



PEPTIDYL-PROLYL *CIS/TRANS* ISOMERASEN IN  
*STREPTOMYCES LIVIDANS*

HERSTELLUNG VON KNOCKOUT-MUTANTEN DER CYCLOPHILINE A1  
UND A2 DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von

Katharina Strube  
aus Glashütten

Frankfurt am Main, 2007

WISSENSCHAFT IST WIE SEX.  
MANCHMAL KOMMT ETWAS SINNVOLLES DABEI RAUS;  
DAS IST ABER NICHT DER GRUND, WARUM WIR ES TUN.

*Richard P. Feynman, 1918-1988*  
*Physiker und Nobelpreisträger*

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. W. Engels im Rahmen des EU-Projekts QLK3-2000-00122, StrepSec in der Zeit von November 2001 bis Dezember 2005 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. J. W. Engels danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung und die sehr guten experimentellen Bedingungen. Durch seine stetige Diskussionsbereitschaft hat er mit seinen Kenntnissen und Erfahrungen Einfluss auf diese Arbeit genommen. Dankbar schätzte ich auch die gewährte akademische Freiheit in dieser Zeit.

Weiterhin danke ich allen, die direkt oder indirekt zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danken möchte ich:

- Ewa Rheinberger für ihre Hilfsbereitschaft in allen organisatorischen Fragen;
- Beate Conrady für die Synthese und Aufreinigung der Primer;
- Rainer Schmitt für seine stete Hilfsbereitschaft;
- Hannelore Brill und Ilona Pries für die Messungen der Massenspektren;
- Meinen Laborkollegen Sigeng Han, Alma Sokocevic, Bettine Boltres und Ismail Hassani für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Diskussionsbereitschaft;
- Meinen Kolleginnen Kerstin Jahn-Hofmann und Aleksandra Zivkovic für die fachübergreifenden anregenden Diskussionen;
- Meinen Kommilitonen Tanja Mittag, Susanne Schrodtr, Peter Lamken, Matthias Hofacker und Christina Fischer für die gemeinsame Studien- und Promotionszeit und den daraus entstandenen Freundschaften;
- Meinen „Praktikantinnen“ Anke Reining und Juliane Seufer für die freundschaftlichen Gespräche;
- Allen nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre;
  
- Meinen Eltern und Schwiegereltern für die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft in der Betreuung meines Sohnes.
- Meinem Mann und meinem Sohn für ihre liebevolle Unterstützung, unendliche Geduld und bedingungslose Liebe. Danke!

# INHALTSVERZEICHNIS

1..EINLEITUNG .....	1
1.1. STREPTOMYCETEN.....	1
1.1.1. ALLGEMEIN .....	1
1.1.2. LEBENSZYKLUS .....	3
1.1.3. <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> UND <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i> .....	4
1.2. PEPTIDYL-PROLYL <i>CIS/TRANS</i> ISOMERASEN .....	9
1.2.1. DIE PEPTID-BINDUNG.....	9
1.2.2. DIE XAA-PRO-PEPTIDBINDUNG .....	10
1.2.3. PEPTIDYL-PROLYL <i>CIS/TRANS</i> ISOMERASEN .....	11
1.2.3.1. FK506-BINDENDE PROTEINE .....	13
1.2.3.2. CYCLOPHILINE .....	15
1.2.3.3. PARVULINE.....	17
1.3. HOMOLOGE REKOMBINATION .....	20
1.3.1. ALLGEMEIN .....	20
1.3.2. HERSTELLUNG VON KNOCKOUT-MUTANTEN IN <i>STREPTOMYCES</i> .....	24
1.3.3. TEMPERATURSENSITIVE VEKTOREN .....	28
2. AUFGABENSTELLUNG .....	30
3. MATERIAL UND METHODEN .....	31
3.1. GERÄTE .....	31
3.2. CHEMIKALIEN.....	32
3.3. ENZYME UND MARKER.....	34
3.4. STÄMME.....	35
3.5. PLASMIDE.....	36
3.6. PRIMER.....	38
3.7. PUFFER UND LÖSUNGEN.....	40
3.7.1. PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR ISOLIERUNG PLASMIDISCHER DNA .....	40
3.7.2. PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR PRÄZIPITATION VON DNA.....	41
3.7.3. PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR AGAROSE GELELEKTROPHORESE .....	41

3.7.4. PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR BLAU-WEIß-SELEKTION .....	42
3.7.5. PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR PROTOPLASTENPRÄPARATION .....	42
3.7.6. PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR TRANSFORMATION IN <i>S. LIVIDANS</i> .....	43
3.7.7. PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR PCR .....	44
3.7.8. PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i> .....	44
3.7.9. PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR HERSTELLUNG KOMPETENTER <i>E. COLI</i> .....	44
3.7.10. SONSTIGE PUFFER UND LÖSUNGEN.....	45
3.8. MEDIEN FÜR DIE ANZUCHT VON <i>E. COLI</i> .....	45
3.9. MEDIEN FÜR DIE ANZUCHT VON <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i> .....	46
3.9.1. NÄHRMEDIEN ZUR TRANSFORMATION VON PROTOPLASTEN .....	46
3.9.2. NÄHRMEDIEN ZUR SPORENBILDUNG UND FÜR SCHNELLES WACHSTUM.....	47
3.9.3. NÄHRMEDIUM ZUR BESTIMMUNG DES SPORENTITERS.....	48
3.9.4. NÄHRMEDIUM ZUR VORKULTIVIERUNG .....	48
3.9.5. NÄHRMEDIUM ZUR PRÄPARATION VON PROTOPLASTEN.....	48
3.9.6. NÄHRMEDIUM ZUR ANZUCHT.....	49
3.9.7. NÄHRMEDIUM ZUR ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA.....	50
3.10. ANZUCHTBEDINGUNGEN UND STAMMHALTUNG FÜR <i>E. COLI</i> .....	50
3.10.1. STAMMHALTUNG .....	50
3.10.2. TRANSFORMATION MIT PLASMIDEN BZW. LIGATIONSANSÄTZEN.....	51
3.10.3. ÜBER-NACHT-KULTUREN.....	51
3.10.4. PRÄPARATION VON KOMPETENTEN ZELLEN NACH DER $CaCl_2$ -METHODE ..	51
3.10.4.1. ANZUCHT .....	51
3.10.4.2. PRÄPARATION.....	52
3.10.5. BESTIMMUNG DER TRANSFORMATIONSKOMPETENZ.....	52
3.10.6. ISOLIERUNG PLASMIDISCHER DNA .....	52
3.10.6.1. PLASMIDISOLIERUNG .....	52
3.10.6.2. PLASMIDISOLIERUNG MIT DEM QIAPREP <sup>®</sup> SPIN MINIPREP KIT .....	53
3.10.6.3. PLASMIDISOLIERUNG MIT DEM NUCLOSPIN <sup>®</sup> PLASMID VON MACHERY- NAGEL.....	53
3.10.7. BLAU/WEIß-SELEKTION / pGEMT-EASY-SYSTEM .....	54
3.11. ANZUCHTBEDINGUNGEN UND STAMMHALTUNG FÜR <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i> ..	56
3.11.1. STAMMHALTUNG .....	56
3.11.2. ANIMPFFEN VON KULTUREN.....	56

3.11.3. ANZUCHT VON VORKULTUREN.....	56
3.11.4. ANZUCHT VON KULTUREN ZUR ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA .....	56
3.11.4.1. AUS VORKULTUREN .....	56
3.11.4.2. VON TRANSFORMATIONSPLATTEN .....	57
3.11.4.3. ANZUCHT MIT SPORENSUSPENSION .....	57
3.11.5. HERSTELLUNG VON SPORENSUSPENSION .....	57
3.11.5.1. ANIMPFEN MIT EINER VORHANDENEN SPORENSUSPENSION.....	57
3.11.5.2. ANIMPFEN MIT PROTOPLASTEN .....	57
3.11.5.3. ANIMPFEN MIT VORKULTUREN .....	57
3.11.5.4. SPORENERNTE .....	57
3.11.5.5. BESTIMMUNG DES SPORENTITERS.....	58
3.11.6. PROTOPLASTENPRÄPARATION.....	58
3.11.6.1. ANZUCHT .....	58
3.11.6.2. PROTOPLASTENERNTE .....	58
3.11.6.3. TRANSFORMATION VON PROTOPLASTEN .....	59
3.11.6.4. BESTIMMUNG DER TRANSFORMATIONSKOMPETENZ.....	59
3.11.7. ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i> .....	59
3.11.7.1. STANDARDMETHODE .....	59
3.11.7.2. MITTELS QIAGEN® MINIPREP KIT .....	60
3.11.8. TRANSFORMATION UND INITIIERUNG DER HOMOLOGEN REKOMBINATION...61	61
3.11.8.1. TRANSFORMATION DER KNOCK-OUT-VEKTOREN .....	61
3.11.8.2. ÜBERIMPFEN AUF R2-PLATTEN .....	61
3.11.8.3. HERSTELLUNG EINER SPORENSUSPENSION.....	61
3.11.8.4. SPORENERNTE .....	61
3.11.8.5. STIMULIERUNG DER HOMOLOGEN REKOMBINATION.....	62
3.12. MOLEKULARGENETISCHE METHODEN .....	62
3.12.1. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE .....	62
3.12.1.1. TRENNBEDINGUNGEN .....	62
3.12.1.2. DETEKTION.....	62
3.12.1.3. REISOLATION.....	63
3.12.2. PAGE-GELELEKTROPHORESE .....	64
3.12.3. METHODEN ZUR REINIGUNG UND KONZENTRATION VON DNA .....	65
3.12.3.1. PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION .....	65
3.12.3.2. ALKOHOL-PRÄZIPITATION .....	65

3.12.3.3. ETHANOL-PRÄZIPITATION .....	65
3.12.3.4. ISOPROPANOL-PRÄZIPITATION .....	65
3.12.3.5. REINIGUNG VON ANSÄTZEN NACH ENZYMATISCHER REAKTION .....	66
3.12.4. DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG .....	66
3.12.4.1. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG MITTELS $A_{260}$ .....	66
3.12.4.2. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG ÜBER AGAROSEGELE .....	67
3.12.5. POLYMERASEKETTENREAKTION .....	67
3.12.6. PRIMERSYNTHESE .....	69
3.12.7. DNA-MANIPULATION .....	69
3.12.7.1. RESTRIKTION .....	69
3.12.7.2. BLUNT ENDING – BEHANDLUNG MIT T4-DNA-POLYERMASE .....	69
3.12.7.3. BLUNT ENDING – BEHANDLUNG MIT KLENOW-FRAGMENT DER DNA- POLYMERASE I .....	70
3.12.7.4. BEHANDLUNG MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE .....	70
3.12.7.5. A-TAILING .....	71
3.12.7.6. BEHANDLUNG MIT T4-POLYNUKLEOTID-KINASE .....	71
3.12.7.7. LIGATION .....	72
3.13. BIOCHEMISCHE METHODEN .....	73
3.13.1. $Ni^{2+}$ -NTA-SÄULENCHROMATOGRAPHIE .....	73
3.13.2. AKTIVITÄTSTEST .....	73
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	75
4.1. ALLGEMEIN .....	75
4.2. IDENTIFIZIERUNG VON CYP A1 UND CYP A2 .....	76
4.2.1. DAS PSEUDOGEN .....	76
4.2.2. CYCLOPHILIN A1 (CYP A1) .....	76
4.2.3. CYCLOPHILIN A2 (CYP A2) .....	77
4.3. ISOLIERUNG VON CYP A1 UND CYP A2 .....	79
4.3.1. ÜBEREXPRESSION IN PQE30 .....	79
4.3.2. SEQUENZIERUNG DER CYCLOPHILINE .....	81
4.4. CHARAKTERISIERUNG VON CYP A1 UND CYP A2 .....	84
4.4.1. AKTIVITÄTSTEST .....	84
4.5. KLONIERUNG DER KNOCKOUT-MUTANTEN $\Delta$ CYP A1 UND $\Delta$ CYP A2 .....	86
4.5.1. ALLGEMEIN .....	86

4.5.2. OPTIMIERUNG DER PCR.....	86
4.5.2.1. ALLGEMEIN.....	86
4.5.2.2. DER EINSATZ VON CO-SOLVENT .....	88
4.5.2.3. DIE TEMPLATE-DNA .....	88
4.5.2.4. DIE ANNEALING-TEMPERATUR .....	88
4.5.2.5. DIE PRIMERWAHL.....	90
4.5.2.6. DIE DENATURIERUNGSZEIT BZW. HOT-START-EXPERIMENTE.....	91
4.5.2.7. DIE PCR-PROGRAMME .....	92
4.5.3. KLONIERUNG IN PGEMT-EASY .....	93
4.5.3.1. A-TAILING .....	93
4.5.3.2. LIGATION UND AUSWAHL MITTELS BLAU-WEIß-SELEKTION.....	93
4.5.4. SEQUENZIERUNG .....	96
4.5.5. CYP A1 – STRATEGIE I.....	97
4.5.6. CYP A1 – STRATEGIE II.....	101
4.5.7. CYP A1 – STRATEGIE III.....	105
4.5.8. CYP A2 – STRATEGIE I.....	112
4.5.9. CYP A2 – STRATEGIE II.....	114
5. ZUSAMMENFASSUNG .....	125
5.1. ALLGEMEIN .....	125
5.2. CYCLOPHILIN A1 .....	125
5.3. CYCLOPHILIN A2 .....	128
6. LITERATURVERZEICHNIS .....	131
7. ANHANG.....	153
7.1. PLASMIDKARTEN .....	1153
7.1.1. PGEMT-CYP A1 .....	153
7.1.2. PGEMT-CYP A2 .....	153
7.1.3. PQECYP A1 .....	154
7.1.4. PQECYP A2 .....	154
7.1.5. PLASMIDE ZU CYP A1 – STRATEGIE II .....	155
7.1.5.1. PGEMT750 .....	155

7.1.5.2. PGEMT334 .....	155
7.1.5.3. PGEMT1052 .....	156
7.1.6. PLASMIDE ZU CYP A1 – STRATEGIE III .....	157
7.1.6.1. PGEMT2101 .....	157
7.1.6.2. PUC2101 .....	157
7.1.6.3. PUC $\Delta$ CYP A1(III) .....	158
7.1.7. PLASMIDE ZU CYP A2 – STRATEGIE II .....	159
7.1.7.1. PGEMT442 .....	159
7.1.7.2. PGEMT1052 .....	159
7.1.7.3. PGEMT1192 .....	160
7.1.7.4. PUC1192 .....	160
7.1.7.5. PUC442+1052 .....	161
7.1.7.6. PUC442+105APR2 .....	161
7.1.7.7. PUC $\Delta$ CYP A2(II) .....	162
7.1.8. KNOCK-OUT-KONSTRUKT IN PGM160 .....	163
7.1.8.1. PGM $\Delta$ CYP A1 .....	163
7.1.8.2. PGM $\Delta$ CYP A2 .....	164
7.2. ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNG .....	165
7.2.1. CYP A1 .....	165
7.2.1.1. PGEMTCYP A1 FORWARD .....	165
7.2.1.2. PGEMTCYP A1 REVERSE .....	165
7.2.2. CYP A2 .....	166
7.2.2.1. PGEMT442 FORWARD .....	166
7.2.2.2. PGEMT442 REVERSE .....	166
7.2.2.3. PGEMT1052 FORWARD .....	167
7.2.2.4. PGEMT1052 REVERSE .....	167
7.2.2.5. PGEMT1192 FORWARD .....	168
7.2.2.6. PGEMT1192 REVERSE .....	168
8. ABKÜRZUNGEN .....	169
9. LEBENS LAUF .....	172

# I. EINLEITUNG

## 1.1 STREPTOMYCETEN

### 1.1.1 ALLGEMEIN

*Streptomyces* spp. sind gram-positive, filamentös wachsende Bakterien, die überwiegend in Böden (ANNE et al. 1993) vorkommen. Im Allgemein wachsen sie obligat mesophil und aerob in einer eher trockenen Umgebung. Sie gehören zu der Ordnung der Actinomyceten und sind fast ausnahmslos apathogen. Einzig bekannt ist die EAA, die exogene-allergische Alveolitis, ein allergische Reaktion der Alveolen in den Lungen, hervorgerufen in seltenen Fällen durch *Streptomyces albus* und *Streptomyces olivaceus* (KUTZNER et al. 1993). Charakteristisch für diese Ordnung ist der hohe GC-Gehalt der DNA, als auch ihr überwiegend mycelartiges Wachstum.

Zunächst wurden die Streptomyceten nach ihrer Morphologie und ihrer Biochemie charakterisiert, später dann mittels physiologischen Tests (BULL et al. 1992) Serologische Methoden (RIDELL et al. 1986) und Protein-Profilung (OCHI 1995) wurden ebenso zur Klassifikation herangezogen. Die Anwendung von genetischen Methoden bestätigte die phenotypische Klassifikation, jedoch kamen auch neue Informationen ans Licht, die zu neuen Erkenntnissen führen (ANDERSON et al. 2001).



Abb. 1.1: *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Sanger Institut, Norwich, Großbritannien)

Streptomyceten sind weit verbreitet und verleihen dem Boden durch ihr Stoffwechselprodukt Geosmin (1,10-Dimethyl-9-Decalol) den typischen Erdgeruch. Ihre Bedeutung haben die Streptomyceten seit den 1950er Jahren vor allem ihrer Produktion von einer Vielzahl an Antibiotika und anderen Sekundärmetaboliten zu verdanken. Streptomyceten synthetisieren insgesamt mehr als zwei Drittel aller biologisch aktiven Substanzen.

Sekundärmetabolite findet man häufig bei Bakterien wie *Streptomyces*, die einer morphologischen Differenzierung unterliegen. Zu den Sekundärmetaboliten gehören auch zahlreiche Pigmente. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *Streptomyces lividans* TK 24 entwickelt unter Lichteinfluss aromatische  $\beta$ -Carotinoide (NAKANO et al. 2000). Neben Sekundärmetaboliten produzieren Streptomyceten eine Anzahl an hydrolytischen Enzymen u. a. Proteasen, Cellulasen, Amylasen, Chitinasen, Lysozyme und Xylanasen, die meist sekretiert werden. Streptomyceten nehmen daher eine wichtige Rolle in der Remineralisierung des Bodens im natürlichen Stoffwechselkreislauf ein. Sie sind aufgrund der sekretierten Enzyme in der Lage auch schwer abbaubare Substanzen, wie z.B. Lignin zu verwerten.

45-55% der bekannten Antibiotika werden von Streptomyceten produziert (DEMAIN 1999, LAZZARINI et al. 2000). Man findet ein weites Spektrum an biologischer Aktivität. U. a. wirken von Streptomyceten hergestellte Antibiotika antibakteriell (z.B. Streptomycin (EGAN et al. 1998)), antiviral (z.B. Tunicamycin, antifungal (z.B. Rapamycin (VEZINA et al. 1975)), antitumoral (z.B. Antracycline (FUJII et al. 1997)), antiparasitär (z.B. Avermectin (BURG et al. 1979)), immunsuppressiv (z.B. Rapamycin (VEZINA et al. 1975)), Enzym inhibitorisch (z.B. Clavulansäure) und diabetogen (z.B. Streptozotocin (HERR et al. 1967)).

Die meisten Streptomyceten weisen eine Restriktionsbarriere (ALVAREZ et al. 1993) und einen hohen Proteasegehalt (BINNIE et al. 1997) auf, der beim Einsatz von Streptomyceten als Wirtsorganismus für die rekombinate Produktion von Proteinen ein Hindernis darstellt. Eine besondere Rolle in der homologen, als auch heterologen Proteinexpression kommt dem Stamm *Streptomyces lividans* 66 (TAKANO et al. 1995) und seinen näheren Verwandten *Streptomyces lividans* TK 23 und *Streptomyces lividans* TK 24 zu. Dieser Stamm hat im Gegensatz zu den meisten Streptomyceten den Vorteil, dass er keine Restriktionsbarriere besitzt. Weiterhin exprimiert dieser Stamm nur sehr wenig Proteasen, so dass eine homologe bzw. heterologe

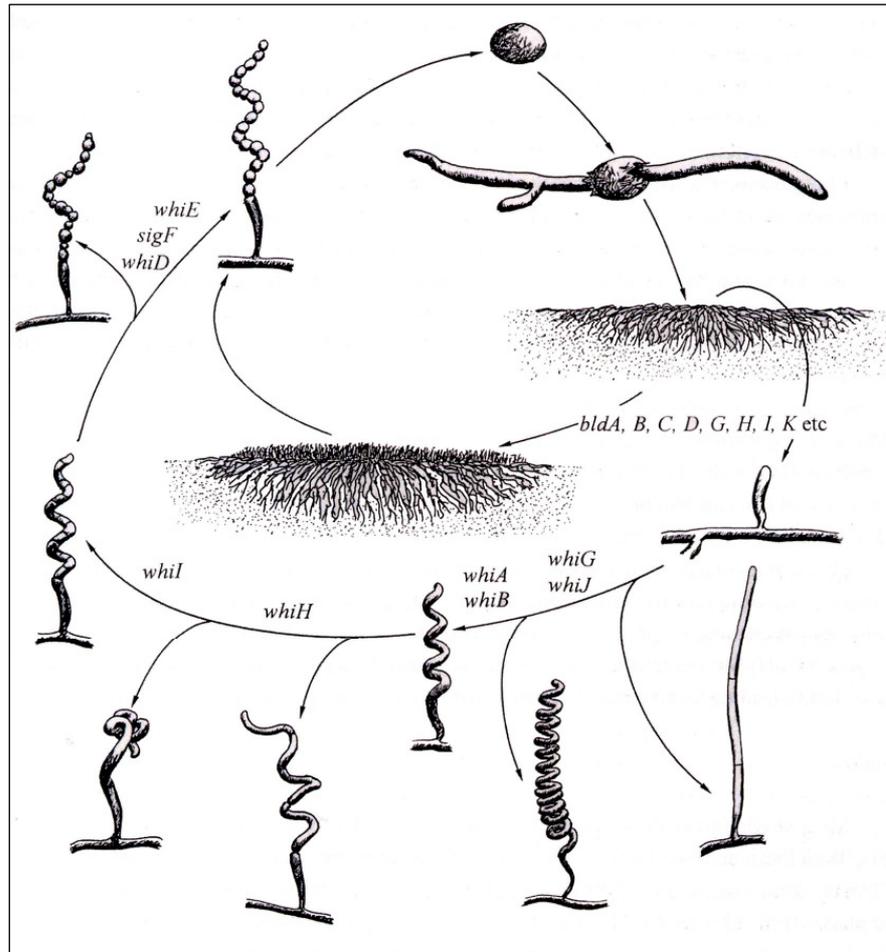
Proteinexpression möglich ist. Des Weiteren handelt es sich bei diesen Stämmen um plasmidfreie Stämme, die im Allgemeinen besser zur Expression geeignet sind (LAMMERTYN et al 1996). Der große Vorteil von Streptomyceten als Wirtsorganismen für Proteinexpression ist die Gegebenheit, dass sie die Fähigkeit, im Gegensatz zu *E.coli*, zur Sekretion besitzen. Hierzu verfügt *Streptomyces* über verschieden Sekretionswege u. a. den TAT-abhängigen Weg (SCHAERLEKENS et al. 2001).

### 1.1.2 LEBENSZYKLUS

Der Lebenszyklus von Streptomyceten ist im Gegensatz zu anderen Bakterien wesentlich komplexer. Durch ihr mycelartiges Wachstum wurden die Streptomyceten bis zu Beginn des 19.Jahrhunderts fälschlicherweise den Pilzen beigeordnet. Wie oben erwähnt konnte jedoch die Sequenzanalyse deutlich machen, dass es sich bei Streptomyceten um Fadenbildende Bakterien handelt (CHATER et al. 1993).

Ausgehend von Sporen bildet sich unter obligat mesophilen und aeroben Bedingungen zunächst ein Substratmycel aus. Unter Nährstoffmangel differenziert das Substratmycel zu einem Luftmycel mit charakteristischer Form und Färbung aus. In der späten exponentiellen Wachstumsphase entstehen an den Enden der Lufthyphen durch den Aufbau von Zellwänden artspezifisch geformte Sporophoren, die mit jeweils einer Kopie des Genoms in der stationären oder in der einsetzenden Sterbephase als Austrocknungsresistenten Kondiosporen separiert werden. Die Sporen, als ungeschlechtliche Vermehrungskörper, sind nach der Keimung in der Lage, eine neue Kolonie auszubilden. Auf Festmedien bilden Streptomyceten feste Kolonien mit einer gefalteten Oberflächenstruktur. In Flüssigmedien wachsen sie in Form von Mycelklumpen (CHATER et al. 2001).

Die Wachstumsrate von Streptomyceten ist im Vergleich zum am besten untersuchten gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* erheblich geringer, jedoch werden die vorgefundenen Nährstoffe wesentlich effektiver genutzt. Dies beruht auf der Tatsache, dass Streptomyceten eine Maximierung der Nutzbarmachung des Nahrungsangebots anstreben. *E. coli* hingegen hat die Maximierung der Produktionsrate als Selektionsstrategie.



**Abb. 1.2: Lebenszyklus von Streptomycceten**

Lebenszyklus am Beispiel von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (KIESER et al. 2000); Unter optimalen Bedingungen entwickeln sich aus der Spore ein oder zwei Hyphen (A), die durch Verlängerung und Verzweigung das Substratmycel (B) bilden. Nach einigen Tagen entwickeln sich bei zunehmendem Nahrungsmangel aus dem Substratmycel Lufthyphen aus. Durch die Ausbildung von Zellwänden im Luftmycel entstehen langsam Sporen (D), die den Zyklus von neuem durchlaufen können (E). Durch die Gene *whiA* bis *whiK* bilden sie Einzelkompartimente innerhalb des Luftmycels.

### 1.1.3 *STREPTOMYCES COELICOLOR* UND *STREPTOMYCES LIVIDANS*

Der am besten bekannteste Streptomyccetenorganismus ist *Streptomyces coelicolor* A3(2). Gemeinhin wird er als „Modellorganismus“ für die übrigen Streptomycceten angesehen (CHATER et al. 1982) Im Jahre 2002 wurde die komplette Genomsequenz in Nature veröffentlicht (BENTLEY et al. 2002; [http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_coelicolor/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/)). Das Genom umfasst 8,67 Mb, wobei mehr als 7500 offene Leseraster (ORFs) gefunden wurden. Das bedeutet, das *Streptomyces coelicolor* etwa 20% mehr Gene besitzt, als im eukaryontischen

Organismus *Saccharomyces cerevisiae* kodiert werden. Der für die Sequenzierung gewählte Stamm, M145, ist ein Plasmid freies, prototypisches Derivat des Wildtyps von *Streptomyces coelicolor*.

