss des Studiums mit Master Degree in Molecularbiology
September 1997	Teilnahme an "Environmental Biotechnology"-TEMPUS Projekt
	finanziert von der EU
März 1998	Diplomarbeit an der Universität-Göttingen im Rahmen des TEMUS
	Projektes im Labor von Prof. Dr. B. Bowien
September 1998	Öffentliche Verteidigung der Diplomarbeit mit dem Titel:
	"Karbonische Anhydrase von Ralstonia eutropha H16 und
	Escherichia coli: Klonierung und Expression von can- und yadF-
	Genen" und Abschuss mit zweiter Master Degree in "Environmental
	Biotechnology"
Oktober 1998	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden
	Dissertation