Die Vielzahl von Genen lässt auf komplexe Regulations- und Stoffwechselmechanismen schließen. Alleine über 900 Regulatorproteine, davon 63 Sigma-Faktoren, dienen der Anpassung an die verschiedensten Umweltbedingungen und dem komplexen Lebenszyklus. Unter den gefundenen 22 Sekundärmetaboliten finden sich drei Gene, die für Antibiotika kodieren. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die gefundenen kodierenden Bereiche. Die genauen Funktionen sind jedoch nur für knapp die Hälfte der Proteine bekannt.

Größe des Genoms [bp]	8 667 507
ORFs	7 825
Kodierungsdichte [%]	88,9
GC-Gehalt [%]	72,12
Durchschnittliche Genlänge	991
Vorhergesagte Regulatorproteine (total)	965
Sigma-Faktoren	63
Zwei-Komponenten Regulator Systeme	85 (Sensor-Kinasen) 79 (Response-Regulatoren) 53 (Sensor-Regulator Paare)
Serin/Threonin Proteinkinasen	44
Vorhergesagte Transportfunktionen	614
ABC-Permeasen	81
ATP bindende Proteine	141
Oberflächen verankerte Substratbinde Proteine	75
Sekretorische Proteine	819
Proteasen/Peptidasen	60
Chitinasen/Chitosanasen	13
Cellulasen/Endoglukanasen	8
Amylasen	3
Pectat-Lyasen	2
Sekundärmetabolite	22
Antibiotika	3
Siderophore	3
Pigmente	3
Lipide	2
Sonstige Moleküle	11

Tab. 1.1: Codierende Bereiche in Genom von *Streptomyces coelicolor* (PARADKAR et al. 2003)

Nur 6% der gefundenen Gene sind bekannt und untersucht. Der größte Teil von 41% der gefundenen ORFs ähneln bekannten Genen. Ein gutes Drittel an ORFs beinhaltet Gene mit unbekannter Funktion. Die restlichen 23% der gefundenen Gene sind neu.

Wie bei einem im Boden lebenden Organismus zu erwarten findet man eine Vielzahl an Genen, die für Enzyme kodieren, die zum Abbau in der Umwelt befindlichen Substraten dienen. Für den Austausch von Metaboliten und die Sekretion von Proteasen findet man bei *Streptomyces coelicolor* 81 ABC-Permeasen und 141 ATP-bindende Proteine gefunden worden.

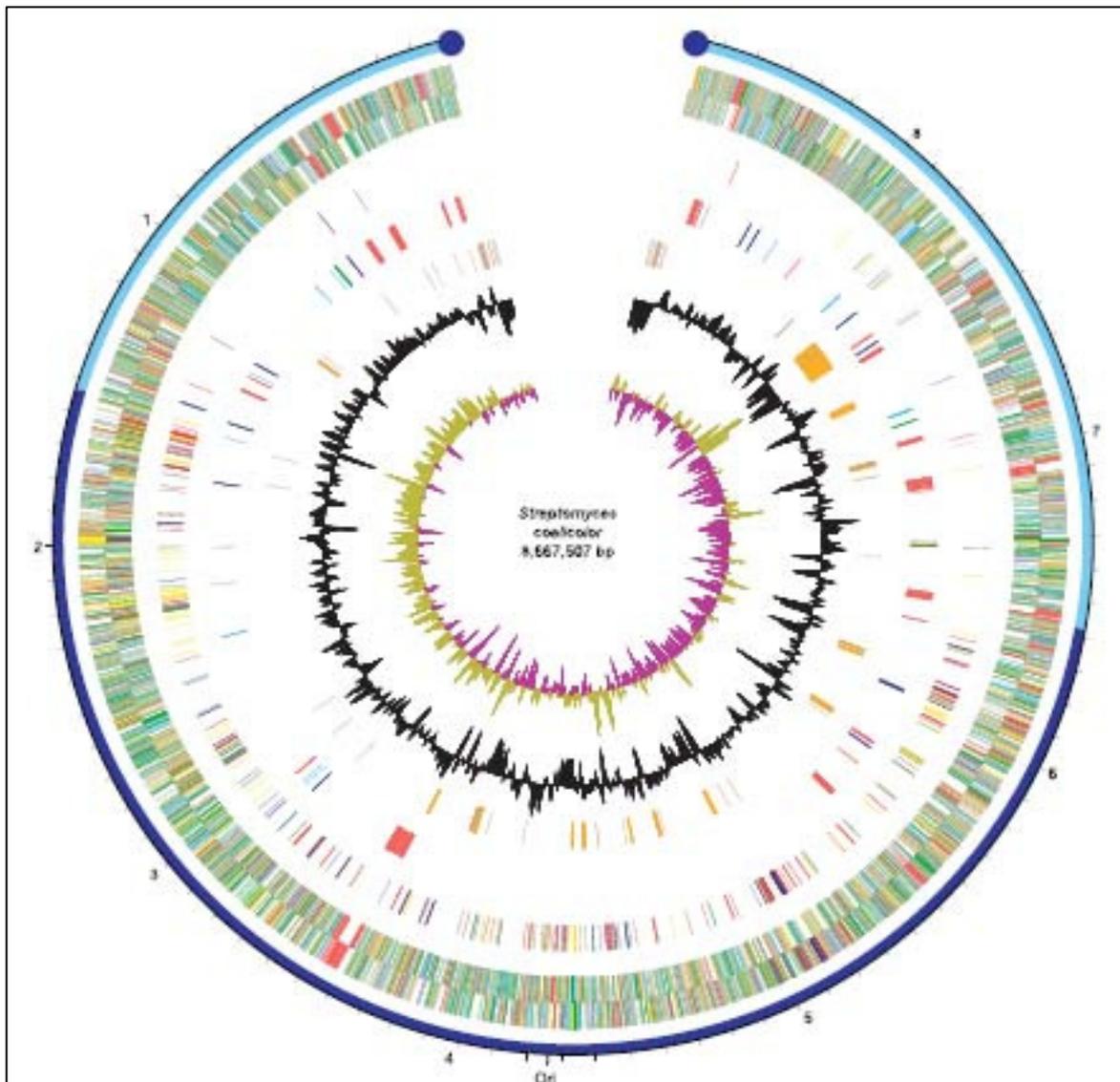


Abb.1 .3: Das Genom von *Streptomyces coelicolor* (BENTLEY et al. 2002)

Ebenfalls wurden zum Teil mehrere Kopien von Genen gefunden, die auf die diphasische Lebensweise hinweisen. Hier findet man z.B. Glykogen-Stoffwechsel-

Enzyme, die in zwei Kopien vorliegen. Eines der Gene wird im Substratmycel exprimiert, das andere im Luftmycel (SCHNEIDER et al. 2000)

Das verhältnismäßig lange, lineare Chromosom der Streptomyceten besitzt eine fast um das zweifache größere Kapazität als das von *E. coli*. Die lineare Struktur des Chromosoms wurde zunächst in *Streptomyces lividans* (LIN et al. 1993; HUANG et al. 1998) gefunden und später in *Streptomyces coelicolor* bestätigt (KIESER et al. 1992). Das *Streptomyces coelicolor* Chromosom besitzt einen zentralen Replikationsursprung (*oriC*). In der Nähe dieses Ursprungs befinden sich die beiden Gene *dnaA* und *gyrB*, deren Sequenzen für das Replikations inizierende Protein und die DNA-Gyrase kodieren. Die *oriC*-Region besitzt einen für Bakterien charakteristisch höheren AT-Gehalt (JAKOMOWICZ et al. 1998).

Die Replikation findet somit zentral beginnend vom Replikationsursprung in beide Richtungen statt. Am Ende des Rückwärtsstrangs befindet sich nach dem Abbau des letzten RNA-Primers eine einzelsträngige Lücke. Diese terminale Lücke wird wahrscheinlich durch eine Einzelende-Reparatur DNA-Synthese aufgefüllt, wobei die terminalen Proteine als eine Art Primer fungieren und somit postreplikative glatte Enden generiert werden (CHANG et al. 1994).

Die chromosomalen Enden bestehen aus „terminal inverted repeats“ (TIRs), die eine Größe von ca. 20 bis 550 kb haben können (LIN et al. 1993; LEBLOND et al. 1996). Die DNA-Sequenz des einen Endes findet sich invers am anderen Ende wieder. Es finden sich dort an die 200 bp lange konservierte palindromische Sequenzen (YANG et al. 2002). An die Enden des linearen Chromosoms sind kovalent terminale Proteine gebunden. In *Streptomyces lividans* befindet sich kein funktionelles Gen in den endständigen Regionen, wie es bei den meisten Streptomyceten der Fall ist. Allgemein ist das Chromosom von Streptomyceten relativ instabil (DHARMAINGAM et al. 1996) 0,1% der Sporen weisen spontane Mutationen auf. Es können dabei bis zu 2 Mb große Deletionen auftreten (LEBLOND et al. 1994). Die meisten Mutationen betreffen dabei die Enden der Chromosomen.

Der Transkriptionsstart erfolgt in 63% der Fälle mit ATG (Methionin). Die Termination wird, wie teilweise auch bei *E. coli*, durch rho-unabhängige Faktoren reguliert (BIBB et al. 1984). Eine weitere Möglichkeit der Termination besteht in der Ausbildung

selbstkomplementärer Strukturen am Ende eines Gens, die durch den hohen GC-Gehalt begünstigt werden (WRIGHT et al. 1992).

Von Bedeutung für molekularbiologische Arbeiten ist der hohe GC-Gehalt des Streptomycetengenoms. Die durchschnittlich 72% für *Streptomyces* setzen sich aus 71% für das erste, 50% für das zweite und 91% für das dritte Nukleotid eines Codons zusammen (PERNODET et al. 2002). Daraus resultieren Schwierigkeiten u. a. bei der Polymerasekettenreaktion.

Der in dieser Arbeit verwendete Organismus *Streptomyces lividans* hat den Vorteil, dass er nur wenig Proteasen exprimiert, was eine homologe oder auch heterologe Expression von rekombinanten Proteinen begünstigt (BALTZ et al. 1990). Ebenso findet man keine Restriktionsbarriere. Damit ist das Klonieren bzw. Einbringen von DNA nicht behindert. Was das Klonieren mit diesem Stamm ferner vereinfacht ist sein gute Protoplastierbarkeit (ARETZ et al. 1989). *Streptomyces lividans* besitzt im Gegensatz zu den meisten Streptomyceten weiterhin den Vorteil, dass er keine eigenen Plasmide besitzt. Plasmidfreie Stämme sind im Allgemeinen besser zur Expression geeignet, da u. a. nicht von vornherein zu einem einzubringenden Plasmid identische Replikationsursprünge vorliegen, die eine Expression verhindern (ANNE et al. 1993, TOMICH et al. 1990).

Da *Streptomyces lividans* sensitiv gegen die Antibiotika Neomycin und Thiostrepton ist, können diese Antibiotika als Selektionsmarker verwendet werden.

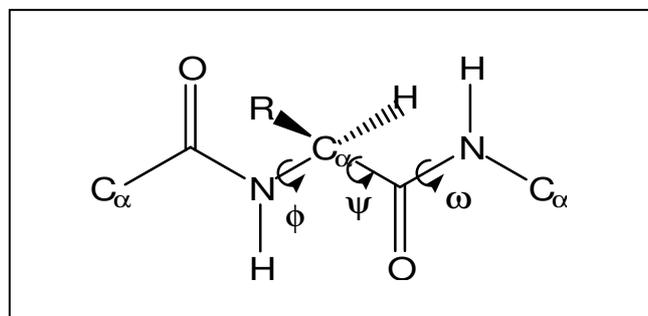
*Streptomyces lividans* 66 ist nahe verwandt mit *Streptomyces coelicolor* A3(2). Jedoch ist es wesentlich einfacher mit *Streptomyces lividans* zu arbeiten, da aus *E.coli* isolierte, methylierte DNA nicht in *Streptomyces coelicolor* eingebracht werden kann. Dieses Problem existiert bei *Streptomyces lividans* nicht in diesem Maße. Es ist jedoch von Vorteil einen *E.coli*-Stamm zu wählen, dessen DNA nicht methyliert ist (HOPWOOD et al. 1983, KIESER et al. 1991).

## 1.2 PEPTIDYL-PROLYL *CIS*/*TRANS* ISOMERASEN

### 1.2.1 PEPTID-BINDUNG

Proteine sind als Arbeitsmoleküle der Zelle wahrscheinlich an allen biologischen Prozessen beteiligt. Sie bilden nicht nur die Struktur der Zelle, sondern sind auch die hauptsächlichen Katalysatoren chemischer Reaktionen, wobei sie mit extrem hoher Effizienz und Spezifität wirken. Diese Biopolymere können jedoch nur funktional aktiv sein, wenn sie in einer bestimmten Weise gefaltet sind. Besonders von Bedeutung ist dabei ihre dreidimensionale Struktur, die für die biologische Funktion des Proteins charakteristisch ist. Am Ort der Proteinbiosynthese, dem Ribosom, wird im Zuge der Translation die Primärstruktur durch Verknüpfung von Aminosäuren über Peptidbindungen gebildet. Die Sequenz der Aminosäuren scheint dabei ein Code zu sein, der Informationen über die spätere korrekte räumliche Anordnung der Polypeptidkette enthält.

Die sterische Anordnung einer Peptidbindung, die zwei Aminosäuren miteinander verbindet, wird durch die Rotationswinkel  $\phi$  ( $C_{\alpha}$ -N),  $\psi$  ( $C_{\alpha}$ -C) und  $\omega$  (C-N) beschrieben.



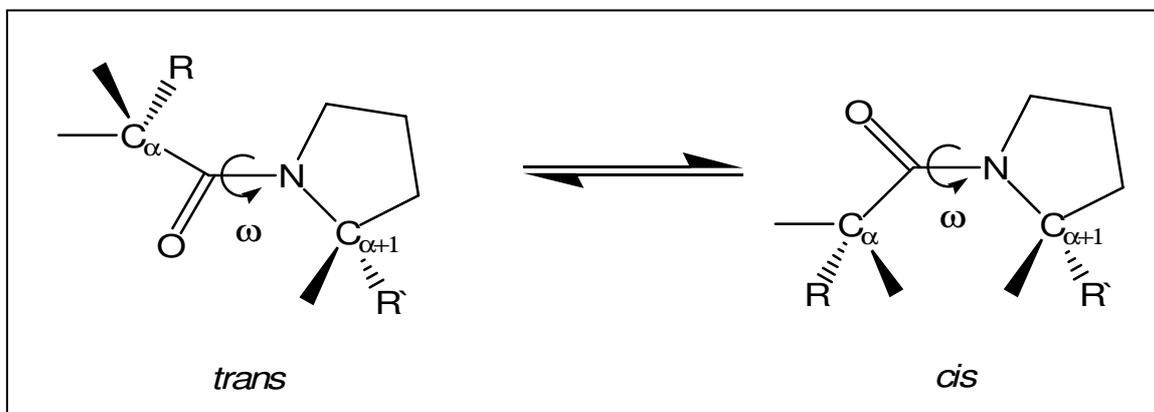
**Abb. 1.4: Peptidbindung innerhalb einer Polypeptidkette**

Die Rotationswinkel  $\phi$  ( $C_{\alpha}$ -N) und  $\psi$  ( $C_{\alpha}$ -C) besitzen formal den Charakter von Einfachbindungen. Die theoretisch freie Drehbarkeit ist jedoch in Proteinen und Polypeptiden eingeschränkt. Erlaubte Werte für die beiden Winkel lassen sich dem Ramachandran-Diagramm entnehmen (RAMACHANDRAN et al. 1968). Die Peptidbindung weist aufgrund der Elektronendelokalisation innerhalb der C(=O)-NH-Bindung einen partiellen Doppelbindungscharakter auf. Die Rotation um diese Bindung mit dem Rotationswinkel  $\omega$  (C-N) ist daher im Vergleich zu einer einfachen

C-N-Bindung eingeschränkt. Erlaubt sind zwei Konformationen. Bezogen auf die Anordnung der benachbarten  $C_{\alpha}$ -Atome können die Werte  $0^{\circ}$  (*cis*) und  $180^{\circ}$  (*trans*) für den Rotationswinkel  $\omega$  (C-N) unterschieden werden. Aufgrund der sterischen Hinderung von Substituenten benachbarter  $C_{\alpha}$ -Atome in der *cis*-Konformation findet man in Proteinen, als auch in Peptiden überwiegend die *trans*-Konformation vor.

## 1.2.2 XAA-PRO-PEPTIDBINDUNG

Im Gegensatz zu allen anderen proteinogenen Aminosäuren ist Prolin eine Iminsäure und nimmt damit aus sterischen Gründen eine Sonderstellung ein. Die Verknüpfung des  $C_{\gamma}$ -Atoms der Seitenkette mit dem Amidstickstoff führt zur Ausbildung eines Pyrrolidinringes. Diese Struktur lässt nur zwei stabile Konformationen am Rotationswinkel  $\omega$  (C-N) zu, die *cis*-Konformation für  $\omega$  (C-N) =  $0^{\circ}$  und die *trans*-Konformation für  $\omega$  (C-N) =  $180^{\circ}$ . Wie oben erwähnt kommt die sterisch ungünstigere *cis*-Konformation bei einer normalen Peptidbindung nur unter 1% vor. Dieser Anteil erhöht sich jedoch auf 10% bis 30% in Peptidyl-Prolyl-Bindungen (GALAT et al. 1995), vor allem in Abhängigkeit von den N- und C-terminal flankierenden Aminosäuren zum Prolin (REIMER et al. 1998).



**Abb. 1.5: *cis/trans*-Konformation des Prolins innerhalb einer Polypeptidkette**

Aufgrund der Ringausbildung kommt es zur Aufhebung der freien Drehbarkeit um den Rotationswinkel  $\phi$  ( $C_{\alpha}$ -N). Durch das Fehlen der NH-Gruppe kann die Prolylbindung nicht als Donator für Wasserstoffbrücken wirken, während die Akzeptorfunktion der C=O-Gruppe weiterhin erhalten bleibt. Bei der Strukturausbildung verhält sich Prolin als so genannter Strukturbrecher. Da das Amidproton durch eine  $CH_2$ -Gruppe ersetzt ist und damit, wie oben erwähnt, keine

Wasserstoffbrücke ausgebildet werden kann, kommt es zu einer sterischen Hinderung, die Auswirkungen auf die Sekundärstruktur von Proteinen hat. Sowohl die *trans*- als auch die *cis*-Konformation begünstigen Wendungen z.B.  $\beta$ -Schleifen in der Polypeptidkette (FANGHÄNDEL et al. 2004). Einen relativ hohen Anteil an Prolin findet man in Transmembranhelices von Transportproteinen. Es wird vermutet, dass diese Anordnung eine Rolle bei der Ausbildung von transportkompetenten Kanälen spielt (WILLIAMS et al. 1991).

Die biologische Relevanz von *cis/trans*-isomeren Molekülen wird deutlich, wenn man sich die Spezifität bei proteolytischen Prozessen *in vivo* für eines der Konformere betrachtet (YARON et al. 1993). Die meisten Proteasen, u. a. Trypsin, Chymotrypsin und Subtilisin weisen abhängig von der Lage des Prolinrestes von der zu spalteten Bindung eine Spezifität für die *trans*-Konformation auf (BRANDTS et al. 1986). Auch die HIV-1-Protease, die eine Peptidbindung N-terminal zum Prolin hydrolysiert, reagiert spezifisch mit dem *trans*-Isomer (VANCE et al. 1997)

### 1.2.3 PEPTIDYL-PROLYL *CIS/TRANS* ISOMERASEN

Die katalytische *cis/trans* Isomerisierung einer Prolyl-Einheit ist aufgrund der hohen Aktivierungsenergie von ca. 80 kJ/mol (FISCHER et al. 1994) häufig der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei biologischen Prozessen (AUMÜLLER et al. 2003). Hierzu gehören die *de novo* Proteinsynthese und das Proteintargeting. Der Nachweis einer Enzymkatalyse der Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerisierung gelang erstmals FISCHER et al. 1984. Damit war eine neue Klasse von Enzymen beschrieben, die Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen, kurz PPIs (EC 5.2.1.8).

Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen sind phylogenetisch hochkonservierte Enzyme. Man findet eine Vielzahl von Isoformen, die spezifisch für die Spezies, Gewebe- und Zelltypen, als auch für Zellkompartimente sind (GALAT et al. 1993; FISCHER et al. 1994). In allen bis zu diesem Zeitpunkt sequenzierten Genomen wurden Sequenzen gefunden, die potentiell für Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen kodieren (BÄCHINGER et al. 1987, BALBACH et al 1999).

Die Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen lassen sich in drei große Unterklassen einteilen:

- 1) Cyclophiline (Cyp)
- 2) FK506-Bindeproteine (FKBP)
- 3) Parvuline

Diese drei Familien unterscheiden sich hinsichtlich Primärstruktur, Tertiärstruktur, ihrer Substratspezifität gegenüber Oligopeptiden, als auch in ihrer Sensitivität gegenüber immunsuppressiv wirkenden Inhibitoren. Innerhalb jeder Gruppe gibt es hochkonservierte Sequenzbereiche, die für die Bildung des katalytischen Zentrums und die Substratbindung verantwortlich sind. Es kommen prototypische Formen vor, die in der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind. Sie besitzen ausschließlich eine Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase-Domäne. Man findet aber auch Proteine, die ein oder mehrere katalytische Zentren mit Isomeraseaktivität besitzen. Diese Enzyme weisen weitere funktionale Einheiten auf. Bei den Prototypen findet man keine Chaperone ähnlichen Eigenschaften. Bei den Mehrdomänen-Isomerasen können diese, wie oben beschrieben, zusätzliche funktionale Einheiten besitzen, die Chaperone ähnliche Aufgaben erfüllen. Hierzu gehört der Trigger-Faktor aus *E. coli* (SCHOLZ et al. 1997).

Zwischen den einzelnen Familien besteht keine Sequenzhomologie. Sie werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität zu bestimmten immunsuppressiven Substanzen unterschieden. Aufgrund dieser Tatsache nennt man sie auch Immunophiline.

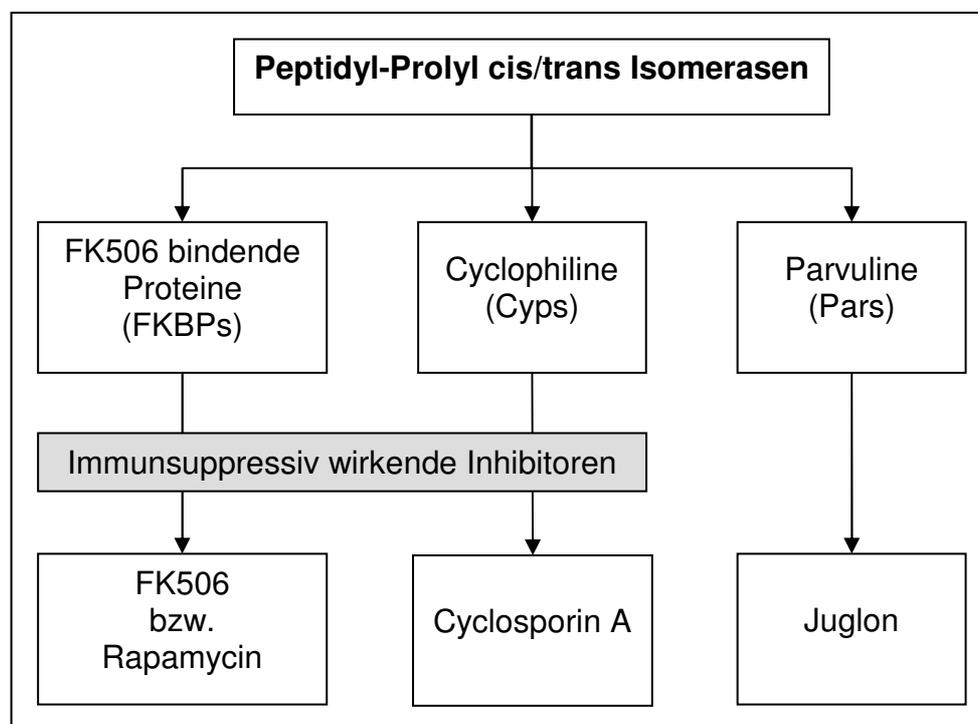


Abb. 1.6: Übersicht über die Klassen an Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen

Cyclophiline werden durch das zyklischen Undekapeptid Cyclosporin A (CsA) inhibiert (HANDSCHUMACHER et al. 1984). FKBP's haben eine spezifische Affinität zu den beiden Peptidmakroliden FK506 und Rapamycin (HARDING et al. 1989). Bei der Inhibierung durch Cyclosporin A, als auch durch FK506 bzw. Rapamycin kommt es zur Inaktivierung der Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomeraseaktivität. Die Klasse der Parvuline werden als diejenigen beschrieben, die weder durch FK506, Rapamycin noch Cyclosporin A inhibiert werden.

Ein weiteres Kriterium zur Unterscheidung der drei Familien ist ihre differente Substratspezifität. Hierbei kommen verschiedenen Oligopeptide zum Einsatz, die sich in ihrer N-Terminalen benachbarten Position zum Prolin unterscheiden. Während Cyclophiline generell eine breitere Akzeptanz bezüglich dieser Position aufweisen, zeigen FKBP's eine eingeschränkte Spezifität. Sie bevorzugen die Katalyse von Substraten, die eine hydrophobe Aminosäure, wie z.B. Leucin oder Phenylalanin, in benachbarter Position zum Prolin enthalten.

### 1.2.3.1 FK506-BINDENDE PROTEINE

Das seit 1989 bei Transplantationsabstoßung angewandte FK506 bindet in humanen Zellen an einen intrazellulären Rezeptor. Der Rezeptor wurde als ein cytosolisches Protein von ca. 12 kDa identifiziert (HARDING et al. 1989), der spezifisch FK506 und Rapamycin bindet. Weiterhin wurde bei dem FKBP12 genannten Enzym eine Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomeraseaktivität gefunden. Dieses Protein begründete damit die Familie der FK506 bindenden Proteine (FISCHER et al. 1994).

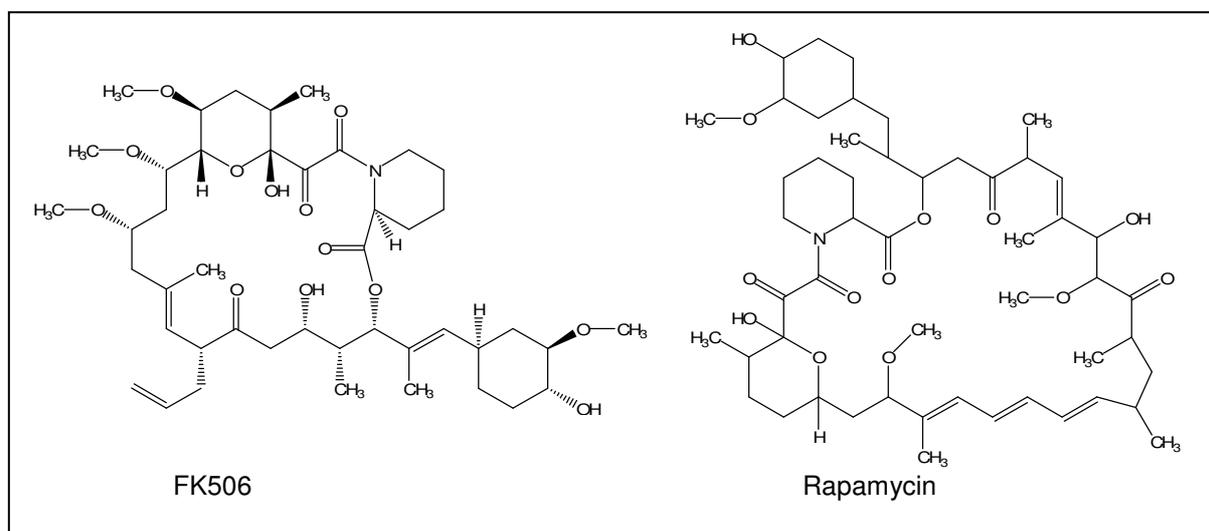


Abb. 1.7: Die beiden Immunsuppressiva FK506 und Rapamycin

Bei der Untersuchung des Mechanismus der durch FK506 induzierten Inhibierung der T-Zellaktivierung, wurde die Calcium/Calmodulin abhängige Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin als Bindungspartner des FK506/FKBP-Komplexes identifiziert. Durch die Bindung des FK506/FKBP-Komplexes wird die Phosphataseaktivität des Calcineurins gehemmt. Dadurch wird die cytosolische Komponente des Transkriptionsfaktor NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) nicht dephosphoryliert und er verbleibt im Cytosol. Das Interleukin-2 Gen kann daraufhin nicht transkribiert werden und die Progression des T-Zellzyklus von  $G_0 \rightarrow G_1$  kann nicht stattfinden (SCHREIBER et al. 1992).

Rapamycin besitzt ähnlich strukturelle Eigenschaften wie das FK506. Allerdings findet die immunsuppressive Wirkung von Rapamycin erst in der späteren T-Zell-Reifung. Hier bindet es an den Interleukin-2-Rezeptor bei medierter T-Zell-Proliferation und hemmt damit die Progression des T-Zellzyklus von  $G_1 \rightarrow S$ . Als Bindungspartner des FKBP/Rapamycin-Komplexes wurde FRAP (FK506-Rapamycin assoziiertes Protein), ein PI3-Kinase, identifiziert (SABATINI et al. 1994).

Bis heute wurden weitere Vertreter der FKBP-Familie charakterisiert. Ihre Größe variiert von 12-50 kDa. Alle diese Proteine enthalten eine ca. 100 Aminosäuren umfassende Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase-Domäne. Diese kann einzeln, mehrfach hintereinander oder in Kombination mit anderen Domänen vorliegen.

Eine Beteiligung der FKBSs bei Vorgängen der Proteinfaltung, des zellulären Proteintransport oder eine Funktion als Chaperone konnten durch verschiedene Beispiele bestätigt werden.

Bei Prokaryonten findet man eine ubiquitäre Verbreitung cytosolischer FKBP's. Ausnahmen stellen hier *Bacillus subtilis* und einige Mycobakterien dar (GÖTHEL et al. 1999). *E. coli* enthält insgesamt vier FKBP's. Von denen ist FkbA eines ein MIP (macrophage infectivity potentiator) homologes Protein. Diese MIPs stellen eine Unterfamilie der FKBP's dar. Es sind Oberflächenproteine von intrazellulären Parasiten. FkbA und ein zweites, im Periplasma befindliches FKBP sind in *E. coli* für die Faltung von OMP (outer membrane proteins) beteiligt (DARTIGALONGUE et al. 1998).

Bei Actinomyceten findet man ebenfalls FKBP. *Streptomyces chrysomallus* enthält z.B. ein cytosolisches FKBP12, dessen Gen mit dem Gen eines weiteren FKBP (FKBP33) auf dem Genom gekoppelt vorliegt. FKBP33 ist ein membranständiges Lipoprotein, welches zwei Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase-Domänen beinhaltet (PAHL et al. 1994). Für dieses Protein wurden eine Funktion bei Export von Exoproteinen oder eine Rolle bei der Membranintegrität vorgeschlagen.

Im Rahmen des *Streptomyces coelicolor*-Genomsequenzierungsprojektes wurden die beiden FKBP's auch bei *Streptomyces coelicolor* gefunden. Auch die FKBP's der FK506 und Rapamycin produzierenden *Streptomyces*-Stämme sind durch FK506 bzw. Rapamycin inhibierbar. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Organismen bestimmte Mechanismen zum Schutz gegenüber denen von ihnen selbst produzierten Wirkstoffen besitzen (PAHL et al. 1992).

Der Trigger-Faktor am *E. coli* Ribosom wurde aufgrund von Sequenzhomologien den FKBP's zugeordnet. Im Vergleich zu anderen Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen katalysiert der Trigger-Faktor die Rückfaltung der RNase T1 am effektivsten. Daher wird vermutet, dass der Trigger-Faktor am Ribosom bei der Faltung von neu synthetisierten Proteinen beteiligt ist. Tatsächlich konnte die Bindungen die naszierende Polypeptidkette nachgewiesen werden (HESTERKAMP et al. 1996).

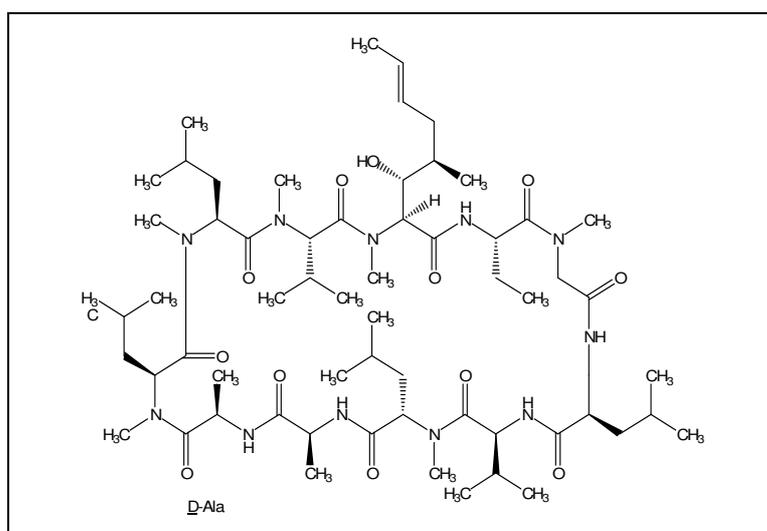
Des Weiteren scheint der Trigger-Faktor mit den *E. coli* Chaperonen GroEL und GroES eine Komplex einzugehen. Die Proteine der GroEL/GroES-Familie sind in *E. coli* nicht nur für die Faltung von Proteinen zuständig, sondern auch für die Proteolyse von unkorrekt gefalteten Proteinen verantwortlich. Der Komplex aus Trigger-Faktor, GroEL und GroES ist für die Erkennung und Bindung von ungefalteten Proteinen notwendig.

### 1.2.3.2 CYCLOPHILINE

Der für die Cyclophiline charakteristische Inhibitor Cyclosporin A (Sandimmun®) wurde aufgrund seiner antifungalen Wirkung in dem Pilz *Tolypocladium inflatum* entdeckt (BOREL et al. 1996). Erst später wurde auch eine immunsuppressive Wirkung gefunden. Seit Anfang der 1980er Jahre wurde Cyclosporin A zur Unterdrückung von Transplantatabstoßung und zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt (ALLISON et al. 1994, MARKS et al. 1999).

Die Wirkung von Cyclosporin A beruht auf der Bindung an einen cytosolische Rezeptor, das Cyclophilin A, welches als Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase identifiziert wurde (FISCHER et al. 1989). Der Cyclophilin A/Cyclosporin A-Komplex inhibiert wie sein FK506/FKBP-Äquivalent die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Calcineurin-Kinase (LIU et al. 1991). Diese wiederum kann ihre Phosphatase-Funktion nicht ausführen, was zu Folge hat, dass die cytosolische Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-AT nicht dephosphoriliert wird. NF-AT kann im dephosphorilierten Zustand die Kernmembran nicht durchdringen. Eine Interleukin-2 Genexpression bleibt aus (SCHREIBER et al. 1992).

Aufgrund der starken Nebenwirkungen wie z. B. Nephrotoxizität, ist er Anwendungsbereich von Cyclosporin A limitiert. Hierbei bindet Cyclosporin A an das P-Glykoprotein der Niere, welches einen essentiellen energieabhängigen Transporter darstellt. Ist dieser blockiert kommt es zu starker Beeinträchtigung der Nierenfunktion, da keine toxischen Metaboliten, Ionen und Nährstoffe transportiert werden können (DEL MORAL et al. 1998).



**Abb. 1.8: Cyclosporin A**

Auch das Cyclophilin erfährt eine weiter Verbreitung über Bakterien, Pilze, Tiere und Pflanzen (HANDLER et al. 1981). Alle Vertreter besitzen eine ca. 130 Aminosäuren umfassende, hoch konservierte Domäne. Dieser Bereich ist für die Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomeraseaktivität, als auch für die Bindung an Cyclosporin verantwortlich. Bis zu diesem Zeitpunkt ist keine generelle Funktion der Cyclophiline erkennbar. Für die bis jetzt isolierten Cyclophiline wurde keine essentielle Funktion im Lebenszyklus gefunden (BOTHMANN et al. 2000).

Das humane Cyclophilin A wurde als Bindungspartner für das *gag* kodierende Kapsid-Protein von HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) identifiziert (LUBAN et al. 1996). Bekannt ist, dass Cyclophilin A an die Prolinreiche Kapsid-Domäne des *gag*-Proteins bindet, was kompetitiv durch Cyclosporin gehemmt werden kann (THALI et al. 1994). Unterbleibt die Ausbildung des *gag*/Cyclophilin A-Komplexes wird die Replikation von HIV-1 gehemmt (FRANKE et al. 1994). Die Bindung von Cyclophilin A an das *gag*-Protein erfolgt hierbei spezifisch an eine *trans*-konfigurierte Konformation der Sequenz Ala-Gly-Pro-Ile (ZHAO et al. 1997) und läuft unter Beteiligung des aktiven Zentrums des Cyclophilins (DORFMAN et al. 1997). In den meisten anderen Cyclophilin A-Peptid-Komplexen liegt vorwiegend eine *cis*-Konformation vor.

Die Beteiligung von Cyclophilinen an Proteinfaltungs- und Transportprozessen konnte anhand von Beispielen nachgewiesen werden. In Gegenwart des Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase Inhibitors Cyclosporin A ist die Bildung der tripelhelikalen Collagenstruktur durch Faltung von Prokollagen signifikant verlangsamt (STEINMANN et al. 1991). Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass Cyclosporin A die Reifung des sekretorischen Proteins Transferrin inhibiert. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass Cyclophiline an dem Reifungsprozess beteiligt sein müssen (LODISH et al. 1991). Die Faltung von Ribonuklease T1 wird ferner durch Cyclophiline katalysiert (SCHMID et al. 1996).

Humanes Cyp40 bindet über ein Protein-Protein-Wechselwirkungsmotiv, eine Tetratricopeptid-Domäne (TRP), an das Hitzeschockprotein Hsp90, welches eines der Hauptbestandteile eines Multiprotein-Chaperone-Systems darstellt (HOFFMANN et al. 1995; OWENS-GRILLO et al. 1996).

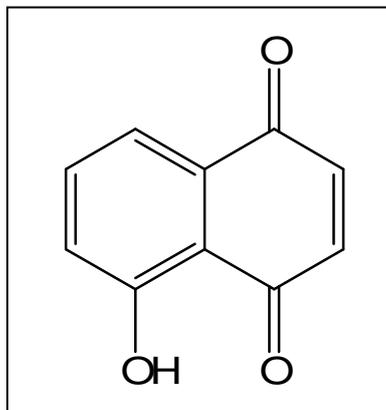
Inwieweit Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen eine Rolle in Prokaryonten spielen ist noch nicht geklärt (MANTECA et al. 2004).

### 1.2.3.3 PARVULINE

Parvuline bilden neben den Cyclophilinen und FKBP's die dritte Familie der Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen. Im Gegensatz zu den anderen beiden Familien sind nur wenig Parvuline bekannt. Das erste Parvulin (Par10) wurde aus *E.coli* mit einem Molekulargewicht von 10,1 kDa isoliert. Aufgrund seiner geringen Größe wurde der Familie der Name „Parvuline“ gegeben (lat.: parvulus = klein). Bis heute ist die aus

92 Aminosäuren bestehende Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase die kleinste bekannteste.

Wie schon erwähnt war lange kein Inhibitor für die Parvuline bekannt. Ende der 1990er Jahre wurde dann Juglon entdeckt, welches mehrere Parvuline irreversibel inhibiert.



**Abb. 1.9: Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinon)**

Eine weitere Unterteilung kann anhand der Substratspezifität zweier Parvulingruppen unternommen werden. Eine Gruppe besitzt höhere Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase-Aktivität bei phosphorylierten Substraten wie z.B. phosphorylierten Serin- oder Threoninseitenketten. Diese Fraktion wird auch als phosphatspezifische Parvuline beschrieben. Alle anderen Parvuline werden in der Gruppe der nicht phosphatspezifischen Parvuline zusammengefasst (BEHRENS et al. 2001).

Mittlerweile sind aus den verschiedensten pro- und eukaryotischen Organismen weitere Vertreter der Parvulin-Familie isoliert und charakterisiert worden. Im Unterschied zu den Cyclophilinen und den FKBP's kann den Parvulinen eine Beteiligung bei der Proteinfaltung nachgewiesen werden. (HOWARD et al. 1989, LAZAR et al. 1996) SurA, ein 47 kDa großes Parvulin, findet sich im Periplasma von *E. coli*. Es besitzt zwei Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase-Domänen. Es konnte eine Beteiligung bei der Faltung von Proteinen der äußeren Membran nachgewiesen werden (LAZAR et al. 1996). Einem weiteren Parvulin, PrsA, aus *Bacillus subtilis* konnte eine Rolle bei der Proteinfaltung und beim Proteinexport nachgewiesen werden (JACOBS et al. 1993). PrsA besitzt eine essentielle Funktion bei der Reifung von Exoproteinen, die in den extracytoplasmatischen Raum sekretiert werden. Eine Deletion dieses Gens resultierte in nicht mehr lebensfähigen Zellen (KONTINEN et al. 1991).

Im Gegensatz zu den Cyclophilinen und FKBP's scheinen die Vertreter der Parvuline eine essentielle Bedeutung für die Vitalität der Zelle zu besitzen. Während eine Deletion aller acht Cyclophiline und vier FKBP's in *Saccharomyces cerevisiae* keine Einfluss auf die Vitalität der Zelle hat (DOLINSKI et al. 1997), findet man letale Deletionen bei Parvulinen. Ein von Hanes et al. 1989 isoliertes Protein, Ess1, scheint essentiell für das Wachstum von Hefe zu sein (HANES et al. 1989). Später konnte dieses Protein als Parvulin identifiziert werden.

## 1.3 HOMOLOGE REKOMBINATION

### 1.3.1 ALLGEMEIN

Als Rekombination wird im Allgemeinen der Austausch von DNA-Sequenzen zwischen zwei benachbarten DNA-Molekülen z.B. Chromosomen, bezeichnet. Durch diesen Vorgang wird genetisches Material neu kombiniert. Dieser natürliche Prozess, der wahrscheinlich vom Zufall abhängig ist, ist die Grundlage für die Entstehung genetischer Variabilität in der Evolution. Bei höheren Organismen findet man diesen Vorgang vor allem während der Meiose. Bei niederen Organismen, z.B. Bakterien, findet Rekombination besonders häufig statt. Es besteht dadurch die Möglichkeit, defekte DNA zu reparieren. Viren benutzen die rekombinante Technik, um ihre DNA ins Wirtsgenom zu integrieren. Mittels Rekombination ist es möglich, genomische Bereiche in einer Zelle gezielt zu verändern. Es können Mutationen in das Genom einer Zelle eingebracht, als auch wieder entfernt werden (BALTZ et al. 1999).

Vor allem bei der Klonierung von Knockoutmutanten in embryonalen Stammzellen von Mäusen kommt die Rekombination zum Einsatz. So können gezielt Gene ausgeschaltet werden (COURT et al. 2002, DATSENKO et al. 2000).

Man unterscheidet bei der Rekombination zwischen zwei Typen, der homologen Rekombination und der nicht-homologen oder ortsspezifischen Rekombination.

Bei der homologen Rekombination kommt es zum Austausch zweier homologer DNA-Sequenzen. Befindet sich ein nicht-homologer DNA-Abschnitt zwischen den zwei flankierenden DNA-Sequenzen, die homolog zu einem zweiten Strang sind, kann dieser in den zweiten Strang integriert werden.

Zu der nicht-homologen Rekombination zählt man unter anderem die Transposition. IS-Elemente sind mobile genetische Elemente, die durch ca. 50 bp lange „inverted repeats“ begrenzt sind. Zwischen diesen „inverted repeats“ befindet sich ein Gen für die Transposase. Die Transposase katalysiert den Ortswechsel des IS-Elements. Zunächst beginnt die Transposition mit dem Herausschneiden des IS-Elements. Gleichzeitig wird an anderer Stelle des Genoms je einer der beiden komplementären DNA-Stränge geschnitten. Die auf den gegenüberliegenden DNA-Strängen befindlichen Schnitte sind um einige Basen voneinander entfernt. Dadurch entstehen einzelsträngige DNA-Enden mit einer für das jeweilige IS-Element charakteristischen

Länge. In diese Lücke wird das IS-Element eingefügt und die Einzelstränge durch die Transposase and das IS-Element ligiert. Die zelleigene DNA-Polymerase füllt schließlich die Einzelstranglücken auf. Die Ligase verbindet nun auch noch die beiden aufgefüllten Stränge mit dem IS-Element. Durch diese Art der Transposition ist jedes IS-Element durch eine kurze direkte Sequenzwiederholung der Ziel-DNA flankiert.

Transposons sind von IS-Elementen flankierte Gene. Die dort enthaltene Information kann z.B. für Antibiotika-Resistenzen kodieren.

Daneben gibt es konjugative Transposons. Diese besitzen zusätzliche Gene, die es ihnen ermöglichen sich selbst vom Chromosom eines Spenders auf das eines Empfängers zu übertragen, die aber auch andere genetische Elemente mobilisieren können. Für Transposons konnten zwei unterschiedliche Transpositionsmechanismen gezeigt werden. Ein Teil der Transposons transponiert mittels des konservativen Mechanismus, der jenem für IS-Elemente entspricht. Der andere Teil der Transposons transponiert mittels des replikativen Mechanismus. Dazu wird eine Kopie des Transposons angefertigt, die an anderer Stelle des Genoms integriert, während das „alte“ Transposon an seinem ursprünglichen Insertionsort verbleibt.

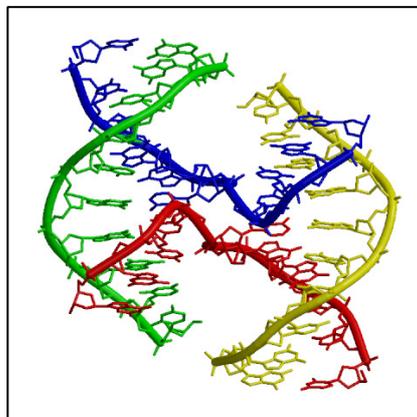
Das erste Modell der homologen wurde von Holliday aufgestellt (HOLLIDAY et al. 1964) und später von Meselson und Radding erweitert (MESELSON et al. 1975, RADDING et al. 1982). Letztlich wurde von Szostak ein Doppelstrangbruch-Modell entwickelt (SZOSTAK et al. 1983).

Allgemein gibt es verschiedene Hypothesen zur Initiierung der homologen Rekombination (SMITH et al. 2004). Erste Erkenntnisse über den Vorgang der homologen Rekombination gehen zunächst von Einzelstrangbrüchen in einem oder beiden der beisammen liegenden DNA-Sequenzen aus. Das Modell von Holliday postuliert Einzelstrangbrüche an identischen Positionen der benachbart liegenden DNA-Stränge und Austausch der beiden Einzelstränge, die in einer Holliday-Struktur resultieren.

Meselson und Radding gehen von einem Einzelstrangbruch in einem der elterlichen Doppelstränge aus. Dieser Bruch initiiert eine den benachbarten Doppelstrang verdrängenden DNA-Synthese, die einen invasiven Einzelstrang bildet.

Radding erweitert später die Hypothese, dass ein Einzelstrangbruch auch zu einer Einzelstranglücke führen kann, die dann von dem homologen Teil des zweiten DNA-Doppelstrangs gefüllt wird. Wird der auffüllende Strang dann ebenfalls geschnitten, kommt es wiederum zur Ausbildung der Holliday-Struktur.

Der Initiationsschritt der homologen Rekombination ist im Falle des Modells nach Szostak ein Doppelstrangbruch in einer der benachbart liegenden DNA-Sequenzen. Anschließend an diesen Bruch findet eine Prozessierung durch eine 5'-Exonuklease statt. Es entstehen längere 3'-terminale einzelsträngige Überhänge, die mit ihren homologen Bereichen mit einem benachbarten DNA-Doppelstrang interagieren können. Es kommt zur Ausbildung eines Heteroduplexes. Anschließend werden die einzelsträngigen Bereiche aufgefüllt. Die daraus resultierende Hybrid-DNA-Struktur wird auch Holliday-Struktur genannt. Durch „Branch Migration“ kann sich die Kreuzung der beiden Stränge entlang der DNA verschieben. Die Auflösung wird mittels spezifischer Enzyme, den DNA-Resolvasen, bewerkstelligt, die Überkreuzstrukturen erkennen und diese durch symmetrische Einzelstrangbrüche auflösen können. Die Auflösung kann mittels vertikaler, als auch horizontaler Strangbrüche erfolgen.



**Abb. 1.10: Holliday-Kreuzung**

Vorraussetzung für eine homologe Rekombination ist natürlich die räumliche Nähe zweier homologer Sequenzen, als auch die oben erwähnten Initiierungsschritte in Form von Einzelstrang- bzw. Doppelstrangbrüchen.

In *Escherichia coli* sind folgende Enzyme an der homologen Rekombination bekannt. Ein komplementärer Strangaustausch wird durch das Enzym RecA katalysiert. RecA funktioniert als Multimer mit einem Molekulargewicht von 380 kDa. Die Bindung

erfolgt an einzelsträngige DNA in Gegenwart von ATP. Im Prinzip sucht RecA den komplementären Strang, entwindet den entsprechenden Doppelstrang und verknüpft anschließend die passenden Enden miteinander. RecBCD hilft dabei als Exonuklease, Helikase und Endonuklease, wobei es eine erhöhte Affinität zu *chi*-Sequenzen hat, infolge dessen es DNA schneidet. *Chi*-Sequenzen kommen ca. alle 5000 bp in *Escherichia coli* vor und werden als so genannte „hot spots“ für Rekombination bezeichnet. Die „Branch Migration“ wird in *Escherichia coli* durch das RuvAB-Protein stimuliert. Hierzu binden zwei Tetramere des RuvA and die Überkreuzungsstelle. In Folge bindet das Hexamer RuvB als Ring an den DNA-Proteinkomplex und es kommt zur Verschiebung bzw. Wanderung der Überkreuzungsstelle. RuvC katalysiert die Auflösung der Holliday-Struktur.

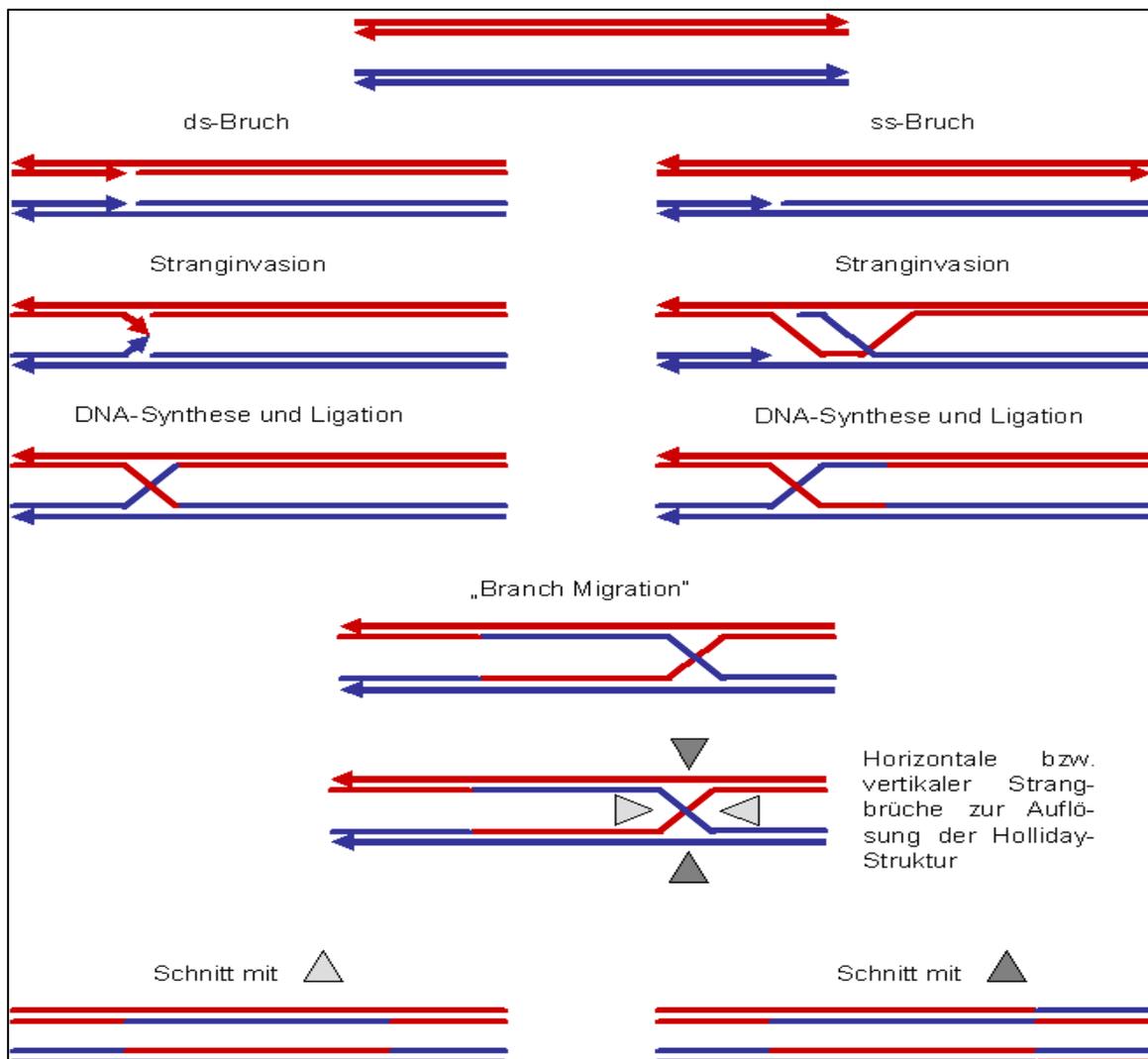
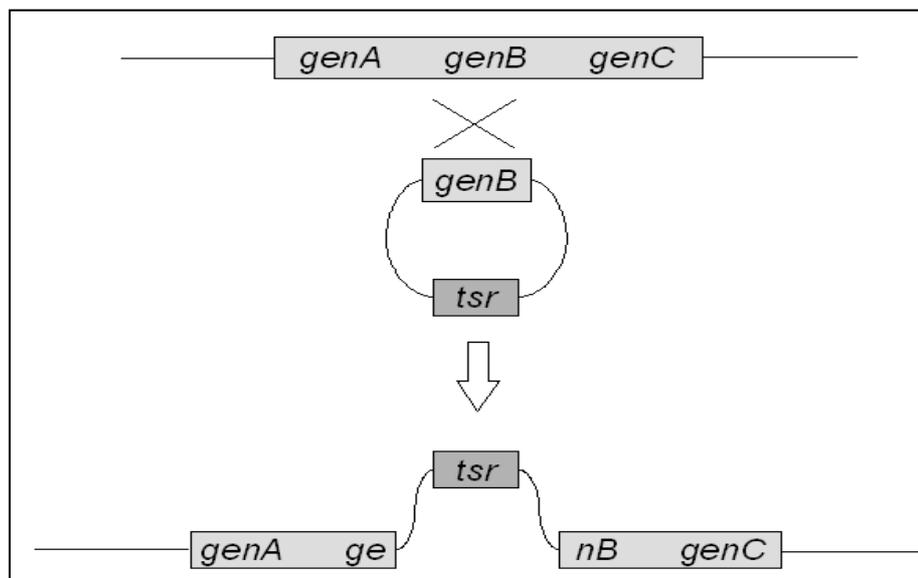


Abb. 1.11: Schema der homologen Rekombination

### 1.3.2 HERSTELLUNG VON KNOCKOUT-MUTANTEN IN *STREPTOMYCES*

Knockout-Mutanten lassen sich über drei verschiedenen Möglichkeiten in Streptomyceten generieren, die Single-Crossover-, die Double-Crossover- und die In-Frame-Deletions-Methode.

Beim Single-Crossover-Modell (Abb.1.12) wird ein entsprechender Vektor in die Zelle eingeführt, der über homologe Sequenzen und oben beschriebene Mechanismen in das Genom der Zelle integrieren kann. Der Vektor enthält z.B. ein bestimmtes Gen (hier *genB*), welches homolog zu einem im Chromosom befindlichen Gen (ebenfalls *genB*) ist. Aus dem Ansatz resultiert ein Vektor, von beiden Seiten mit Teilen des *genBs* flankiert wird. Zur Selektion kann über diesen Vektor eine Antibiotika-Resistenz eingeführt werden (hier *tsr*).



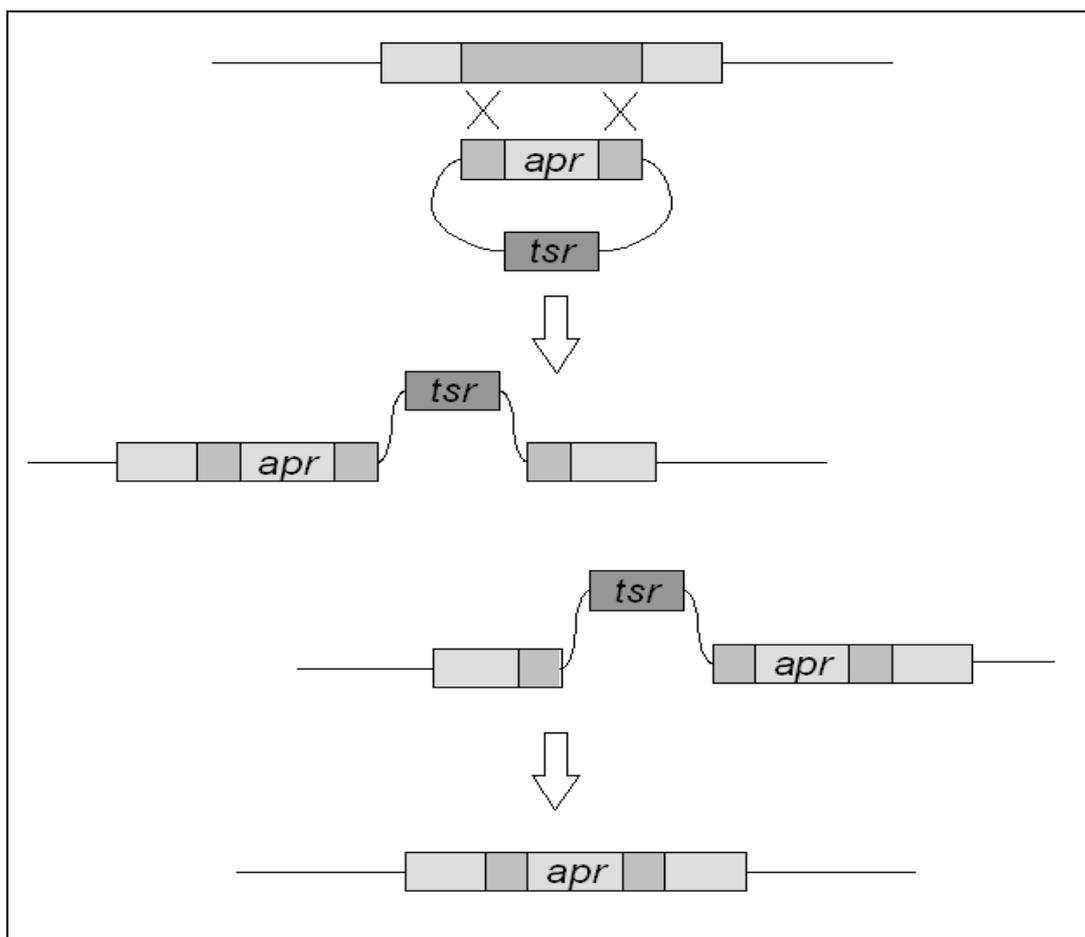
**Abb. 1.12: Single-Crossover-Modell**

Mutanten, die mittels Single-Crossover generiert werden, haben den Vorteil der schnellen Klonierung. Es wird im Prinzip nur die vorherige Klonierung des gewünschten homologen Fragmentes in einen geeigneten Vektor benötigt, denn der erste Integrationsschritt erzeugt die gewünschte Mutation. Allerdings kommt es häufig via eines reversen Single-Crossover zu einer Excision des Vektors, was den Wildtyp zur Folge hat. Daher sind durch diese Methode klonierte Mutanten nicht unbedingt stabil, obwohl die beobachtete Reversion normalerweise unter fehlendem Selektionsdruck nur bei ca. einem Prozent liegt. Eine Reversion der Mutation ist

meistens dann zu finden, wenn die Integration des Vektors ein schädliches Wachstum u.a. zu Folge hat.

Bei der Double-Crossover-Methode kommt es zu einem zweimaligen Single-Crossover. Hierzu wird ein Selektionsmarker, z.B. Apramycin (*apr*) innerhalb eines Gens (hier *genA*) kloniert. Eingebbracht in einen passenden Vektor und flankiert von homologen Sequenzen kommt es zunächst zu einem Crossover des upstream oder downstream zum Target-Gen homologen Bereiches. Nach einem zweiten Crossover des noch nicht ausgetauschten homologen Bereiches kommt es zu einer relativ stabilen Mutante. Es besteht ebenfalls bei passenden räumlichen Voraussetzungen die Möglichkeit, dass beide Crossover gleichzeitig ablaufen.

Mutanten mit nur einem Crossover können aufgrund des im Vektor vorhandenen Selektionsmarkers isoliert werden, so dass man ausschließlich die gewünschte Mutante, in diesem Fall die Double-Crossover-Mutation, erhält.



**Abb. 1.13: Double-Crossover-Modell**

Beim Double-Crossover ist es von Vorteil linearisierte DNA zur Transformation einzusetzen. Sie erhöht die Wahrscheinlichkeit primäre Transformanten zu erhalten, in denen ein Double-Crossover-Ereignis stattgefunden hat, da die Rekombination zwischen einzelsträngiger DNA und der chromosomalen DNA eine Double-Crossover erfordert, um die Integrität des Chromosoms zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu der Single-Crossover-Methode lassen sich über oben dargestellte Methode Mutanten generieren, die genetisch stabil mit der eingefügten Antibiotika-Resistenz markiert sind, so dass es z.B. möglich ist, das komplette Chromosom zu transformieren (OH et al. 1997). Ebenfalls lässt sich bei dieser Variante eher eine genetische Analyse durchführen, als bei den relativ instabilen, durch Excision gefährdeten Single-Crossover-Mutanten.

Bei der In-Frame-Deletion werden Teile eines chromosomalen Gens (hier *genA*) deletiert. Dies bedingt ebenfalls ein Double-Crossover der homologen Bereiche.

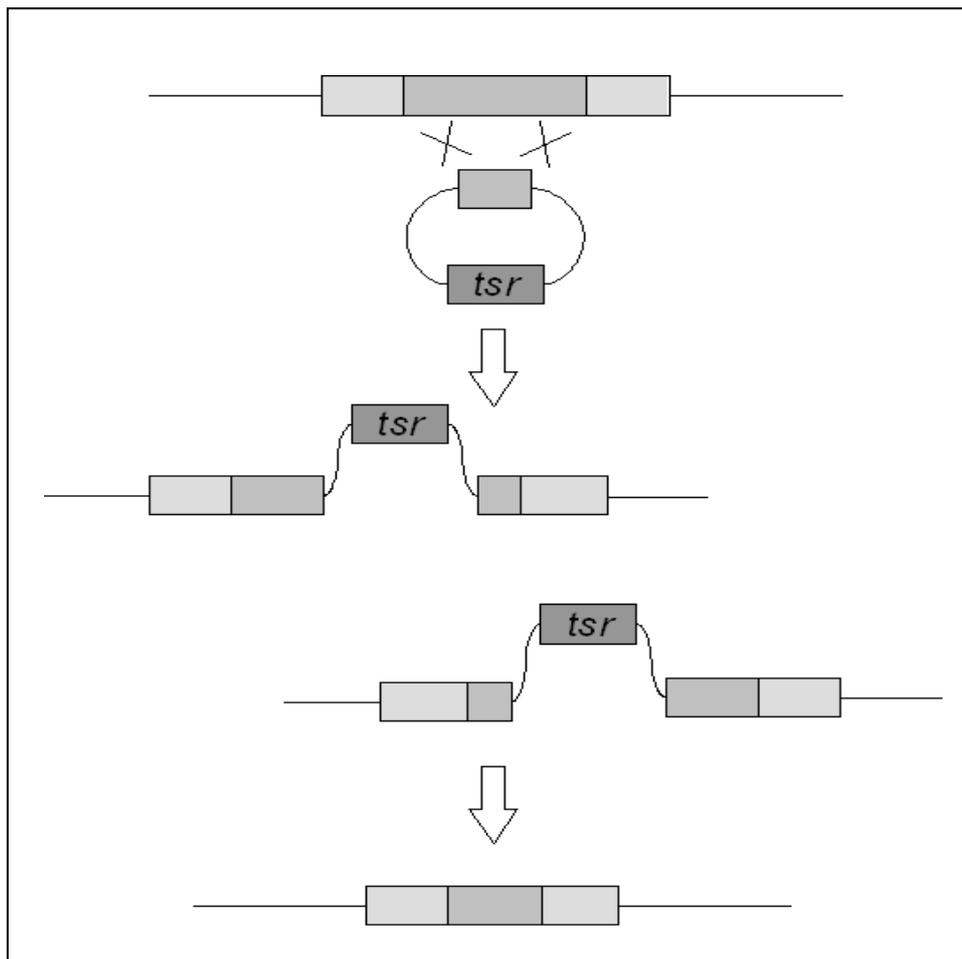


Abb. 1.14: In-Frame-Deletions-Methode

Hierzu wird eine Kopie des gewünschten chromosomalen Gens im Rahmen des Leserasters deletiert und in einen geeigneten Vektor kloniert. Nach Transformation dieses Vektors kommt es über zwei Single-Crossovers zu Substitution des chromosomalen Gens durch die Deletionsmutante.

Nachteil dieser Methode ist der erhöhte Selektionsaufwand, da mit der Deletion kein Selektionsmarker eingeführt wird. Das Screening erfolgt hierbei meist über PCR.

Allgemein hängt die Erfolgsrate der homologen Rekombination von folgenden Faktoren ab. Zum einen haben umliegende Gene Einfluss auf die Rekombination. Vor der Klonierung der Knockout-Mutante sollten die umliegenden Sequenzbereiche überprüft werden. Findet man Gene im Downstreambereich des zu mutierenden Gens, die cotranskribiert werden, kann es bei Deletion bzw. Insertion einer Sequenz zu Veränderung der Expression dieser Bereiche kommen. Dies hat eventuell einen veränderten Phänotyp zur Folge, der nicht unbedingt mit der Knockout-Mutation korreliert.

Ebenfalls die Länge der homologen DNA-Bereiche, die mit der chromosomalen DNA rekombinieren sollen, ist von Bedeutung. Die flankierenden Bereiche bei der Double-Crossover und In-Frame-Deletion sollten ähnliche Größe besitzen. Ansonsten würde es zur bevorzugten Rekombination mit dem längeren der beiden Sequenzabschnitte kommen. Damit wäre die Wahrscheinlichkeit eines Double-Crossover-Ereignisses und damit die Erfolgsrate der Knockout-Mutation geringer. Bei Streptomyceten ist eine Länge von ca. 1000 bp zu empfehlen.

Den dritten Faktor stellt die Mutationsstabilität dar. Die zwar rascher zu klonierenden Single-Crossover-Mutanten haben den Nachteil, dass sie allgemein instabiler sind, da Gefahr der Excision besteht. Für längere Studien ist es daher sicherer die etwas aufwendigere Double-Crossover-Methode zu verwenden.

Der homolog rekombinierende Vektor kann auf verschiedene Weise in *Streptomyces* eingebracht werden. Die vorbereitenden Klonierungen werden meist in *Escherichia coli* durchgeführt. Mittels Transformation, Elektroporation oder mittels Phagen-Infektion kann dann der Vektor nach Isolation aus *Escherichia coli* in *Streptomyces* eingeführt werden.

Als Methode der Wahl wird meist ein in *Streptomyces* nicht replizierendes *E. coli*-Plasmid verwendet. Hier gestaltet sich die Klonierung relativ unproblematisch. Da der

Vektor nach der Transformation nicht replizieren kann, bedarf es einiger Erfahrung, um eine erfolgreiche Transformation zu erhalten. Benutzt man einen *E. coli*-Vektor zum Einbringen der DNA in Streptomyceten, der aus einem Methylierungsspezifischen-Restriktionssystem-*E. coli*-Organismus stammt, ist die Anzahl der Exkonjugate erheblich höher. Daher sollte darauf geachtet werden, dass zur Klonierung des Vektors kurz vor dem Überführen der DNA in *Streptomyces* mit einem  $\text{dam}^-/\text{dcm}^-$  *E. coli*-Derivat gearbeitet wird.

Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien hat man bei *Streptomyces* eine geringere Erfolgsrate aufgrund der oben beschriebenen Restriktionsbarrieren beobachtet. Dieses Problem kann mit Hilfe von Einzelstrang-DNA zum Teil gelöst werden. Sowohl Doppelstrang-DNA als auch Einzelstrang-DNA zeigen gleiche Raten bei der Transformation. Beim Einbringen von Einzelstrang-DNA ergab sich jedoch eine effektivere Integration in das Chromosom (HILLEMANN et al. 1991).

### 1.3.3 TEMPERATURSENSITIVE VEKTOREN

Eine weitere recht effektive und einfache Methode Plasmid-DNA von *E. coli* in Streptomyceten zu überführen ist der Ansatz mit temperatursensitiven Plasmiden, die als so genannte Shuttle-Vektoren fungieren. Diese Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in *Streptomyces* repliziert werden, dass sie für beide Organismen eine *ori* besitzen. Die allgemeine Konstrukt-Klonierung findet der Einfachheit halber in *E. coli* statt.

Ein natürlich vorkommende temperatursensitive Plasmid pSG5 wurde in den 1980er Jahren in *Streptomyces ghanaensis* 5/1B entdeckt (WOHLLEBEN et al. 1986). pSG5 liegt in der Zelle mit einer Größe von ca. 12,7 kb und einer Kopienzahl von ca. 50 Kopien vor. Da die gängig benutzten *Streptomyces*-Stämme *Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces lividans* gegenüber den Antibiotika Neomycin und Thiostrepton sensitiv sind, entschied man diese Antibiotika mit den Temperatur sensitiv-relevanten DNA-Bereichen von pSG5 zu kombinieren. Daraus resultiert die Familie der pGM-Vektoren. Die pGM-Plasmide sind unterhalb einer Temperatur von 34°C stabil. Erhöht man allerdings die Temperatur über 36°C kommt es zur Integration des Plasmids in das Chromosom (ROTH et al. 1991). Unspezifische Integration in das Genom konnten nicht beobachtet werden.

Der große Vorteil dieser Vektoren-Familie ist, dass sie sich autonom eliminieren, sobald es zu besagter Temperatur-Veränderung kommt. Zellen, die auf die

Anwesenheit des Vektors bei erhöhter Temperatur, selektiert werden, zeigen, dass der Vektor ins Genom integriert hat. An sich integrieren die pGM-Plasmide nur schlecht bzw. in geringen Raten. Fügt man jedoch eine homologe Sequenz eines im Chromosom befindlichen DNA-Abschnittes ein, kommt es zur Integration via homologer Rekombination. Stellt diese Sequenz ein Gen dar, kann es gezielt zum Knock-Out des chromosomalen Gens bzw. zur Einführung einer Mutation kommen (MUTH et al. 1989).

Nach Transformation des Plasmids pGM160 und initialem Wachstum bei 28°-30° C wird die Integration des Plasmids durch homologe Rekombination durch eine Wachstumstemperaturerhöhung auf 37°-39° C initiiert. Diese Temperatur erlaubt es nicht, dass sich der Vektor in *Streptomyces* repliziert. Bei Double-Crossover-Experimenten empfiehlt es sich mehrere Runden bei erhöhter Temperatur wachsen zu lassen. Die Abwesenheit des Vektor selektierenden Antibiotikums, z.B. Thiostrepton, ermöglicht die Identifikation der Thiostrepton-Kolonien, bei denen ein Double-Crossover und damit eine vollständige homologe Rekombination des gewünschten Gens, stattgefunden hat. Temperatursensitive Replikons können bei der Double-Crossover- und In-Frame-Deletions-Methode zum Einsatz kommen, beim Single-Crossover jedoch nur bedingt. Da bei einem Temperaturrückgang das Plasmid wiederum aus dem Chromosom heraus geschnitten werden kann, muss die Identifikation der Klone bei fortwährend 37° C erfolgen.

Ca. 80% der Zellen beinhalten nach einer Temperaturverschiebung zu höheren Temperaturen ein in das Chromosom integriertes Plasmid. Bei einer erneuten Temperaturabnahme kann es gezielt zur Desintegration der Plasmide kommen. Daher sind die Mutanten ohne Selektionsdruck durch erhöhte Temperatur bzw. ein Antibiotikum relativ instabil. Dieses Problem tritt weniger bei nicht-replizierenden Plasmiden auf, bei denen nach Selektion eine stabile Mutante garantiert ist. Bei Double-Crossover-Ereignissen und damit der vollständigen Substitution des Gens findet man jedoch relativ stabile Mutanten. Das zweite Rekombinationsereignis wird durch einen starken Selektionsdruck herbeigeführt. Experimente zum Vergleich der Single- und Double-Crossover-Rate ergaben, dass mehr als 50% in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer zu einem Double-Crossover führten (WOHLLEBEN et al. 1994).

Eventuell kann es bei der Integration zur Integration mehrerer Kopien kommen. Warum das der Fall ist, scheint noch nicht geklärt zu sein (WOHLLEBEN et al. 1994).

## II. AUFGABENSTELLUNG

Die Gattung *Streptomyces* bietet ein optimales Expressionssystem zur heterologen Expression von Proteinen. Im Gegensatz zu *E. coli* besitzen Streptomyceten die Fähigkeit zur Sekretion, sodass heterologe Expressionsprodukte direkt aus dem Medium geerntet werden könnten. Speziell der Stamm *Streptomyces lividans* TK24 bietet aufgrund einer fehlenden Restriktionsbarriere, der geringen Anzahl an eigenen Proteasen und als plasmidfreier Stamm weitere Vorteile.

Zur erfolgreichen Expression heterologer Proteine ist es essentiell, den Expressionsapparat und vor allem die Proteinfaltung im Detail zu verstehen. Ohne eine korrekte Faltung kann ein Protein bekanntermaßen seine Funktion nicht optimal bzw. gar nicht ausüben. Es ist bekannt, dass Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen hierbei eine wichtige Rolle spielen, allerdings ist nicht bekannt, ob oder inwieweit Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen für eine native Faltung essentiell sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch die Herstellung von Knockout-Mutanten mittels homologer Rekombination zur Aufklärung der Funktion von Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen beizutragen.

Es soll zunächst das eigentliche Cyclophilin-Gen mittels PCR aus dem Genom von *Streptomyces lividans* isoliert werden. Nach Sequenzierung soll in die Zielsequenz eine Apramycinresistenz-Kassette inkloniert werden, die das jeweilige Cyclophilin-Gen deaktiviert. Die Klonierungsschritte sollen bis zu diesem Schritt in *E. coli* durchgeführt werden. Zum Transfer der Knockout-Konstrukte soll ein geeigneter *E. coli-Streptomyces*-Shuttle Vektor identifiziert werden, der zum einen den Transfer in *Streptomyces* und zum anderen eine homologe Rekombination ermöglicht.

Die Knockout-Mutanten sollen schließlich darauf untersucht werden, inwieweit das fehlende Cyclophilin einen Einfluss auf den Organismus ausübt. Diese Strategie soll sowohl für Cyclophilin A1 als auch für das Cyclophilin A2 durchgeführt werden.

## III. MATERIALIEN UND METHODEN

### 3.1 GERÄTE

<b>Analysenwaage</b>	Mettler, H20T Sartorius, BP 221 S
<b>Autoklaven</b>	Fedegari, FVB und FVS H+P Labortechnik, Varioklav Steam Sterilizer
<b>Brutschränke</b>	Heraeus Christ, B 5090 E und B 5100
<b>Digitalkamera</b>	Nikon, F 301
<b>DNA-Synthesizer</b>	Perseptive Biosystems, Expedite <sup>IM</sup>
<b>Gelelektrophorese</b>	BRL-Nachbau, Elektrodenabstand: 15 cm
<b>Gefrierschränke</b>	Colora, UF 40-3000 S (-20 °C) Gesellschaft für Labortechnik (-80 °C)
<b>HPLC</b>	Merck Hitachi, L4250, L 6220, D 6000
<b>Inkubationsschüttler</b>	New Brunswick Scientific, Incubator/Shaker G25
<b>Kamera</b>	Polaroid MP4 Land Camera
<b>Kühlzentrifuge</b>	Sorvall, RC-5B mit GSA- und SS34-Rotor
<b>Magnetrührer</b>	Heidolph, MR 2002 und IKAmag RCT
<b>Mikrowellenherd</b>	Moulinex, FM 421
<b>PCR</b>	Hybaid Labsystems, PCR sprint
<b>Pipetten</b>	Eppendorf Abimed, Labmate
<b>pH-Meter</b>	Knick, Calimatic761 Schott, CG 840
<b>Spannungsgeber</b>	Biotec Fischer, Phero-stab 500
<b>Speed Vac</b>	Bachofer, Laboratoriumsgeräte
<b>Spektralphotometer</b>	Cary, 118
<b>Sterile Werkbank</b>	Heraeus, HA 2472 GS
<b>Tischzentrifuge</b>	Heraeus, Biofuge A mit Microtube Rotor
<b>Über-Nacht-Rollerinkubator</b>	New Brunswick Scientific, TC7
<b>Ultraschallbad</b>	Merck Eurolab, USR 30 H
<b>UV-Transilluminator</b>	Spectroline Transilluminator TR-302
<b>UV-Lampe (366 nm)</b>	CAMAG

Vortexer	Heidolph
<b>Waage</b>	Sartorius, Laboratory L610 Mettler PN2210
Wasseraufreinigung	Millipore, Milli-Q mit Organex-Kartusche
Wasserbäder	Gesellschaft für Labortechnik, Typ 1001 und 1002

## 3.2 CHEMIKALIEN

<b>Aceton</b>	Riedel de Haën
Acetonitril	Roth
Adenosin-Amidit	Biospring
Agarose	Roth, Pharmacia
Ammoniak	Merck
Ammoniumchlorid	Fluka
Ammoniummolybdat	Fluka
Ammoniumsulfat	Fluka
Ampicillin-Trihydrat	Fluka
Apramycinsulfat	Sigma
ATP	Boehringer Mannheim
<b>Bacto Pepton</b>	Becton Dickinson
Bacto Trypton	Becton Dickinson
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson
Bacto Agar	Becton Dickinson
Beef Extract	Difco
Borax	Fluka
Borsäure	Fluka
Bromphenolblau, Natriumsalz	Fluka
<b>Casaminoacids</b>	Difco
Calciumchlorid-Hexahydrat	Fluka
Chloroform	Fluka
Chloroform/Isoamylalkohol	Fluka
Cytosin-Amidit	Biospring
<b>Dextrin</b>	Fluka
Dimethylformamid	Fluka

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Pharmacia
<b>EDTA</b> , Dinatriumsalz	Serva
EDTA, Tetranatriumsalz	Serva
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	Fluka
Eisensulfat-Heptahydrat	Fluka
Eisessig	Fluka
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Merck
<b>Glucose</b> -Monohydrat	Fluka
Glycin	Fluka
Glycerin	Merck
Guanosin-Amidit	Biospring
<b>IPTG</b>	Fluka
Isoamylalkohol	Fluka
Isopropanol	Fluka
<b>Kalium</b> acetat	Fluka
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
di-Kaliumhydrogenphosphat	Fluka
Kaliumsulfat	Fluka
Kupfer(II)-chlorid-Heptahydrat	Fluka
<b>Lab Lemco Powder</b>	Becton Dickinson
L-Prolin	Sigma
<b>Magnesium</b> chlorid-Hexahydrat	Fluka
Magnesiumsulfat-Heptrahydrat	Fluka
Maleinsäure	Fluka
Malt Extract Broth	Difco
Mangan(II)-Chlorid	Fluka
Mannitol	Fluka
<b>Natrium</b> acetat	Fluka
Natriumchlorid	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Fluka
di-Natridumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fluka
Natriumhydroxid	Fluka

Natriumtetraborat-Decahydrat	Serva
Phenol	Fluka
Phenol/Chloroform	Roth
PEG 6000	Fluka
Saccharose	Fluka
Salzsäure, konz.	Fluka
SDS	Fluka
Sojamehl	Reformhaus
Sucrose	Fluka
TEAA	Fluka
TES	Fluka
Thiostrepton	Fluka
Thymidin-Amidit	Biospring
Tris	Serva
Triton X-100	Fluka
Tween 20	Fluka
Tween 80	Roth
X-Gal	Fluka
Xylencyanol FF	Merck
Zink(II)-chlorid	Fluka

### 3.3 ENZYME UND MARKER

100 bp-DNA-Marker	New England BioLabs
1 kb-DNA-Marker	New England BioLabs
$\lambda$ -DNA mit <i>Bst</i> EII verdaut	New England BioLabs
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England BioLabs
GC-rich DNA-Polymerase	Roche
Herkulase Hotstart DNA-Polymerase	Stratagene
HotMaster™ Taq DNA-Polymerase	Eppendorf
Klenow-Fragment	New England BioLabs
Lysozym	Serva
MasterAmp™ Extra Long DNA-Polymerase	Epicerentre
MasterTaq	Eppendorf
Pfu-DNA-Polymerase	New England BioLabs

Proteinase K	Fluka
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Roche
RNase A	Quiagen
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs
T4-DNA-Polymerase	New England BioLabs
T4-Polynukleotid-Kinase	New England BioLabs
Taq-DNA-Polymerase	New England BioLabs
Triple Master™ DNA-Polymerase	Eppendorf
Vent-DNA-Polymerase	New England BioLabs

### 3.4 STÄMME

Spezies	Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> K12	DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r $\kappa$ <sup>-</sup> , m $\kappa$ <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ -, <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	HANAHAN, 1983
<i>Escherichia coli</i> K12	HB101	F <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>hsdS20</i> (r $\beta$ <sup>-</sup> , m $\beta$ <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> (str <sup>r</sup> ), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i>	LACKS et al., 1977
<i>Escherichia coli</i> K12	JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsoR17</i> (r $\kappa$ <sup>-</sup> , m $\kappa$ <sup>+</sup> ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta$ ( <i>lac-</i> <i>proAB</i> ), [F <sup>'</sup> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15]	YANISCH- PERRON et al., 1985
<i>Escherichia coli</i> K12	JM110	<i>rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ), <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), [F <sup>'</sup> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15]	YANISCH- PERRON et al., 1985
<i>Escherichia coli</i> K12	M15	<i>LacZ</i> , <i>ara</i> , <i>gal</i> , <i>mtl</i> , F, <i>pRep4</i>	VILLAREJO et al., 1974
<i>Streptomyces lividans</i> 66	TK 24	<i>str</i> <sup>b</sup>	(KIESER et al., 2000)

Tab. 3.1: Liste der verwendeten Stämme von *E.coli* und *Streptomyces lividans*

### 3.5 PLASMIDE

Bezeichnung	Verwendungszweck	Resistenz	Referenz / Hersteller
pGemT-Easy	Klonierung	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Promega
pGemTcypA1	Sequenzierung des Fragments 519	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pGemT1066	Sequenzierung des Fragments 1066	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pGemT750	Sequenzierung des Fragments 750	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pGemT334	Sequenzierung des Fragments 334	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pGemT1052 (CypA1)	Sequenzierung des Fragments 1052	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pGemT2101	Sequenzierung des Fragments 442	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pGemT1475	Sequenzierung des Fragments 1475	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pGemT442	Sequenzierung des Fragments 1052	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pGemT1052 (CypA2)	Sequenzierung des Fragments 1192	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pGemT1192	Sequenzierung des Fragments 2101	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pUC19	Klonierung	Amp <sup>R</sup> , lacZ	New England Biolab
pUC1052	Klonierung	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pUC442+1052	Klonierung	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit

pUC442+105apr2	Klonierung	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pUC1192	Klonierung	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pUC2101	Klonierung	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pUCΔCypA1apr+/-	Klonierung	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pUCΔCypA2apr+/-	Klonierung	Amp <sup>R</sup> , lacZ	Diese Arbeit
pGM160	Shuttle-Vektor zwischen <i>E.coli</i> und Streptomyceten	Tsr <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup>	Muth et al., 1989
pGM160del	Shuttle-Vektor zwischen <i>E.coli</i> und Streptomyceten	Tsr <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Muth et al., 1989
pGMΔCypA1apr+/-	Integration	Tsr <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pGMΔCypA2apr+/-	Integration	Tsr <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pApr	Apramycin-Resistensgen	Apr <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pQE30	Überexpression	Amp <sup>R</sup>	Quiagen
pQECypA1	Überexpression	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pQECypA2	Überexpression	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit

Tab. 3.2: Liste der verwendeten und klonierten Plasmide

## 3.6 PRIMER

Bezeichnung	Sequenz (5'→3)	Länge [bp]	Tm [°C]	Erklärung
1Au1	<u>CAC AAT GGA TCC</u> ATG AGC AAT TCC AAG GTT TAC TTC G	37	70	CypA1for <i>Bam</i> HI
1Au2	<u>TGA TCA AAG CTT</u> ACA GCT TGC CGG ACG CGC	30	70	CypA1rev <i>Hind</i> III
1Au3	<u>ACC GGC GAA TTC</u> ACC TCG GCC GAC GCC G	28	66	CypA1for <i>Eco</i> RI
1Au4	CGT TCG CCA TGG ACA GGA GG	20	66	CypA1rev <i>Nco</i> I
1Au5	TCC TGT CCA TGG CGA ACG CG	20	64	CypA1for <i>Nco</i> I
1Au6	<u>CCA CAG AAG CTT</u> GCC GAG CAG GAA CGG CG	29	68	CypA1rev <i>Hind</i> III
1Au7	GTG ACG GGT GAC CCC CG	17	60	CypA1rev <i>Bst</i> EII
1Au8	ACC GGG GGT CAC CCG TC	17	60	CypA1for <i>Bst</i> EII
1Au9	ACG ACG GTG CAC GCC TAC	18	60	CypA1for <i>Apa</i> LI
1Au10	CGC ACC ACC CGG CGC ACC C	19	66	CypA1rev <i>Psh</i> AI
1Au11	GGG TGC GCC GGG TGG TGC G	19	70	CypA1for <i>Psh</i> AI
1Au12	TAG GCG TGC ACC GTC GTC	18	60	CypA1rev <i>Apa</i> LI
2Au1	<u>GGA AGG GGA TCC</u> GTG GCC GCG CAG CTC TAC GC	32	70	CypA2for <i>Bam</i> HI
2Au2	<u>TGT GGC AAG CTT</u> TCA GGC GTT CCT TGT CTC GAC	33	68	CypA2rev <i>Hind</i> III
2Au3	<u>CGA GCG GAA TTC</u> AGC GGG GCT CGT CGC CC	29	68	CypA2for <i>Eco</i> RI

2Au4	GAT GGT GTC GAC GAC CTT CTG	21	66	CypA2rev <i>SalI</i>
2Au5	AAG GTC GTC GAC ACC ATC GC	20	64	CypA2for <i>SalI</i>
2Au6	<u>GAC CTG AAG CTT</u> CAC TGG TCA GCG ACA GGG GG	32	68	CypA2rev <i>HindIII</i>
2Au7	GTC CGT ACG CGT CTG GCC	18	62	CypA2rev <i>MluI</i>
2Au8	GGC CAG ACG CGT ACG GAC	18	62	CypA2for <i>MluI</i>
2Au9	CCC TCG CAT GCC TGG CG	17	60	CypA2rev <i>SphI</i>
2Au10	CGC CAG GCA TGC GAG GG	17	60	CypA2for <i>SphI</i>
1AuHRfor	CGT CAC AAT GGT GCG ATG AG	20	62	HR- Kontrolle CypA1
1AuHRrev	TGG ACG ACG AGC CGT TCG AT	20	64	HR- Kontrolle CypA1
2AuHRfor	AGC CAA GGT GAC ATC GAG GT	20	62	HR- Kontrolle CypA2
2AuHRrev	GCG CCA GAA TGT GTC AGA GA	20	62	HR- Kontrolle CypA2
Au1	GAA TTC CCG GGG ATC	15	48	Apr for/rev <i>SmaI</i>
Au2	CGA GAA GTT CGC GGA CG	17	67	Apr+
Au3	AGA GCA GGC GCT TGA AG	17	67	Apr-

**Tab. 3.3: Primer**

Unterstrichen sind Überhänge dargestellt. Diese werden bei der Berechnung des T<sub>m</sub>-wertes nicht berücksichtigt. Kursiv dargestellt sind solche Basen, die eine Restriktionsschnittstelle durch Mutation generieren.

## 3.7 PUFFER UND LÖSUNGEN

### 3.7.1 PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR ISOLIERUNG PLASMIDISCHER DNA AUS *ESCHERICHIA COLI*

#### TEG-Lösung

0,99 g	Glukose x H <sub>2</sub> O	
2,5 ml	1M Tris/HCl, pH 8	
2 ml	0,5 M EDTA, pH 8	in 1 l A. dem. lösen. Autoklavieren.

#### 0,2M NaOH/1% SDS

25 ml	10%ige SDS-Lösung	
50 ml	0,2 N NaOH	mit A. dem. auf 250 ml auffüllen.

#### 3M KOAc, pH 5,2

73,61 g	KOAc	mit A. dem. auf 250 ml auffüllen. pH-Wert mit Eisessig einstellen.
---------	------	--

#### Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

144 ml	Chloroform	
6 ml	Isoamylalkohol	zusammengeben.

#### 0,5M EDTA, pH 8

18,6 g	Na <sub>2</sub> EDTA	in 84,6 ml A. dem. lösen.
5 ml	10 N NaOH-Lsg.	Zugeben.

#### TE-Puffer

10 ml	1M Tris-HCl, pH 8	
4 ml	0,5M EDTA, pH 8	mit A. dem. auf 1 l auffüllen. Aliquotieren. Autoklavieren.

### 3.7.2 PUFFER UND LÖSUNG ZUR PRÄZIPITATION VON DNA

#### 3 M NaOAc, pH 4,8

40,8 g	NaOAc x 3 H <sub>2</sub> O	in 74,7 ml A. dem. lösen.
8,25 ml	Eisessig	zugeben.

#### 10M NH<sub>4</sub>OAc

770 g	NH <sub>4</sub> OAc	in 331 ml A. dem. lösen.
-------	---------------------	--------------------------

#### 5M NaCl

292 g	NaCl	in 897 ml A. dem. lösen.
-------	------	--------------------------

### 3.7.3 PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR GELELEKTROPHORESE

#### 50 x TAE-Puffer

48,4 g	Tris	
11,42 ml	Eisessig	
20 ml	0,5M EDTA	mit A. dem. auf 200 ml auffüllen. Autoklavieren.

#### 10 x TBE-Puffer

60,5 g	Tris	
25,5 g	Borat	
1,85 g	Na <sub>2</sub> EDTA	mit A. dem. auf 500 ml auffüllen. Autoklavieren.

#### 10 x Probenladepuffer (Agarosegelelektrophorese)

0,12 g	Tris-HCl, pH 7	
0,037 g	EDTA	
40 g	Sucrose	
0,5 g	SDS	
0,25 g	Bromphenolblau	mit A. dem. auf 50 ml auffüllen.

#### Ethidiumbromid-Lsg.

1 g Ethidiumbromid in 100 ml A. dem. lösen. In dunkler Flasche bei 4°C lagern.

10 x Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)

250 mM Tris-HCl

0,1 % SDS

1,94 M Glycin pH 8,3

zusammengeben und bei 4 °C lagern.

2 x SDS-Probenpuffer

100 mM Tris-HCl

4 % SDS

0,2 % Bromphenolblau

20 % Glycerin

0,85 M  $\beta$ -Mercaptoethanol pH 6,5

zusammengeben und bei 4 °C lagern.

### 3.7.4 PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR BLAU-WEIß SELEKTION

0,1 M IPTG-Stammlösung

0,6 g

IPTG

mit A. dem. auf 25 ml auffüllen. Steril filtrieren. Bei 4 °C lagern.

Pro Platte werden 20  $\mu$ l Stammlösung ausplattiert.

X-Gal-Stammlösung

100 mg

X-Gal

in 2 ml DMF lösen. Dunkel bei -20 °C lagern.

Pro Platte werden 100  $\mu$ l Stammlösung ausplattiert.

### 3.7.5 PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR PROTOPLASTENPRÄPARATION

Protoplasten-Puffer

Lösung A:

Sucrose 103 g

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 g

MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 2,02 g

Spurenelement-Lsg. 2 ml in 800 ml A. dem. lösen.

Lösung A in 80 ml Aliquots aufteilen. Autoklavieren.

Kurz vor Gebrauch werden folgende sterile Lösungen dazu gegeben:

0,5 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 ml

3,68 % CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 10 ml

5,73 % TES-Puffer; pH 7,2 10 ml

### Lyse-Puffer

Folgende sterile Lösungen werden zusammengegeben.

100 ml	10,3% Sucrose
10 ml	5,73% TES-Puffer, pH 7,2
1 ml	2,5% K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,2 ml	Spurenelement-Lösung
1 ml	0,5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,1 ml	2,5M MgCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O
1 ml	0,25M CaCl <sub>2</sub>

Kurz vor Gebrauch 1 mg/ml Lysozym zugeben. Steril filtrieren.

### 35%ige PEG 6000-Lsg.

PEG 6000	35 g	in 65 ml Protoplasten-Puffer lösen. Steril filtrieren.
----------	------	--

## 3.7.6 PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR TRANSFORMATION IN *STREPTOMYCES LIVIDANS*

### Transformations-Puffer

Lösung A besteht aus folgenden sterilen Lösungen:

25 ml	20,3%igen Sucrose-Lsg.	
0,2 ml	Spurenelement-Lsg.	
1 ml	2,5%ige K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Lsg.	in 75 ml sterilem A. dem. lösen.

### Lösung B:

Zu 9,3 ml Lösung A werden folgende sterile Lösungen zugegeben.

0,2 ml	5M CaCl <sub>2</sub> -Lsg.
0,5 ml	1M Tris-Maleat-Puffer, pH 8

Kurz vor Gebrauch 3 Volumenanteile der Lösung B und ein Gewichtsanteil PEG 1000 zusammengeben und steril filtrieren.

### 1M Tris-Maleat-Puffer, pH 8

121,1 g	Tris mit A. dem. auf 1 l auffüllen. Mit Maleinsäure auf pH 8 einstellen.
---------	--

### 3.7.7 PUFFER UND LÖSUNG ZUR PCR

#### dNTP-Mix

62,5 µl                    100 mM Stammlsg. von jeweils A, T, C, G entnehmen und mit  
750 µl                    A. dem. auf 1 ml auffüllen. In 100 µl Aliquots bei -20 °C lagern.

### 3.7.8 PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS *STREPTOMYCES LIVIDANS*

#### TSE-Puffer

10,3 g                    Saccharose                    mit A. dem. auf 82,5 ml auffüllen.  
Autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren werden folgende sterile Lösungen hinzugegeben:

2,5 ml                    1M Tris-HCl, pH 8  
5 ml                    0,5M EDTA, pH 8

#### B1-Puffer

50 mM                  Tris pH 8,0  
10 mM                  EDTA  
0,5%                    Triton X-100  
0,5%                    Tween 20  
10 mg                  Rnase auf 100 ml B1-Puffer                    RNase in 0,5 ml A. dem. lösen.  
20 min im Wasserbad kochen.

#### B2-Puffer

57,32 g                  Guanidiniumchlorid                    in 140 ml A. dem. lösen.  
40 ml                    100%ige Tween 20-Lsg.                    Zusetzen. Auf 200 ml auffüllen.

### 3.7.9 PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR HERSTELLUNG KOMPETENTER *E. COLI*

#### 70 mM CaCl<sub>2</sub>-Glycerin-Lösung

146 g                    Glycerin                    mit 70 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung auf 1l auffüllen.  
Aliquotieren. Autoklavieren.

### 3.7.10 SONSTIGE PUFFER UND LÖSUNGEN

#### NaCl-Lsg.

NaCl	A. dem.	Molarität
292 g	897 ml	5M
54,4 g	984 ml	1M
38,1 g	989 ml	0,7M

Autoklavieren.

#### 1 M Tris-HCl-Puffer

pH	Tris-Base	conc. HCl	A. dem.
7,2	121 g	76,1 ml	817 ml
7,5	121 g	69,1 ml	824 ml
8,0	121 g	48,3 ml	845 ml

Autoklavieren.

#### Na-Phosphat-Puffer

(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                    6.90 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

NaCl 17.54 g                NaCl

10 mM Imidazol    0.68 g Imidazol    mit NaOH auf einen pH von 8 einstellen.

## 3.8 MEDIEN ZUR ANZUCHT VON *E. COLI*

#### LB-Medium (verändert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Für Flüssigmedien

Trypton                    10 g

Yeast-Extract            5 g

NaCl                        5 g                    in 800 ml A. dest. aufnehmen.

20 Tropfen 5N NaOH                    zufügen und auf 1l auffüllen. Autoklavieren.

Für Festmedien zusätzlich 15 g Agar zusetzen. Autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren auf ca. 60°C abkühlen lassen und gegebenenfalls mit Ampicillin-Stammlösung versetzen.

SOC-Medium

Tryptone	2 g	
Yeast-Extract	0,5 g	
1M NaCl	1 ml	
1M KCl	0,25 ml	in 97 ml A. dem. aufnehmen. Mit 5N NaOH auf pH 7 einstellen. Autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren auf ca. 60 °C abkühlen lassen und

Mg <sup>2+</sup> -Stammlsg.	1 ml	
2M Glukose-Lsg.	1 ml	zusetzen.

Mg<sup>2+</sup>-Stammlösung

MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	101,5 g	
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	123,3 g	in 500 ml A. dem. aufnehmen. Steril filtrieren.

2M Glukose-Lösung

Glukose	180,16 g	in 500 ml A. dem. lösen. Steril filtrieren. Bei -20 °C lagern.
---------	----------	--

## 3.9 MEDIEN ZUR ANZUCHT VON *STREPTOMYCES LIVIDANS*

### 3.9.1 NÄHRMEDIEN ZUR TRANSFORMATION VON PROTOPLASTEN

R2YE-Medium

**Lösung A:**

Saccharose	103 g	
Glucose	10 g	
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	10,12 g	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g	
Casaminoacids	0,1 g	in 800 ml A. dem. lösen (Endvolumen > 800 ml!)

Lösung B:

Lösung A mit 22g Bacto Agar versetzen. Autoklavieren.

Lösung C:

Die sterile Lösung B wird auf ca. 60°C temperieren und mit folgenden sterilen Lösungen ergänzen:

0,5 % (w/v) $\text{KH}_2\text{PO}_4$	10 ml
3,68 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	80 ml
20 % (w/v) L-Prolin	15 ml
5,73 % (w/v) TES-Puffer; pH 7,2	100 ml
Spurenelement-Lsg.	2 ml
1N NaOH	5 ml
10 % (w/v) Yeast Extract	50 ml

5,73% (w/v) TES-Puffer; pH 7,2

45,84 g TES in 600 ml A. dem. lösen und mit 5 N NaOH auf pH 7,2 einstellen. Auf 800 ml mit A. dem. auffüllen und in 100 mL-Aliquots autoklavieren.

Spurenelement-Lösung

$\text{ZnCl}_2$	40 mg	
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	200 mg	
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	10 mg	
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	10 mg	
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$	10 mg	
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$	10 mg	mit A. dem. auf 1l auffüllen. Autoklavieren oder steril filtrieren.

### 3.9.2 NÄHRMEDIUM ZUR SPORENBILDUNG UND FÜR SCHNELLES WACHSTUM

MS-Medium (Mannitol-Sojamehl-Medium) mit  $\text{MgCl}_2$ 

Mannitol 20 g mit A. dest. auf 1l auffüllen. In 500ml-Blaukappenflaschen mit der entsprechenden Menge Agar und Sojamehl aufteilen.

Agar 20 g

Sojamehl (aus dem Supermarkt) 20 g

15 min autoklavieren. Vorsichtig Schütteln. Nochmals 15 min autoklavieren. Nach dem Autoklavieren 10 ml 1M  $\text{MgCl}_2$ -Lgs. Zusetzen.

### 3.9.3 NÄHRMEDIUM ZUR BESTIMMUNG DES SPORENTITERS

#### NL 701-Medium

Bacto Agar	22 g	
Dextrin	15 g	
Tryptic Soy Broth	5 g	
Saccharose	3 g	
Yeast Extract	2 g	
Beef Extract	1 g	
NaCl	0,5 g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g	
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g	
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10 mg	auf 1 L mit A. dem. Auffüllen. Autoklavieren.

Nach dem Abkühlen mit Antibiotika supplementieren.

### 3.9.4 NÄHRMEDIUM ZUR VORKULTIVIERUNG

#### φ-Medium

MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.5 g	
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.74 g	
Glucose	10 g	
Tryptone	5 g	
Yeast Extract	5 g	
Lab Lemco powder	5 g	mit A. dem. auf 800 ml auffüllen. Mit 1N NaOH auf pH 7,2 einstellen. Autoklavieren.

### 3.9.5 NÄHRMEDIUM ZUR PRÄPARATION VON PROTOPLASTEN

#### YEME-Medium

Sucrose	340 g	
Glucose x H <sub>2</sub> O	10 g	
Bacto Trypton	5 g	
Yeast Extract	3 g	
Malt Extract Broth	3 g	Mit A. dem. auf 1l auffüllen. Autoklavieren und mit 2 ml einer sterilen 2,5 M MgCl <sub>2</sub> -Lsg. versetzen.

YEME-Flüssigmedium mit 0,5 % Glycin (w/v)

Wie oben beschrieben, aber in 973 ml A. dem. lösen. Autoklavieren und mit 25 ml einer sterilen 20 % (w/v) Glycin-Lsg., als auch 2 ml 2,5 M MgCl<sub>2</sub>-Lsg. versetzen.

2,5 M MgCl<sub>2</sub>-Lsg.

50,83 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O mit A. dem. auf 100 ml auffüllen. Autoklavieren.

### 3.9.6 NÄHRMEDIEN ZUR ANZUCHT

MM-Medium (Minimal-Medium)

Das Medium wird aus folgenden sterilen Lösungen zusammengestellt:

A. dem.	249 ml
20 % (w/v) Glucose-Lsg.	250 ml
10 % (w/v) Casaminoacids-Lsg.	200 ml
300 mM Phosphatpuffer; pH 6,9	50 ml
100mM MgSO <sub>4</sub>	30 ml
20 % (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Lsg.	10 ml
Spurenelement-Lösung	1 ml

Mit Antibiotikum supplementieren.

100mM MgSO<sub>4</sub>-Lsg.

1,2 g mit A. dem. auf 100 ml auffüllen. Autoklavieren.

300mM Phosphatpuffer; pH 6,9

29,12 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
18,36 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	mit A. dem. auf 1 l auffüllen. Autoklavieren.

R2-Medium

Sucrose	103 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,12 g
Glucose	10 g
casaminoacids	0.1 g
yeast extract	1 g
Lab Lemco Powder	5 g

TES (pH 7.2, 0.25M) 100 mL  
 Spurenelement-Lsg. 2 mL  
 0,5 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lsg. 10 mL mit A. dem. auf 400 ml auffüllen. Mit 8,8 g  
 Agar versetzen. Autoklavieren.

Kurz vor Gebrauch 1/100 Vol. 66,8% CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O-Lsg. Und 1/1000 Vol. 2 mM  
 CuSO<sub>4</sub>-Lsg. zugeben.

### 3.9.7 NÄHRMEDIUM ZUR ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA

#### S-Medium

Peptone 5 g  
 Yeast Extract 4 g  
 MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,5 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g in 800 ml A. dem. lösen. In 3 x 266 ml teilen.  
 Autoklavieren.

Mit je 50 ml Glukose-Lsg. und 0,8% Glycin (Endkonzentration) versetzen.

#### Glukose-Lösung

Glukose 10 g in 150 ml A. dem. lösen. Autoklavieren.

#### Glycin-Lösung

Glycin 20 ml in 80 ml A. dem. lösen. Autoklavieren.

## 3.10 ANZUCHTBEDINGUNGEN UND STAMMHALTUNG FÜR *E. COLI*

### 3.10.1 STAMMHALTUNG

Zur längerfristigen Stammhaltung werden 750 µl einer Über-Nacht-Kultur mit einer  
 250 µl 80%igen Glycerin-Lösung versetzt und bei -80°C aufbewahrt. Diese Zellen  
 können mehrmals zum Animpfen von frischen Über-Nacht-Kulturen verwendet  
 werden.

Zur kurzfristigen Stammhaltung wurden Transformationsplatten mit Parafilm abgedichtet und für ca. 4 Wochen bei 4 °C gelagert.

### 3.10.2 TRANSFORMATION MIT PLASMIDEN BZW. LIGATIONSANSÄTZEN

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und auf 50 µl aliquotiert. Es werden 3-5 µl Plasmid bzw. Ligationsansatz zugesetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen werden die Zellen für 20 min auf Eis belassen. Um einen Hitzeschock und damit die Aufnahme der DNA in die Zelle zu erzeugen werden die Transformationsansätze für 45 sec in ein 42 °C warmes Wasserbad getaucht. Danach werden die Ansätze nochmals 5 min auf Eis belassen. Anschließend werden 900 µl 37 °C warmen SOC-Medium (ohne Antibiotikum) hinzu gegeben und die Ansätze bei 37 °C für 30-45 min im Rollinkubator inkubiert. Hierbei haben die Zellen Gelegenheit die Antibiotika-Resistenz auszubilden und ihre Zellwand zu regenerieren. Die Transformationsansätze werden anschließend auf vorgetrocknete LB-Platten (mit Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### 3.10.3 ÜBER-NACHT-KULTUREN

Ein Reagenzglas wird mit 2-5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum befüllt. Das Medium wird mit einem Klon einer Transformationsplatte beimpft und über Nacht im Rollinkubator bei 37 °C bebrütet.

### 3.10.4 PRÄPARATION VON KOMPETENTEN ZELLEN NACH DER CACL<sub>2</sub>-METHODE

#### 3.10.4.1 ANZUCHT

In einem 1 L-Schüttelkolben werden 200 mL LB-Medium mit 2 mL einer frischen Über-Nacht-Kultur eines *E.coli*-Stammes (HB101, DH5α, JM109, JM110) beimpft. Die Kulturen werden bei 37 °C und 250 rpm im Inkubationsschüttler bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,3 - 0,4 angezogen.

### 3.10.4.2 PRÄPARATION

Das Wachstum wird sofort durch Eiskühlung unterbrochen. Die Kultur wird in einen Zentrifugenbecher überführt und die Zellen bei 4°C und 5000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und die Zellen auf Eis mit 10 ml eiskalter 70 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung durch Invertieren mit einer 5 ml-Pipette resuspendiert. Die Suspension wird mit der 70 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung auf 100 ml aufgefüllt und die Zellen wie zuvor bei 4°C und 5000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Nach erneutem Resuspendieren in insgesamt 100 ml eiskalter 70 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung stehen die Zellen für 45 min im Kühlraum auf Eis. Es wird erneut bei 4°C und 5000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands werden die Zellen vorsichtig in 10 ml 70 mM CaCl<sub>2</sub>-Glycerin-Lösung aufgenommen. Im Kühlraum wird die Zellsuspension zu 200µL-Aliquots in Eppendorfcaps abgefüllt und in einem Bad aus flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

### 3.10.5 BESTIMMUNG DER TRANSFORMATIONS-KOMPETENZ

Zur Bestimmung der Transformationskompetenz wird eine Transformation mit 1 µg eines geschlossenen Plasmids nach dem allgemeinen Protokoll durchgeführt. Direkt vor dem Ausplattieren werden 10<sup>-1</sup>-10<sup>-4</sup>-Verdünnungen mit SOC-Medium angesetzt und die 10<sup>-2</sup>-10<sup>-4</sup>-Verdünnungen ausplattiert.

### 3.10.6 ISOLIERUNG PLASMIDISCHER DNA

#### 3.10.6.1 PLASMIDISOLIERUNG

Eine bebrütete 5 ml Über-Nacht-Kultur wird in ein Cap gefüllt und bei 10.000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Mit der restlichen Kultur wird erneut wie oben beschrieben verfahren. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 200 µl TEG-Lösung resuspendiert. TEG destabilisiert die Zellwand und initiiert die Zellyse. Danach werden 300 µl 0,2M NaOH/ 1%SDS zugesetzt und vorsichtig gemischt. Anschließend werden 300 µl 3M KOAc zugegeben und kräftig geschüttelt. Der weiße Niederschlag wird mittels Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein Cap mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) überführt und kurz geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die wässrige Oberphase abgenommen und in ein Cap mit gleichem Volumen an Isopropanol überführt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT für 10 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 500 µl

70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13.000 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird vollständig vom Ethanol befreit und bei RT trocknen gelassen. Nach dem Trocknen wird es in 50 µl TE-Puffer gelöst.

### 3.10.6.2 PLASMIDISOLIERUNG MIT DEM QIAPREP® SPIN MINIPREP KIT

Eine bebrütete 5 ml Über-Nacht-Kultur wird in ein Cap gefüllt und bei 10.000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Mit der restlichen Kultur wird erneut wie oben beschrieben verfahren. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Es werden 250 µl P2-Puffer zugegeben und vorsichtig gemischt. Danach werden 350 µl N3-Puffer zugegeben und die Lösung mehrmals invertiert. Der auftretende weiße Niederschlag wird in einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wird in eine QIAprepSpin-Column überführt und für 30-60 sec bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Danach werden 500 µl PB-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 30-60 sec bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Durchlaufs werden 750 µl PE-Puffer auf die Säule aufgetragen und für 30-60 sec bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Um den Waschpuffer vollständig zu entfernen wird erneut für 30-60 sec bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Die Säule wird in ein Eppendorfcap überführt und dort mit 50 µl EB-Puffer versetzt. Nach 1 min wird die DNA von der Säule mittels Zentrifugation für 30-60 sec bei 13.000 rpm und RT eluiert.

### 3.10.6.3 PLASMIDISOLIERUNG MIT DEM NUCLEOSPIN® PLASMID VON MACHERY-NAGEL

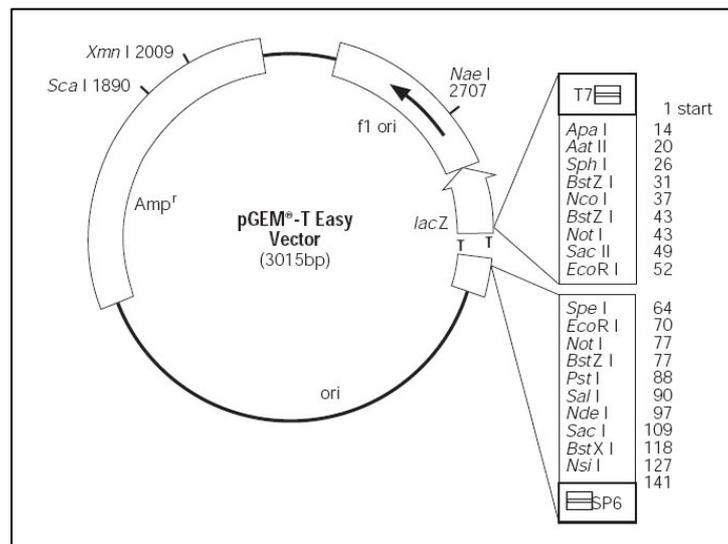
Eine bebrütete 5 ml Über-Nacht-Kultur wird in ein Cap gefüllt und bei 10.000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Mit der restlichen Kultur wird erneut wie oben beschreiben verfahren. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 250 µl A1-Puffer resuspendiert. Es werden 250 µl A2-Puffer zugegeben und vorsichtig gemischt. Danach werden 350 µl A3-Puffer zugegeben und die Lösung mehrmals invertiert. Der auftretende weiße Niederschlag wird in einer 10 minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wird in eine NucleoSpin®-Column überführt und für 1 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Danach werden 500 µl AW-Puffer auf die

Säule gegeben und erneut bei für 1 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Durchlaufs werden 600 µl A4-Puffer auf die Säule aufgetragen und für 1 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Um den Waschpuffer vollständig zu entfernen wird erneut für 1 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Die Säule wird in ein Eppendorfcap überführt und dort mit 50 µl AE-Puffer versetzt. Nach 1 min bei RT wird die DNA von der Säule mittels Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm und RT eluiert.

### 3.10.7 BLAU-WEIß-SELEKTION / PGEMT-EASY-SYSTEM

Die Blau-Weiß-Selektion beruht auf einem System, welches die Fähigkeit der  $\beta$ -Galaktosidase zu Hilfe nimmt, einen dem ursprünglichen Substrat Galaktose ähnlichen Farbstoff zu spalten.

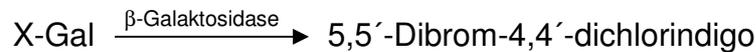
Dem Vektor pGemT-Easy wurde nach Restriktion mit *EcoRV* ein 3'-terminales Thymidin angefügt. Diese Stelle befindet sich inmitten des  $\beta$ -Galaktosidasegens. Hier ist eine Multiple Cloning Site vorhanden. Die Insertion eines DNA-Fragments über die überhängenden Thymidine verhindert die Transkription des  $\alpha$ -Peptides und erlaubt eine schnelle Selektion der rekombinanten Klone. Positive Klone können direkt aufgrund der Farbreaktion identifiziert werden.



**Abb. 3.1: Übersicht pGemT- Easy (Promega)**

An Position 60 befindet sich das 3'- überlappende Thymidin. Dieses ist innerhalb des *lacZ* angesiedelt. Um die Position befindet sich die Multiple-Cloning Site.

Wird die  $\beta$ -Galaktosidase in der Zelle exprimiert, wird dem Medium beigefügtes 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (X-Gal) abgebaut und die Kolonie färbt sich blau.



Rekombinante Klone, deren  $\beta$ -Galaktosidase-Sequenz unterbrochen worden ist, können diese nicht exprimieren und damit auch kein X-Gal abbauen. Sie erscheinen weiß. Zusätzlich zum X-Gal wird dem Nährmedium noch Isopropylthiogalaktosid (IPTG) zugegeben. Dieses Galaktose-Derivat induziert den *lac*-Promotor.

Weiterhin ist auf dem pGemT-Easy Vektor die genetische Information zur Ausbildung einer Ampicillin-Resistenz vorhanden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Klone ohne Plasmid und damit ohne die Resistenz auf der Transformationsplatte wachsen.

Die gereinigten PCR-Proben werden nach einem A-Tailing in einer Standard-Ligation mit pGemT-Easy eingesetzt.

Die Ligation mit dem pGemT-Easy Vektor wird wie folgt durchgeführt:

5 $\mu$ l	2x-Rapid Ligation Puffer
1 $\mu$ l	pGemT-Easy (Vektor); 50 ng
X $\mu$ l	Insert-DNA
1 $\mu$ l	T4-DNA-Ligase
<u>X <math>\mu</math>l</u>	<u>A. Dem.</u>
10 $\mu$ l	Gesamtvolumen

Der Ansatz wird über Nacht bei 16°C oder alternativ bei 1-3 h bei RT inkubiert und kann ohne Aufreinigung zur Transformation verwendet werden. Das Transformationsprotokoll wurde nach Standardmethode durchgeführt. LB-Ampicillin-Platten werden mit 100  $\mu$ l X-Gal-Stammlösung und 20  $\mu$ l 0,1 M IPTG-Stammlösung überschichtet. Danach werden die Platten für 30 min trocken gelassen. Der Transformationsansatz wird nach dem Trocknen aufgetragen. Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht.

## 3.11 ANZUCHTBEDINGUNGEN UND STAMMHALTUNG FÜR *STREPTOMYCES LIVIDANS*

### 3.11.1 STAMMHALTUNG

Eine längerfristige Stammhaltung von Streptomyceten erfolgt über Backups einer Sporensuspension. Dies wurde für den Stamm *Streptomyces lividans* TK24 und für die Knockout-Konstrukte durchgeführt.

Eine kurzfristige Stammhaltung erfolgt über R2YE-Platten, die bis zu einer beginnenden Sporulation bei 28 °C bebrütet werden und dann für ca. 4 Wochen bei +4 °C aufbewahrt werden können. Dabei sollten die Platten mit Parafilm abgedichtet sein. Die Kulturen sollten möglichst nicht sporulieren, da dies bei transformierten *Streptomyces lividans* zu drastischen Ausbeuteverlusten führt.

### 3.11.2 ANIMPFFEN VON KULTUREN

Die Flüssigkultivierung wurde in 300 ml-Erlenmeyerkolben durchgeführt. In den Kolben liegen nach Verwendungszweck 25 ml bis 50 ml eines Mediums vor. Die Kolben sind mit Drahtspiralen oder Glasperlen ausgestattet, um Zellen von Transformationsplatten zu lösen bzw. große Mycelklumpen zu zerschlagen.

Als Flüssigmedien werden S-Medium, Minimal-Medium, YEME-Medium und  $\phi$ -Medium verwendet. Je nach Bedarf wird mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert.

### 3.11.3 ANZUCHT VON VORKULTUREN

Mittels einer Sporensuspension (50-150  $\mu$ l) werden 5 ml  $\phi$ -Medium angeimpft und für 24-48 h bei 28 °C und 300 rpm bebrütet.

### 3.11.4 ANZUCHT VON STREPTOMYCETEN ZUR ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA

#### 3.11.4.1 AUS VORKULTUREN

50 ml S-Medium werden mit 1-2 ml einer Vorkultur angeimpft und 2-3 Tage bei 28 °C und 300 rpm bebrütet.

#### 3.11.4.2 VON TRANSFORMATIONSPLATTEN

Von einer Transformationsplatte wird mittels Impföse ein 1 cm<sup>2</sup> großes Agarosestück heraus getrennt und in 50 ml S-Medium gegeben. Die Kultur wird 2-3 Tage bei 28 °C und 300 rpm bebrütet.

#### 3.11.4.3 ANZUCHT MIT SPORENSUSPENSION

50 ml S-Medium werden mit 50-150 µl Sporensuspension angeimpft und für 24-72 h bei 28 °C und 300 rpm bebrütet.

### 3.11.5 HERSTELLUNG EINER SPORENSUSPENSION

#### 3.11.5.1 ANIMPFFEN MIT EINER VORHANDENEN SPORENSUSPENSION

Aus einer vorhandenen Sporensuspension werden mit einer Impföse R2YE-Platten beimpft und 10-14 Tage bei 28 °C bebrütet.

#### 3.11.5.2 ANIMPFFEN MIT PROTOPLASTEN

Alternativ können Protoplasten auf R2YE-Platten ausplattiert werden und 7-10 Tage bei 28 °C bebrütet werden.

#### 3.11.5.3 ANIMPFFEN MIT VORKULTUREN

Aus einer Vorkultur werden mit einer Impföse MS-Platten beimpft und 5-7 Tage bei 28 °C bebrütet.

#### 3.11.5.4 SPORENERNTE

Zur Sporenernte wird auf jede Platte 10 ml einer 0,9%ige NaCl / 0,1 %ige (v/v) Tween 80-Lösung gegeben. Danach werden die Platten mit Parafilm verschlossen und die Sporen im Ultraschallbad abgeschwemmt. Die Sporensuspension wird mit einer Pipette abgenommen und in ein Kreiner-Cap überführt. Die Sporen-Lösung wird bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wird das Pellet in 2 ml 20%iger (w/v) Glycerin-Lösung aufgenommen und resuspendiert. Die Lagerung der Sporensuspension erfolgt bei -80 °C.

### 3.11.5.5 BESTIMMUNG DES SPORENTITERS

Zur Bestimmung des Sporentiters wird eine Verdünnungsreihe in 0,9%iger (w/v) NaCl-Lösung angesetzt. Die Verdünnungen  $10^{-5}$  bis  $10^{-8}$  wird auf NL701-Platten ausplattiert und für 72 h bei 28°C bebrütet. Es sollte sich für vier Platten ein Sporentiter von  $10^9$ - $10^{10}$  ergeben.

## 3.11. 6 PROTOPLASTENPRÄPARATION

### 3.11.6.1 ANZUCHT

Mittels einer Sporensuspension werden 5 ml  $\phi$ -Medium angeimpft und für 48 h bei 28°C bebrütet. Die Kultur wird homogenisiert. 50 ml S-Medium werden mit 1-2 ml der Vorkultur angeimpft und für 24 h bei 28°C und 300 rpm inkubiert.

### 3.11.6.2 PROTOPLASTENERNTE

Die Kultur wird in ein SS 34-Röhrchen überführt und bei 5000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 15 ml eiskalter 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 10 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 15 ml eiskaltem Protoplasten-Puffer resuspendiert. Die Proben werden bei 5000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml Lyse-Puffer (1 mg Lysozym /1 ml Puffer) resuspendiert. Die Proben werden für 75 min bei 28°C und 300 rpm inkubiert. Währenddessen wird alle 10 min mit einer 5 ml-Pipette vorsichtig resuspendiert. Nach der Inkubationszeit werden 10 ml Protoplasten-Puffer hinzu gegeben und bei 1000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Hierbei sinkt das Mycel ab und die Protoplasten bleiben in Lösung. Der Überstand wird in ein weiteres Zentrifugationsröhrchen überführt und erneut bei 5000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 15 ml Protoplasten-Puffer resuspendiert. Es erfolgt eine Zentrifugation mit 5000 rpm und 4°C für 10 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 15 ml Protoplasten-Puffer resuspendiert. Die Protoplasten-Lösung wird in 500  $\mu$ l-Aliquots aliquotiert. Die Aliquots werden in einer Schale mit Eis über Nacht auf -80°C tief gefroren. Das langsame Abkühlen ist essentiell für die Transformationskompetenz. Am nächsten Tag werden die Proben in eine Schachtel überführt und bei -80°C gelagert.

### 3.11.6.3 TRANSFORMATION VON PROTOPLASTEN

Die Protoplasten werden schnell aufgetaut und in 200 µl aufgeteilt. 5 µl Plasmid werden hinzu gegeben und vorsichtig invertiert. Zu diesem Ansatz werden zügig 200 µl eiskalter Transformations-Puffer gegeben und invertiert. Der Ansatz wird 5 min bei RT belassen. 150 µl von diesem Ansatz werden auf R2YE-Platten (ohne Antibiotikum) ausplattiert und bei 28 °C für 24 h bebrütet.

Die Transformationsplatten sollten im Vorfeld mindestens 2 h bei 37 °C vorgetrocknet werden, damit der Ansatz schnell in den Agar einziehen kann. Der Detergenzien-haltige Transformations-Puffer würde ansonsten zu einer Zellyse führen.

Nach dieser Inkubationszeit wird mit dem entsprechenden Antibiotikum überschichtet. Hierzu werden 20 µl einer Thiostrepton-Stammlösung in 2 ml sterilem A. dem. suspendiert und auf der Platte verteilt. Die nachfolgende Inkubation erstreckt sich nach Verwendungszweck auf 4 bis 14 Tage.

### 3.11.6.4 BESTIMMUNG DER TRANSFORMATIONSKOMPETENZ

1 µg Plasmid werden in *Streptomyces lividans* transformiert. Es werden die Verdünnungen  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  werden ausplattiert und 48 h bei 28 °C bebrütet. Die Kolonien werden dann gezählt. Es sollen  $10^5$ - $10^6$  Kolonien pro Transformationsplatte vorhanden sein.

## 3.11.7 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS *STREPTOMYCES LIVIDANS*

### 3.11.7.1 STANDARDMETHODE

Nach 2-3 d wird 25 ml S-Medium-Flüssigkultur bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 30 ml TSE-Puffer aufgenommen. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min. Der Überstand wird verworfen. Das 50-100 mg Zellen werden in ein 2ml-Cap überführt und in 500 µl TSE-Puffer mit Lysozym (1 mg/ml) und RNase (100µg/ml) vorsichtig resuspendiert. Es wird bei 37 °C für 30 min inkubiert. Alle 10 min wird vorsichtig invertiert. Nach Zugabe von 250 µl 2%iger SDS-Lösung wird der Ansatz für 10 min auf 60 °C erhitzt. Die entstandene klare Lösung wird mit 700 µl Phenol/Chloroform versetzt und 1-2 min gevortext. Nach dem Vermischen wird die Probe bei 10000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wird

abgenommen und in ein neues Cap überführt. Es werden 150 µl TE-Puffer, pH8 und 250 µl Phenol/Chloroform zugegeben. Der Ansatz wird 1-2 min gevortext und erneut bei 10000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wird abgenommen und in ein neues Cap überführt. Es werden erneut 150 µl TE-Puffer, pH8 und 250 µl Phenol/Chloroform zugegeben. Der Ansatz wird 1-2 min gevortext und erneut bei 10000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wird abgenommen, in ein neues Cap überführt und in 0,1 Volumen 3M NaOAc, pH 5,2 und 1 Volumen Isopropanol gefällt. Der Ansatz wird bei RT für 30 min belassen. Danach erfolgt eine Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C für 30 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500 µl 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Die Probe wird bei 10000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert und bei RT getrocknet. Nach dem Trocknen wird das Pellet mit 50 µl TE-Puffer, pH 8 versetzt und über Nacht bei RT zum Lösen der DNA belassen. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

#### 3.11.7.2 MITTELS QUIAGEN MINIPREP KIT

Nach 2- 3 Tagen werden 2 ml Myzel aus 50 ml S-Medium-Flüssigkultur entnommen. Es erfolgt eine Zentrifugation mit 1000 rpm bei RT für 10 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 1 ml B1-Puffer resuspendiert. Es werden 20 µl Lysozym (100 mg/ml in A. dem.) und 45 µl Proteinase K (20 mg/ml in A. dem.) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Alle 10 min wird vorsichtig invertiert. Es werden 350 µl B2-Puffer hinzu gegeben und vorsichtig invertiert. Es wird für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Mischung wird mit 1 Volumenanteil QBT-Puffer versetzt und nach dem vorsichtigen invertieren auf eine mit 2 ml QBT-Puffer äquilibrierte Quiagen Tip-20 Säule aufgetragen. Es wird dreimal mit je 1 ml QBT-Puffer gewaschen und dann mit 3 ml QF-Puffer eluiert. Mit einem Volumenanteil von 0,7 wird mit Isopropanol gefällt. Es wird bei 14000 rpm und RT für mindestens 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 14000 rpm und RT für 15 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200-300 µl TE-Puffer aufgenommen. Über Nacht werden die Proben bei RT belassen, damit sich die genomische DNA komplett lösen kann. Alternativ kann die Probe bei 37°C für 1 h belassen werden. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 10000 rpm und RT für 5 min. Das Pellet wird verworfen. Der Überstand wird bei 4°C gelagert.

Für PCR wird eine Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:10000 angesetzt und entsprechende Verdünnung für die PCR verwendet. Die restlichen Proben werden bei -20 °C gelagert.

### 3.11.8 TRANSFORMATION UND INITIIERUNG DER HOMOLOGEN REKOMBINATION

#### 3.11.8.1 TRANSFORMATION DER KNOCKOUT-VEKTOREN

Die Protoplasten werden schnell aufgetaut und in 50 µl aufgeteilt. 5 µl Plasmid werden hinzu gegeben und vorsichtig invertiert. Zu diesem Ansatz werden zügig 150 µl eiskalter Transformations-Puffer gegeben und invertiert. Der Ansatz wird 5 min bei RT belassen. 150 µl von diesem Ansatz werden auf R2YE-Platten (ohne Antibiotikum) ausplattiert und bei 28 °C für 24 h bebrütet.

Die Transformationsplatten sollten im Vorfeld mindestens 2 h bei 37 °C vorgetrocknet werden, damit der Ansatz schnell in den Agar einziehen kann. Der Detergenzienhaltige Transformations-Puffer würde ansonsten zu einer Zellyse führen.

Nach dieser Inkubationszeit wird mit 20 µl einer Thiostrepton-Stammlösung in 2 ml sterilem A. dem. überschichtet. Es wird solange inkubiert, bis deutlich Klone zu sehen sind.

#### 3.11.8.2 ÜBERIMPFFEN AUF R2-PLATTEN

Positive Klone werden mittels einer Pipettenspitze auf R2-Platten überimpft und für 48 h bei 28 °C inkubiert.

#### 3.11.8.3 HERSTELLUNG EINER SPORENSUSPENSION

Von den R2-Platten werden einzelne Klone mittels einer Pipettenspitze in 5 ml Phagen-Medium mit 2,5 µl Thiostreptonstammlösung (50 mg/ml) überimpft. Die Inkubation erfolgt bei 28 °C und 270 rpm für 48 h.

Die Kulturen werden nach der Inkubation auf MS-Platten mit MgCl<sub>2</sub> ausplattiert und für einige Tage bei 28 °C inkubiert, bis graue Kolonien entstehen.

#### 3.11.8.4 SPORENERNTE

Zur Sporenernte wird auf jede Platte 10 ml einer 0,9%ige NaCl / 0,1 %ige (v/v) Tween 80-Lösung gegeben. Danach werden die Platten mit Parafilm verschlossen

und die Sporen im Ultraschallbad abgeschwemmt. Die Sporensuspension wird mit einer Pipette abgenommen und in ein Kreiner-Cap überführt. Die Sporen-Lösung wird bei 5000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wird das Pellet in 2 ml 20%iger (w/v) Glycerin-Lösung aufgenommen und resuspendiert. Die Lagerung der Sporensuspension erfolgt bei -80°C.

### 3.11.8.5 STIMULIERUNG DER HOMOLGEN REKOMBINATION

150 µl der Sporensuspension werden in 5 ml Phagen-Medium mit XX µl Apramycin überimpft. Die Flüssigkultur wird für 10 Tage bei 40°C und 270 rpm inkubiert.

Verdünnte Proben werden auf XX-Platten mit XX µl Apramycin aufgetragen und bei 28°C für 48 h inkubiert. Einzelne Klone werden auf Platten mit Apramycin oder Thiostrepton überstempelt. Positive Klone sollten Thiostrepton sensibel und Apramycin resistent sein. Eine weitere Überprüfung von Knockout-Mutanten wird mittels PCR durchgeführt.

## 3.12 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN

### 3.12.1 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

#### 3.12.1.1 TRENNBEDINGUNGEN

Die Fragmente werden bei der Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit und damit ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA trägt eine durch die Phosphatgruppen des Rückrats hervorgerufene negative Ladung. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle in einem elektrischen Feld hängt zum einen von der Form und zum anderen von der Anzahl der elektrischen Ladung ab.

Agarosegele bestehen aus einem komplexen Porensystem. Durch deren Öffnungen müssen die DNA-Moleküle wandern, um zur positiven Elektrode zu gelangen. Je kleiner nun ein DNA-Molekül ist, desto schneller kann sich dieses durch das Gel bewegen. Je nach Größe des Fragments kann über den Prozentsatz an Agarose im Gel die Porengröße variiert werden.

Agarose (w/v)	0,3%	0,5%	0,8%	1,0%	1,2%	1,5%	2,0%
Größe (kb)	1-70	0,7-45	0,4-20	0,3-10	0,2-8	0,2-6	0,1-5

Tab. 3.4: Agarosegehalt und mögliche Auftrennunggrößen

Das Gel wird aus der entsprechenden Menge an Agarose, 1xTAE-Puffer und Ethidiumbromid zusammengestellt:

Die Agarosemenge wird eingewogen und mit 1xTAE versetzt. In einer nicht vollständig verschlossenen Blaukappenflasche wird die Suspension in einem Mikrowellenherd für 3-5 min aufgekocht. Der Gelträger wird in der Zwischenzeit mit Klebeband abgedichtet und mit Probenkämme bestückt. In die immer noch warme Lösung werden 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) pro 100 ml 1xTAE-Puffer gegeben und vorsichtig zum Durchmischen geschwenkt. Anschließend wird die Lösung in den Gelträger gegossen.

Nach dem Erstarren des Gels wird das Klebeband entfernt, der Gelträger in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen.

Die DNA-Proben werden mit Ladungspuffer versetzt (1/5 des Gesamtansatzes), in die Taschen gefüllt und bei einer Gleichspannung von 80-130 V 1-2 h belassen.

Das für die Fluoreszenz verantwortliche Ethidiumkation wandert während der Elektrophorese zur Kathode. Daher ist es sinnvoll der Anodenkammer kurz vor dem Lauf 1-3 µl Ethidiumbromid-Stammlösung zu zusetzen.

### 3.12.1.2 DETEKTION

Die Detektion erfolgt über UV-Bestrahlung von 254-360 nm. Dabei wird der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid, der sowohl dem Puffer als auch dem Gel beigefügt ist, angeregt. Durch Interkalation in die DNA kommt es zur Verstärkung der Fluoreszenz. Daher lässt sich die DNA leicht von freiem Ethidiumbromid im Gel unterscheiden. Ethidiumbromid emittiert im orange-rotem Bereich bei 590 nm.

### 3.12.1.3 REISOLATION

Die so klein wie möglich ausgeschnittenen Gelstücke werden in einem Eppendorf-Cap ausgewogen und pro 100 mg Gel mit 300 µl NT1-Lösung versetzt. Die Caps werden für 5 – 10 min bei 50°C zum Lösen belassen. Zwischendurch wird immer wieder kurz durchmischt. Die entstandene Lösung wird in ein Filtrations-Cap gefüllt, diese in ein Auffang-Cap. Es wird für 1 min bei 10.000 rpm, RT zentrifugiert.

Die abzentrifugierte Flüssigkeit wird verworfen, das Filter-Cap mit 500 µl NT2-Lösung versetzt und bei 14.000 rpm, RT für 1 min zentrifugiert. Es folgt ein nächster Waschschrift mit 600 µl NT3-Lösung und eine Zentrifugation bei 14.000 rpm, RT, 1

min. Danach wird noch einmal mit 200 µl NT3-Puffer versetzt und für 2 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert, um alle Flüssigkeitsreste vollständig von der Membran zu entfernen. Im nächsten Schritt wird die DNA mit 50 µl 70°C warmen NE-Puffer eluiert. Dazu wird das Filtrationscap zunächst in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap überführt. Der NE-Puffer wird hinzupipettiert und 1 min bei RT belassen. Es folgt eine Zentrifugation von 1 min bei 14.000 rpm und RT.

Zur Quantifizierung der eluierten DNA-Menge werden 5 µl davon parallel zu einer bekannten Menge auf ein Agarosegel aufgetragen oder im UV-Spektrometer über die optische Dichte (OD) bestimmt.

### 3.12.2 PAGE-GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem spezifischen Molekulargewicht erfolgte unter denaturierenden Bedingungen über eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970) beschriebenen Verfahren.

Es wurden Trenngele von 10% bis 15% und Sammelgele von 5% Acrylamidanteil verwendet. Folgende Tabelle gibt die Zusammensetzung der Trenngele (20 ml) bzw. des Sammelgels (10 ml) wieder:

Prozent an Acrylamid	10%	12,5%	15%		5%
A. dem. [ml]	9,7	8,45	7,2		7,3
1,5 M Tris/HCl pH 8,8 [ml]	5,0	5,0	5,0		1,25
40% PAA/Bis [ml]	5,0	6,25	7,5		1,25
10% SDS [µl]	400	200	200		100
10% APS [µl]	200	100	100		100
TEMED [µl]	10	7,5	7,5		10

**Tab. 3.5: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele**

In der zweiten bis vierten Spalte ist die Zusammensetzung der Trenngele angegeben, in der sechsten Spalte die es Sammelgels.

Die Reagenzien wurden in der Reihenfolge wie in Tabelle XX dargestellt bis auf APS und TEMED zusammen gegeben und gut gemischt. Zum Start der radikalischen Polymerisation wurden APS und TEMED nach Durchmischung zugegeben. Das Trenngel in die vorbereitete Kammer zügig gegossen und mit Isopropanol

überschichtet. Nachdem die Polymerisation abgeschlossen war (ca. 25 min) wurde das Isopropanol abgezogen und mit Sammelgel überschichtet. Dieses wurde analog zum Trenngel hergestellt. In das Sammelgel wurden Käbme eingelassen.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 15 min bei 65°C erhitzt. Nach dem Auftragen der Proben in die vorbereiteten Sammelgeltaschen wurde die Elektrophorese bei 30 mA in 1x Elektrophoresepuffer laufen gelassen.

### 3.12.3 METHODEN ZUR REINIGUNG, KONZENTRATION VON DNA

#### 3.12.3.1 PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION

Zur Abtrennung von Proteinen bei DNA-Präparationen werden die DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform, pH 8 versetzt und durch Vortexen gemischt. Anschließend wird zur besseren Phasentrennung bei 10.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und die wässrige Oberphase in ein neues Eppendorfcap überführt. Die DNA wird in einem weiteren Schritt mit Ethanol bzw. Isopropanol gefällt.

#### 3.12.3.2 ALKOHOLPRÄZIPITATION

Zur Aufkonzentrierung als auch zur weitem Reinigung der DNA wird eine Alkoholfällung durchgeführt.

#### 3.12.3.3 ETHANOL-PRÄZIPITATION

Zu 1 Volumen gelöster DNA werden 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 4,8 und 2,5 Volumen eiskaltes 100%iges Ethanol gegeben. Durch Vortexen wird die Lösung durchmischt und für mindestens 20 min bei -20°C belassen. Nach einer Zentrifugation von 13.000 rpm und 4°C für 20 min wird das Pellet in eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

#### 3.12.3.4 ISOPROPANOL-PRÄZIPITATION

Zu 1 Volumen gelöster DNA werden 0,7 Volumen Isopropanol gegeben und durch vortexen vermischt. Die Lösung wird für mindestens 15 min bei RT belassen und anschließend bei 13.000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wird in

eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach dem Trocknen wird das Pellet in TE-Puffer gelöst.

### 3.12.3.5 REINIGUNG VON ANSÄTZEN NACH ENZYMATISCHER REAKTION

Die Aufreinigung von Ansätzen nach enzymatischen Reaktionen wie z.B. dem A-Tailing, Blunt Ending etc. erfolgte mit dem Quiagen Reaction Cleanup Kit.

Zu dem Ansatz werden 300 µl ERC-Puffer gegeben. Hierbei sollte das maximale Volumen des Ansatzes nicht mehr als 100 µl betragen. Ist das Reaktionsvolumen geringer als 20 µl wird mit sterilem A. dem. auf 20 µl aufgefüllt. Der richtige pH-Wert wird über die gelbe Farbe der Lösung angezeigt. Der Ansatz wird in eine QIAprepSpin-Column überführt und für 30-60 sec bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Anschließend werden 750 µl PE-Puffer auf die Säule aufgetragen und die Probe erneut für 30-60 sec bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Um den Waschpuffer vollständig zu entfernen wird erneut für 30-60 sec bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Die Säule wird in ein Eppendorfcap überführt und dort mit 10 µl EB-Puffer versetzt. Nach 1 min wird die DNA von der Säule mittels Zentrifugation für 30-60 sec bei 13.000 rpm und RT eluiert.

## 3.12.4 DNA-KONZENTRATIONS-BESTIMMUNG

### 3.12.4.1 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG MITTELS $A_{260}$

Die Bestimmung der Konzentration von DNA mit hohem Reinheitsgrad ist durch die Messung der Absorption bei 260 nm möglich. Dabei wird ein Aliquot der DNA-haltigen Lösung soweit mit A. dem. verdünnt, so dass die Absorption zwischen 0,1 und 0,8 liegt. Aufgrund der Annahme, dass 1  $A_{260}$  Unit einer Menge von ca. 50 µg dsDNA pro ml entsprechen, kann nun die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgen.

Weiterhin wird die Probe bei einer Absorption von 280 nm gemessen. Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm kann eine Aussage über die Qualität z. B. isolierter DNA geben. Für eine reine Probe gilt:  $A_{260}/A_{280} = 1,8$ .

### 3.12.4.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG ÜBER AGAROSEGELE

Um Konzentrationen von größeren DNA-Fragmenten geringeren Reinheitsgrades zu bestimmen, werden bestimmte Volumina von DNA-Lösungen auf ein Agarosegel aufgetragen. Eine bekannte Menge an *BstEII*-geschnittener  $\lambda$ -DNA wird als Vergleich aufgetragen. Unter UV-Licht kann die Intensität der verschiedenen Banden verglichen werden und über die bekannten Fragmentgrößen der  $\lambda$ -DNA die Konzentrationen bestimmt werden. Die Helligkeit der Banden ist dabei proportional zur Länge und der Konzentration der Fragmente.

### 3.12.5 POLYMERASEKETTENREAKTION

Die PCR wird in einem Thermocycler der Firma Hybaid Labsystems, PCR sprint durchgeführt. Hierzu werden die in der Tabelle aufgezählten Reagenzien auf Eis aufgetaut. Bei mehreren Ansätzen kann ein Mastermix mit den Komponenten hergestellt werden, die in alle Ansätze kommen.

Reagenz	Menge in $\mu$ l
Template-DNA ( <i>HindIII</i> bzw. <i>BamHI</i> )	5
10 x Puffer	5
DMSO	2
A. dem.	25 - 25,5
dNTP's (1,25 mM/dNTP)	8
Forward-Primer (12,5 pmol/ $\mu$ l)	2
Reverse-Primer (12,5 pmol/ $\mu$ l)	2
DNA-Polymerase	0,5 - 1
Gesamtvolumen	50

**Tab. 3.6: Beispielhafter PCR-Ansatz**

Bis auf die DNA-Polymerase werden alle Reagenzien zusammen pipettiert. Im Falle eines Hotstarts wird der Ansatz ohne DNA-Polymerase in den Thermocycler zur initialen Denaturierung gestellt. Die DNA-Polymerase wird dann direkt in das Cap im Gerät pipettiert.

Im Normalfall wird die DNA-Polymerase als letztes und einzeln in jedes Cap pipettiert. Die Proben werden danach schnell in das Gerät gestellt und das

Programm zeitnah gestartet. Nach der Synthese verbleiben die Proben bei 4 °C im Gerät oder werden bei -20 °C gelagert.

Im Folgenden sind die einzelnen Programme aufgelistet.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98	3	1
Zugabe der DNA-Polymerase	97	2	1
Denaturierung	95,5	1	29
Annealing	experimentell ermittelt	1	29
Synthese	72	1.30	29
Finale Synthese	72	10	1
Lagerung	4		1

**Tab. 3.7: Programm für Hotstart-Enzyme (Herkulase® Hotstart DNA Polymerase, HotMaster™Taq DNA-Polymerase)**

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	94,5	1	29
Annealing	experimentell ermittelt	1.30	29
Synthese	72	1.30	29
Finale Synthese	72	5	1
Lagerung	4		1

**Tab. 3.8: Verkürztes Programm für die allgemeine Amplifikation (Triple Master™ DNA-Polymerase, Taq-DNA-Polymerase und Vent-DNA-Polymerase)**

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	94,5	1	15
Annealing	experimentell ermittelt	1.30	15
Synthese	72	1.30	15
Finale Synthese	72	5	1
Lagerung	4		1

**Tab. 3.9: Programm für die Optimierung der Annealingtemperaturen und des DMSO-Gehalts (Triple Master™ DNA-Polymerase)**

### 3.12.6 PRIMERSYNTHESE

Die Primersynthese erfolgt nach Standardmethode im DMT-on-Modus am Perceptive Biosystems, Expedite<sup>™</sup>-Synthesizer. Zur Abspaltung der DNA vom Trägermaterial werden die Proben nach der Synthese in 700 µl 32%igen Ammoniak gegeben und für 6 h bei 65 °C oder über Nacht bei 55 °C im Wasserbad belassen. Die Probe wird dann in eine Spritze aufgenommen und über einen HPLC-Minifilter in ein 2 ml Eppendorf-Cap filtriert. Die Probe wird in der Speed-Vac vom Ammoniak befreit. Die Probe wird in 700 µl A. dem. aufnehmen und über der HPLC gereinigt. Die Trennung erfolgt über eine Lichrosphere RB18-Säule (Laufmittel A: 0,1 M TEAA-Lsg.; Laufmittel B: Acetonitril); Gradient: 5-40% in 30 min). Entsprechende Fraktionen werden in der Speed-Vac einrotiert. Zur Detritylierung wird die Probe jetzt mit 500 µl 70%iger Essigsäure versetzt und für 30 min bei RT belassen. Danach wird das Lösungsmittel wieder in der Speed-Vac entfernt. Im Anschluss werden die Proben gefällt. Nach der Bestimmung der OD wird die Probe entsprechend verdünnt.

### 3.12.7 DNA-MANIPULATION

#### 3.12.7.1 RESTRIKTION

Die DNA-Restriktionsansätze werden gemäß der vom Hersteller angegebenen enzymespezifischen Inkubationstemperatur und mit den mitgelieferten Puffern über einen Inkubationszeitraum von 1-3 h in einem Gesamtvolumen von 10-100 µl durchgeführt. Es wurde bei bekannter Menge an DNA entsprechende Units des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Vorhandene RNA wird durch die Zugabe von RNase A in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml im Restriktionsverdau abgebaut.

Falls erforderlich werden die Ansätze nach Inkubation durch Hitzeinaktivierung (z.B. 20 min, 65 °C) inaktiviert bzw. einem Aufreinigungsschritt (s.o.) unterzogen.

#### 3.12.7.2 BLUNT ENDING - BEHANDLUNG MIT T4-DNA-POLYMERASE

Mittels der T4-DNA-Polymerase kann doppelsträngige DNA mit überhängenden 5'-Enden aufgefüllt werden. 3'-Überhänge werden aufgrund der 3'-5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms entfernt. Der Ansatz wurde bei 16 °C für 10 min inkubiert und die dadurch generierten Blunt-Ends in einer Blunt-End-Ligation nach Hitzeinaktivierung bei 75 °C für 20 min und Aufreinigung (s.o.) eingesetzt.

Im Ansatz ist folgendes enthalten:

10 µl	DNA mit 5´-Überhang
8 µl	dNTPs (Endkonzentration: 50 µM)
3 µl	10 x Neb2-Puffer
3 µl	10 x BSA (Endkonzentration: 0,01%)
5 µl	A. dem.
<u>1 µl</u>	<u>T4-DNA-Polymerase</u>
30 µl	Gesamtvolumen

### 3.12.7.3 BLUNT ENDING - BEHANDLUNG MIT KLENOW-FRAGMENT DER DNA-POLYMERASE I

Mit Hilfe des Klenow-Fragments können alternativ 5´-Überhänge aufgefüllt werden. Die 3´-5´-Exonukleaseaktivität des Enzyms ist jedoch zu schwach, um 3´-Überhänge abzubauen. Der Ansatz wird 30-60 min bei 37°C inkubiert und nach Inaktivierung des Klenow-Fragments und Aufreinigung zur Ligation verwendet.

Im Ansatz ist folgendes enthalten:

10 µl	DNA mit 5´-Überhang
8 µl	dNTPs (Endkonzentration: 50 µM)
3 µl	10 x Klenow-Puffer
8 µl	A. dem.
<u>1 µl</u>	<u>Klenow-Fragment</u>
30 µl	Gesamtvolumen

### 3.12.7.4 BEHANDLUNG MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE

Um eine Religation des Vektors bei der Ligation zu vermeiden, wird die DNA mit Intestinaler Alkalischer Phosphatase vom Kalb (CIP) behandelt. Die Alkalische Phosphatase entfernt die Phosphatgruppe am 5´-Ende eines DNA-Stranges.

Nach der Inkubation des Vektors mit entsprechenden Restriktionsenzymen wird zu dem vorliegenden Ansatz 1 µl CIP hinzupipettiert und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert.

Alternativ wird die vorher geschnittene und aufgereinigte Vektor-DNA mit entsprechendem Puffer und CIP versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert.

10 µl	Vektor-DNA
1,5 µl	10 x Neb3-Puffer
2,5 µl	A. dem.
1 µl	CIP
<hr/>	
15 µl	Gesamtvolumen

### 3.12.7.5 A-TAILING

Thermostabile DNA-Polymerasen, die eine „Proofreading“-Funktion besitzen, generieren Blunt-End Fragmente während der PCR-Amplifikation. Um eine erfolgreiche Ligation mit dem pGemT-Easy-Vektor zu erreichen, benötigen die Fragmente ein 3'-überhängendes Adenosin.

Nach der erfolgreichen PCR werden die Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgereinigt und dann einem A-Tailing unterzogen.

Hierzu wird folgendes zusammengegeben:

1-7 µl	des gereinigten PCR-Fragments,
1 µl	10x Taq-DNA-Polymerase-Puffer, inklusive MgCl <sub>2</sub>
2 µl	10 mM dATP
1-5 µl	A. dem.
1 µl	Taq-DNA-Polymerase
<hr/>	
10 µl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wird bei 70°C für 15 bis 30 min im Wasserbad inkubiert und nach Aufreinigung im Ligationsansatz verwendet.

### 3.12.7.6 BEHANDLUNG MIT T4-POLYNUKLEOTID-KINASE

Die T4-Polynukleotid-Kinase ist ein Enzym, das die Übertragung eines Phosphatrests von einem Molekül ATP auf das 5'-Ende von DNA oder RNA katalysiert. Die Behandlung erfolgt, wenn z.B. wie nach einer PCR, an den DNA-Molekülen noch kein 5'-Phosphat vorhanden sind. Der Ansatz wird bei 37°C für 1 h inkubiert.

Für die Kinasierung werden zum Reaktionsansatz folgendes hinzugefügt:

10 µl	DNA
2,5 µl	T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer
8 µl	dATP
3,5 µl	A. dem.
<u>1 µl</u>	<u>T4-Polynukleotid-Kinase</u>
25 µl	Gesamtvolumen

### 3.12.7.7 LIGATION

Alle Ligationen werden mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Die T4-DNA-Ligase verknüpft in Gegenwart von ATP das 3'-Ende mit dem 5'-Ende unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Vektor und Insert werden in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:5 eingesetzt. Der Ansatz wird über Nacht bei 16°C oder alternativ bei 1-3 h bei RT inkubiert und kann ohne Aufreinigung zur Transformation verwendet werden.

1 µl	Vektor-DNA
3 µl	Insert-DNA
1 µl	10 x T4-DNA-Ligase-Puffer
4 µl	A. dem.
<u>1 µl</u>	<u>T4-DNA-Ligase</u>
10 µl	Gesamtvolumen

Die Ligation mit dem pGemT-Easy Vektor wird wie folgt durchgeführt:

5 µl	2x-Rapid Ligation Puffer
1 µl	pGemT-Easy (Vektor); 50 ng
X µl	Insert-DNA
1 µl	T4-DNA-Ligase
<u>X µl</u>	<u>A. Dem.</u>
10 µl	Gesamtvolumen

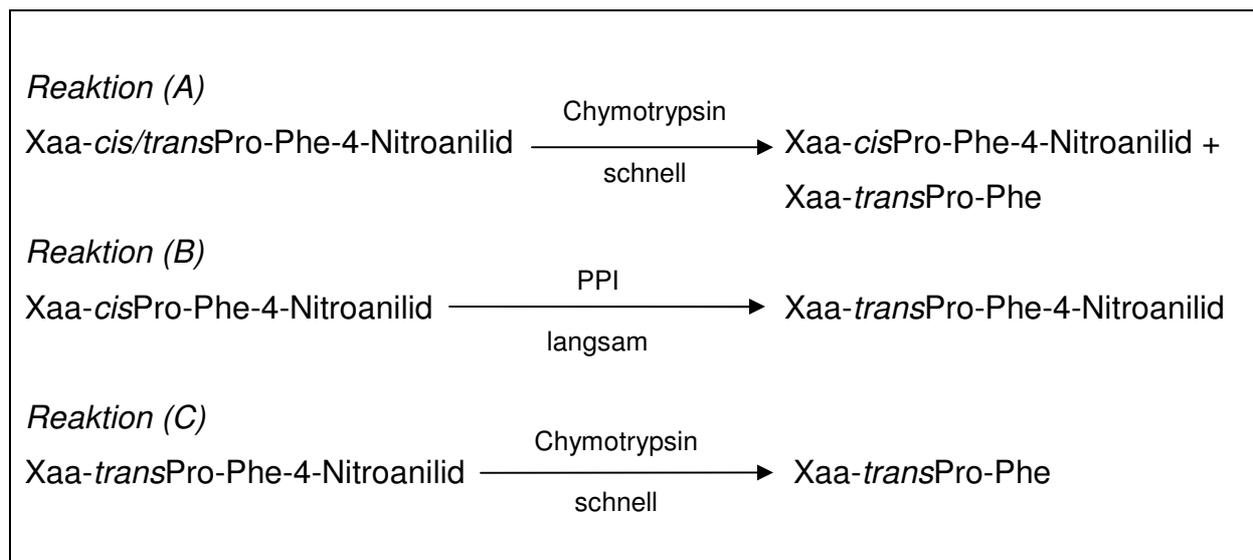
## 3.13 BIOCHEMISCHE METHODEN

### 3.13.1 Ni<sup>2+</sup>-NTA-SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Die Aufreinigung der His-Tag-Cyclophiline erfolgte nach dem Protokoll Nr.9 aus „The QIAexpressionist™, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins“ unter nativen Bedingungen.

### 3.13.2 AKTIVITÄTSTEST

Das gereinigte Protein wurde durch einen Aktivitätstest *in vitro* auf seine Isomerasefunktion untersucht. Hierbei wird ein chromogenes Substrat (Xaa-*cis*Pro-Phe-4-Nitroanilid) durch die Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase isomerisiert und detektiert. Die Aktivität wurde in einer Zweischnittreaktion unter Zuhilfenahme des Enzyms  $\alpha$ -Chymotrypsin bestimmt (JANOWSKI et al. 1997).



**Abb. 3.2: Einzelne Schritte der Messung zur Bestimmung von  $k_{\text{PPI}}$**

Es wurde zunächst  $k_{\text{unkatalysiert}}$  (background) gemessen. Hierzu wurde die Zusammensetzung Puffer,  $\alpha$ -Chymotrypsin und Substrat gemessen (Reaktion (A)). Zur Bestimmung von  $k_{\text{gesamt}}$  wurde Puffer,  $\alpha$ -Chymotrypsin, Substrat und die jeweilige PPIase gemessen (Reaktion (B) und (C)). Die ermittelte  $k_{\text{unkatalysiert}}$  wurde dann von der gemessenen  $k_{\text{gesamt}}$  abgezogen. Erhalten wurde die reine Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{PPIkatalysiert}}$ .

Der langsame Geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird über die nachfolgend schnelle Spaltung des trans-Peptides detektiert. Chymotrypsin spaltet ausschließlich das trans-Substrat. Diese Spaltung erfolgt spezifisch an der Bindung zum Marker 4-Nitroanilid, welcher als *para*-Nitroanilin frei gesetzt wird. Der Anstieg des *para*-Nitroanilin kann bei 390-450 nm an einem Stopped-flow-Spektrometer beobachtet werden.

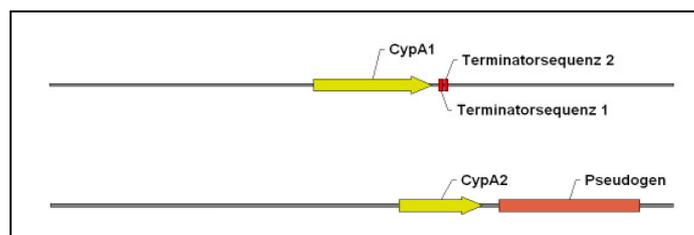
## IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 ALLGEMEIN

Keller et al. fanden in *Streptomyces chrysomallus* ein Cyclophilin A, welches große Homologie zu eukaryontischen Cyclophilinen zeigte. (PAHL et al. 1997, BERGER et al. 1999). Um die Species *Streptomyces spp.* für rekombinante Proteinexpression nutzen zu können, wurde auch in *Streptomyces lividans* nach Vertretern dieser Enzymklasse gesucht.

Basierend auf der große Sequenzhomologie zwischen *Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces lividans* wurde zunächst in dem vom Sanger-Institut komplett sequenzierten Genom von *Streptomyces coelicolor* nach Motiven für Peptidyl-Prolyl-*cis/trans* Isomerasen gesucht. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von *Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces lividans* wurden basierend auf der bekannten *Streptomyces coelicolor*-Sequenz Primer synthetisiert. Mittels dieser „PPI“-Primer wurde die genomische DNA von *Streptomyces lividans* nach Peptidyl-Prolyl-*cis/trans* Isomerasen gescannt.

Es wurden drei potentielle Gene für Peptidyl-Prolyl-*cis/trans* Isomerasen gefunden. Das erste zeigte keine Isomeraseaktivität und wurde als Pseudogen definiert. Eine zweite Sequenz (CypA2) kodiert für ein 20 kDa Cyclophilin und zeigt Ähnlichkeit mit dem CypB aus *Streptomyces chrysomallus*. CypA2 wird während des Mycelwachstums exprimiert. Eine PPlase-Aktivität ist *in vitro* vorhanden. Weiterhin wurde ein drittes Cyclophilin (CypA1) gefunden. Dieses 165 Aminosäure große Polypeptid zeigt eine hohe Sequenzhomologie zum CypH aus *Saccharomyces cerevisiae* und ist nahezu identisch mit dem CypB aus *Streptomyces chrysomallus*. Seine PPlase-Aktivität ist gegenüber CypA2 um das 10fache höher.



**Abb. 4.1: Übersicht der beiden Cyclophilingene in *Streptomyces lividans***

Die Abbildung zeigt eine Übersicht über beiden Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen. Die Sequenz des Pseudogens schließt sich an die für CypA2 an.

## 4.2 IDENTIFIZIERUNG VON CYPA1 UND CYPA2

### 4.2.1 DAS PSEUDOGEN

Das offene Leseraster des Pseudogens unterscheidet sich deutlich von einer aktiven Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase. Zum einen ist das Cytosin 177 deletiert. Zum anderen sind konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum durch andere ersetzt (F38 zu I38; H100 zu Y100). Aufgrund dessen zeigt das Pseudogen keine PPlase-Aktivität *in vitro*.

### 4.2.2 CYCLOPHILIN A1 (CYPA1)

```

gtcaccCGTcacaatGGTgCGatGagcaattccaaggtttacttcgacatcgacatcgacggccaggatgCGggc
      M S N S K V Y F D I D I D G Q D A G
cgcatCGTcttcgagctcttcgaggacgTcaccCCCAAGaccGCCAGgaacttCctggagctggccaccGGcgag
R I V F E L F E D V T P K T A R N F L E L A T G E
cacggcttcGGgtacgCCggttccccgTtccaccgTgtgatccCGcagttcatgctccagggCGgtgacttcacc
H G F G Y A G S P F H R V I P Q F M L Q G G D F T
aacggcaacGGcaccGGggggaagagcatctacGGcgagaagttcGcgGacgagaacttccagctgaagcacacc
N G N G T G G K S I Y G E K F A D E N F Q L K H T
gagccGTacctcctgtccatggCGaacGCGggtccgaacaccaacGGctcGcagttcttcGtcacgaccGTcccc
E P Y L L S M A N A G P N T N G S Q F F V T T V P
acCCCGTggctGGacGGcaagcagctCGTcttcGGcaaggTcGtCGagggcaccGGacGtGGtCGacaagatCGag
T P W L D G K H V V F G K V V E G T D V V D K I E
ggctacGGctcctCGccccGGggaagacctccaaggagatcaaggTgCGcGcGtccGGcaagctGaaGGcctG
G Y G S S P A G K T S K E I K V R A S G K L StoG L
atcagccctacgaggaccTgaagcGacGGggggtccaccGcatccGGtGCGgtGGacCCCGTccccgtccCGtC
I S P T R T Sto

```

#### Abb. 4.2: DNA- und Proteinsequenz des CypA1

Rot hinterlegt sind die beiden Stopcodons dargestellt. Im Folgenden sind die Terminatorsequenzen fett abgebildet. Das Methionin/Startcodon ist grün hervorgehoben. Eine potentielle 16S-rRNA-ist gelb hinterlegt.

In Abb. 4.2 ist die DNA- als auch die Proteinsequenz des CypA1 dargestellt. Das 17,5 kDa schwere CypA1 umfasst 165 Aminosäuren. Hier wurde eine potentielle 16rRNA Bindestelle gefunden. Diese ist in Abb. 4.2 gelb dargestellt. Nach den beiden Stopcodons finden sich inverted-repeat-Sequenzen, die sich an einen Faktor unabhängigen Transkriptionsterminator anlehnen. CypA1 weist eine 68%ige

Übereinstimmung mit CypA aus *Streptomyces chrysomallus* (BERGER et al. 1999) und eine 69%ige mit dem CypH aus *Saccharomyces cerevisiae* auf.

Auf DNA-Basis wurde kein Unterschied zwischen *Streptomyces lividans* und *Streptomyces coelicolor* festgestellt. In den flankierenden Bereichen des Cyclophilins finden sich einzelne Punktmutationen in der Sequenz.

ScCYPH	~~MSQVYFDVEADGQPIGRVVFVKLYNDIVPKTAENFRALCTGEKGFYAGSSEFF
SlCypA1	MSNSKVYFDIDIDGQDAGRIVFELFEDVTPKTARNFLELATGEHGFYAGSSEFF
ScCypA	MT~TKVYFDITIDDDAPAGRITFNLFDDVVPKTAENFRALATGEKGFYAGSSEFF
ScCYPH	HRVIPDFMLQGGDFTAGNGTGGKSIYGEKFPDENFKKHHDRPGLLSMANAGFN
SlCypA1	HRVIPQFMLQGGDFTAGNGTGGKSIYGEKFA DENFQLKHTEPYLLSMANAGFN
ScCypA	HRVITDFMLQGGDFTRGDGTGGKSIYGEKFA DENFQLKHDRVGLLSMANAGKN
ScCYPH	TNGSQFFITTVFCPWLDGKHVVFGVEFFDGYDI~~VKKVESLG~SFSGATKARI
SlCypA1	TNGSQFFVTTVFTPWLDGKHVVFGKVVVEG~~TDVVDKTEGYGSSPAGKTSKEI
ScCypA	TNGSQFFITTVLTPWLDGKHVVFGVEVADDDSMALVRKTEALGSS~SGRTSAKV
ScCYPH	VVAKSGEL
SlCypA1	KVRASGKL
ScCypA	TIAESG~~

**Abb. 4.3: Sequenzvergleich zwischen CypA1 aus *Streptomyces lividans*, CypA aus *Streptomyces chrysomallus* und CypH aus *Saccharomyces cerevisiae***

SlCypA1 steht für die Aminosäuresequenz des Cyclophilins A1, welches aus *Streptomyces lividans* isoliert wurde. ScCypA stellt die bekannte CypA-Sequenz aus *Streptomyces chrysomallus* dar. ScCypH bezeichnet die Aminosäuresequenz des Cyclophilins H aus *Saccharomyces cerevisiae*. Gelb dargestellt sind Bereiche, die bei allen drei Sequenzen identische Aminosäuren aufweisen. Grün markierte Bereiche zeigen Übereinstimmungen des CypA1 mit CypH, blau markierte Übereinstimmungen mit CypA.

#### 4.2.3 CYCLOPHILIN A2 (CYPA2)

Das dritte gefundene Cyclophilin CypA2 hat mit seinen 177 Aminosäuren eine Masse von 19,5 kDa. Es besitzt eine 77%ige Homologie mit CypB aus *Streptomyces chrysomallus*. Stromabwärts der CypA2-Sequenz findet sich das Pseudogen. Um diese Konstellation beizubehalten, wurde für die Knockoutkonstrukte der Bereich des Pseudogens mit eingeschlossen.

Auf DNA-Basis wurde kein Unterschied zwischen *Streptomyces lividans* und *Streptomyces coelicolor* festgestellt. In den flankierenden Bereichen des Cyclophilins finden sich einzelne Punktmutation in der Sequenz.

SlCypA2	VAAQLYATLKTSQGDIEVRLLPNHAPRTVKNFVELARGEREWTHPATGEEKSMA
ScCypB	MAEQLYATLKTNRGDIEIRLLPNHAPKTVRNFVELATGQREWVNPETGEKSTD
SlCypA2	RLYDGTVFHRVLSGFMIQGGDPLGNGTGDPGYQFPDEFHPDLAFDKPYLMAMA
ScCypB	RLYDGTVFHRVISGFMIQGGDPLGNGTGGPGYKFADEFHPELGFETQPYLLAMA
SlCypA2	NAGPGTNGSQFFITVSPTTWLNRKHTIFGEVTDAAASQKVVDTIAAARTNPRTE
ScCypB	NAGPGTNGSQFFLTVSPTAWLTGKHTIFGEVSGEAGRKVVDATAAATPTNPRTD
SlCypA2	RPLTDIVIESVVVETRNA
ScCypB	RPLEDVVIESVVVETR~~

**Abb. 4.5: Sequenzvergleich zwischen CypA2 *Streptomyces lividans* und CypB aus *Streptomyces chrysomallus***

SlCypA2 steht für die Aminosäuresequenz des Cyclophilins A2, welches aus *Streptomyces lividans* isoliert wurde. ScCypB zeigt die Sequenz des CypB aus *Streptomyces chrysomallus*. Gelb unterlegt sind übereinstimmende Bereiche.

ccccggccgtgcgaggatcgggtgcgcacaaacaggacgacggaaggcacctcgtggccgcgcagctctacgccacc	V A A Q L Y A T
ctgaagaccagccaaggtgacatcgaggtccggctgctgcccgaaccacgcaccaggaccgtcaagaacttcgtc	L K T S Q G D I E V R L L P N H A P R T V K N F V
gagctggccccgcccgcgagcgggagtggaaccacccccgccaccggcgagaaatccatggccaggctctacgacggc	E L A R G E R E W T H P A T G E K S M A R L Y D G
accgtcttccaccgggtcctcagcgggtttcatgatccaggggcggcgatccgctgggcaaccggcaccggcgacccc	T V F H R V L S G F M I Q G G D P L G N G T G D P
ggctaccagttcccggacgagttccacccccgacctcgccttcgacaagccctacctgatggccatggccaacgcc	G Y Q F P D E F H P D L A F D K P Y L M A M A N A
ggccccgggaccaacggctcgcagttcttcatcaccgtctccccgacgacctggctgaaccgcaagcacacgatc	G P G T N G S Q F F I T V S P T T W L N R K H T I
ttcggcgaagtgaccgacgcccagtcagaaggtcgtcgacaccatcgccgcccggaccaacccccgcacc	F G E V T D A A S Q K V V D T I A A A R T N P R T
gagcggcccctcaccgacatcgtcatcgagtcgctcgtcgtcgagacaaggaacgctgagccccgccacaccg	E R P L T D I V I E S V V V E T R N A Sto

**Abb. 4.6: DNA- und Proteinsequenz des CypA2**  
Rot hinterlegt ist das Stopcodon dargestellt.

## 4.3 ISOLIERUNG VON CYP A1 UND CYP A2

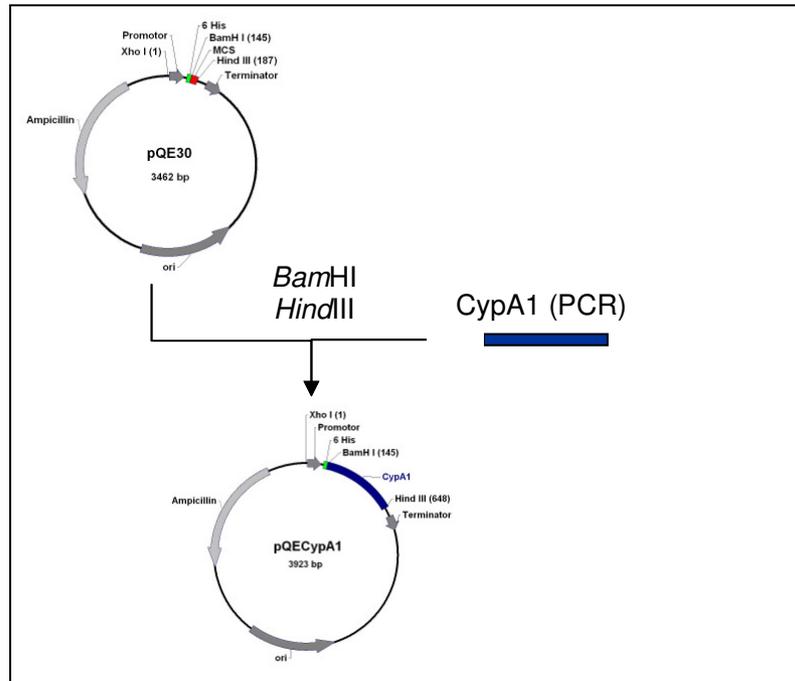
### 4.3.1 ÜBEREXPRESSION IN PQE30

Der pQE30-Vektor von Qiagen wurde für die Überexpression der Cyclophiline in *E.coli* verwendet. Die Induktion des lac-Promotor/Repressorsystems nach IPTG-Gabe hat die Überexpression des einklonierten Gens zur Folge. Dadurch wird eine mögliche toxische Akkumulation des überexprimierten Proteins in der frühen Wachstumsphase unterbunden. Im pQE30-Vektor wird das überexprimierte Gen zusätzlich mit sechs Histidinkodons am N-Terminus versehen, was eine Aufreinigung mit Hilfe der Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule ermöglicht.

Für die Umklonierung des CypA1 wurden Primer verwendet, die an ihren 5'-Enden unterschiedliche Restriktionsschnittstellen enthielten, um eine direktionale Klonierung des CypA1 in den pQE30-Vektor zu gewährleisten. Es wurden für CypA1 *Bam*HI am 5'-Ende und *Hind*III am 3'-Ende eingeführt. Beide Schnittstellen kommen im eigentlichen CypA1-Gen nicht vor. Folgende Primer wurden verwendet: 1Au1 (CypA1for, *Bam*HI) CACAATGGATCCATGAGCAATTCCAAGGTTTACTTCG und 1Au2 (CypA1rev, *Hind*III) TGATCAAAGCTTACAGCTTGCCGGACGCGC.

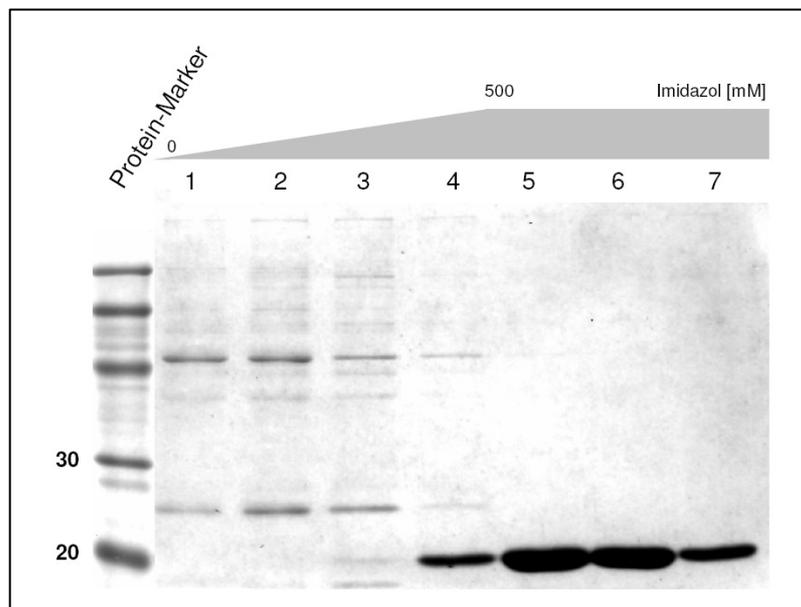
Die Amplifikation mittels PCR erfolgte ausgehend von der genomischen DNA von *Streptomyces lividans*. Das Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese identifiziert und gereinigt. Nach Restriktion mit *Bam*HI und *Hind*III und erneuter Aufreinigung wurde das Fragment mit dem ebenfalls *Bam*HI und *Hind*III restringierten Vektor pQE30 ligiert. Aus der Ligation resultierte das Plasmid pQECypA1. Der Ligationsansatz wurde nach Standardmethode in *E. coli* M15 transformiert.

Die Induktion der CypA1-Expression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 in einer Endkonzentration von 1 mM. Die Ernte erfolgte 2-4 h nach Induktion. Nach Isolation des CypA1 wurde das Protein über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt und mittels Gelelektrophorese nachgewiesen.



#### Abb. 4.7: Klonierung von pQECypA1

Das CypA1-Gen wurde mittels PCR amplifiziert, wobei durch die Primer *Bam*HI und *Hind*III-Schnittstellen generiert wurden. Die Ligation mit dem geschnittenen pQE30 erfolgte nach Standardbedingungen.

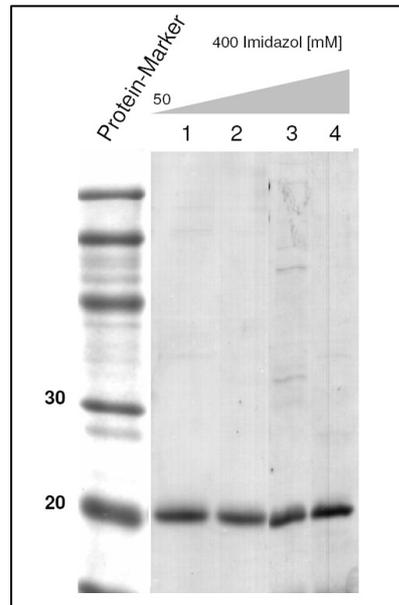


#### Abb. 4.8: Gelbild der Aufreinigungsfractionen von CypA1

In den Spuren 1 bis 7 sind einzelne Fraktionen der Aufreinigung durch die Ni-NTA-Säule dargestellt. In den Spuren 4-7 ist deutlich das 17,5 kDa große Cyclophilin A1-Protein zu erkennen. In der ersten Spur ist ein Proteingrößenmarker aufgetragen.

Analog zu CypA1 wurde auch CypA2 überexprimiert. Es wurden wie bei CypA1 beschriebenen Primer mit den Schnittstellen, *Bam*HI am 5'-Ende und *Hind*III am 3'-Ende, eingeführt. Beide Schnittstellen kommen im eigentlichen CypA1-Gen nicht

vor. Folgende Primer wurden eingesetzt: 2Au1 (CypA2for, *Bam*HI) GGAAGGGGATCCGTGGCCGCGCAGCTCTACGC und 2Au2 (CypA2rev, *Hind*III) TGTGGCAAGCTTTCAGGCGTTCCTTGTCTCGAC. Wie oben beschrieben wurde CypA2 in pQE30 einkloniert und in *E.coli* M15 überexprimiert. Die Aufreinigung des CypA2-Proteins erfolgte über eine Ni-NTA-Säule.



**Abb. 4.10: SDS-Gel der Aufreinigungsfractionen von CypA2**

In den Spuren 1 bis 4 sind einzelne Fraktionen der Aufreinigung durch die Ni-NTA-Säule dargestellt. Es ist deutlich das 19,5 kDa große Cyclophilin A2-Protein zu erkennen. In der ersten Spur ist ein Proteingrößenmarker aufgetragen.

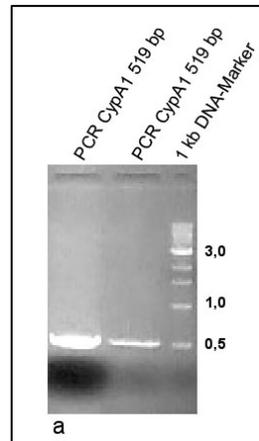
#### 4.3.2 SEQUENZIERUNG DER CYCLOPHILINE

Zur Sequenzierung des Cyclophilin-Gens an sich, wurde dieses mit den Primern 1Au1 und 1Au2 mittels PCR amplifiziert und in pGemT-Easy einkloniert. pGemT-Easy besitzt ein 3'-terminales Thymidin. Dies kann zur Ligation mit PCR-Produkten verwendet werden, bei denen die DNA-Polymerase ein 3'-überhängendes Adenosin eingebaut hat. Zur Gewährleistung dessen und aufgrund der Vielzahl an verschiedenen DNA-Polymerasen wurden die PCR-Produkte jeweils einem A-Tailing unterzogen.

Für die Sequenzierung wurde zunächst das eigentliche Cyp-Gen isoliert amplifiziert. Für die Knockout-Mutanten wurde ein größerer Bereich gewählt.

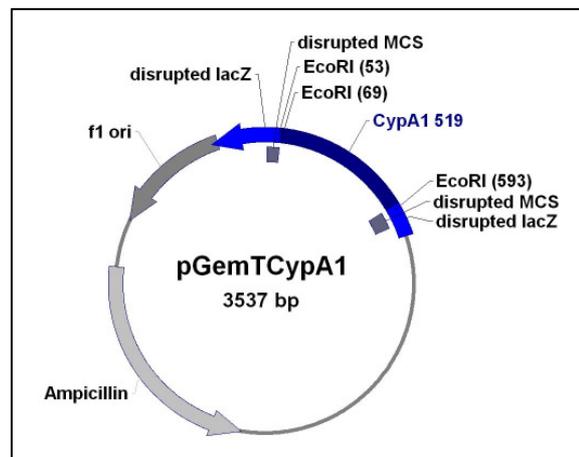
Die PCR für CypA1 erfolgte mit folgenden Primern: 1Au1 (CypA1for, *Bam*HI) CACAATGGATCCATGAGCAATTCCAAGGTTTACTTCG und 1Au2 (CypA1rev, *Hind*III) TGATCAAAGCTTACAGCTTGCCGGACGCGC. Nach PCR-Amplifikation und

Klonierung in pGemT-Easy wurde die Probe pGemTCypA1 mit M13for- und M13rev-Primern sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Abb. 4.2 dargestellt. Es waren keine signifikanten Sequenzunterschiede zwischen *Streptomyces lividans* und *Streptomyces coelicolor* zu erkennen.



#### Abb. 4.11: PCR des CypA1-Gens

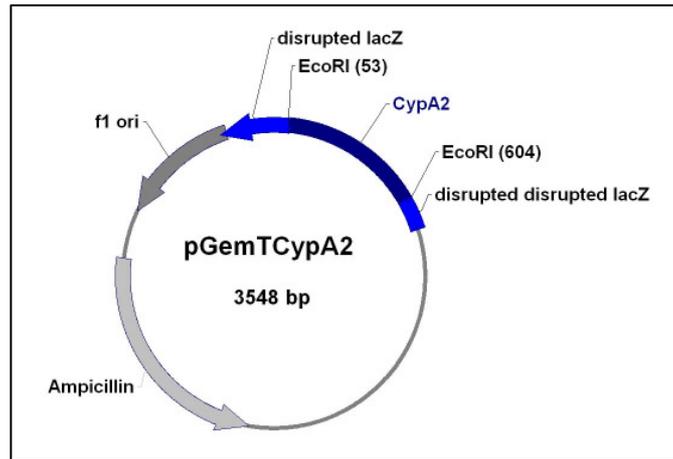
In beiden Spuren ist die PCR des CypA1-Gens aufgetragen. Die Größe des amplifizierten Abschnittes beträgt 519 bp. Zum Vergleich ist in der dritten Spur ein 1 kb DNA-Marker aufgetragen.



#### Abb. 4.12: pGemTCypA1

pGemTCypA1 wurde nach Ligation des PCR-Produkts 519 mit pGemT-Easy erhalten. Der Vektor diente zur Ermittlung der DNA-Sequenz von CypA1.

Die PCR für CypA2 erfolgte mit folgenden Primern 2Au1 (CypA2for, *Bam*HI) GGAAGGGGATCCGTGGCCGCGCAGCTCTACGC und 2Au2 (CypA2rev, *Hind*III) TGTGGCAAGCTTTCAGGCGTTCCTTGTCTCGAC. Nach PCR-Amplifikation und Klonierung in pGemT-Easy wurde die Probe pGemTCypA2 mit M13for- und M13rev-Primern sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Abb. 4.6 dargestellt. Es waren keine signifikanten Sequenzunterschiede zwischen *Streptomyces lividans* und *Streptomyces coelicolor* zu erkennen.



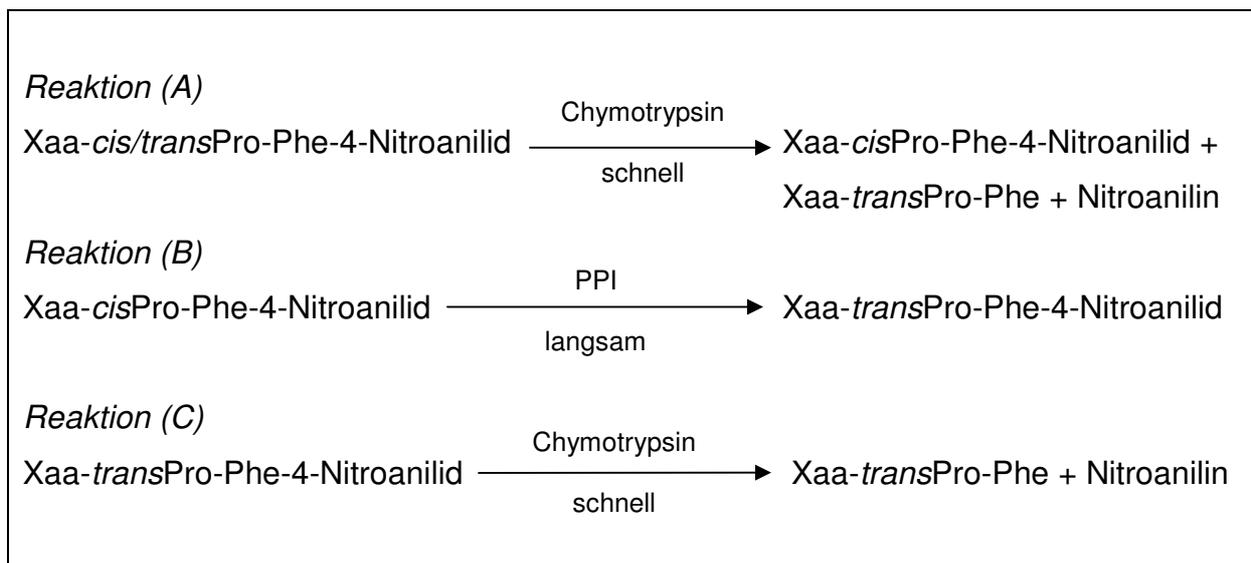
**Abb. 4.13: pGemTCypA2**

pGemTCypA2 wurde nach Ligation des PCR-Produkts 531 mit pGemT-Easy erhalten. Der Vektor diente zur Ermittlung der DNA-Sequenz von CypA2.

## 4.4 CHARAKTERISIERUNG

### 4.4.1 AKTIVITÄTSTEST

Das gereinigte Protein wurde durch einen Aktivitätstest *in vitro* auf seine Isomerasefunktion untersucht. Hierbei wurde ein chromogenes Substrat (Xaa-*cis*Pro-Phe-4-Nitroanilid) durch die Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase isomerisiert und detektiert. Die Aktivität wurde in einer Zweischnittreaktion unter Zuhilfenahme des Enzyms  $\alpha$ -Chymotrypsin bestimmt (JANOWSKI et al. 1997).



**Abb. 4.14: Einzelne Schritte der Messung zur Bestimmung von  $k_{\text{PPI}}$**

Es wurde zunächst  $k_{\text{unkatalysiert}}$  (background) gemessen. Hierzu wurde die Zusammensetzung Puffer,  $\alpha$ -Chymotrypsin und Substrat gemessen (Reaktion (A)). Zur Bestimmung von  $k_{\text{gesamt}}$  wurde Puffer,  $\alpha$ -Chymotrypsin, Substrat und die jeweilige PPIase gemessen (Reaktion (B) und (C)). Die ermittelte  $k_{\text{unkatalysiert}}$  wurde dann von der gemessenen  $k_{\text{gesamt}}$  abgezogen. Erhalten wurde die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{PPIkatalysiert}}$ .

Der langsame geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird über die nachfolgend schnelle Spaltung des *trans*-Peptides detektiert.  $\alpha$ -Chymotrypsin spaltet ausschließlich das *trans*-Substrat. Diese Spaltung erfolgt spezifisch an der Bindung zum Marker 4-Nitroanilid, welcher als *para*-Nitroanilin frei gesetzt wird. Der Anstieg des *para*-Nitroanilin kann bei 390-450 nm an einem Stopped-flow-Spektrometer beobachtet werden. Um eine eventuelle Spezifität gegenüber einem Substrat auszuschließen, wurden zwei Peptide als Substrat eingesetzt (Ala-Ala-Pro-Phe, Ala-Phe-Pro-Phe).

$$k_{\text{PPIkatalysiert}} = k_{\text{gesamt}} - k_{\text{unkatalysiert}}$$

Die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion wird durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben.

$$v = k_{\text{cat}} * [E]_0 * [S]_0 / [S]_0 + K_m$$

Aufgrund dieser Annahme, der Verwendung von  $v = k * [S]$  und der Bedingung, dass  $[S]_0 \ll K_m$  ergibt sich

$$k_{\text{PPIkatalysiert}} = k_{\text{cat}}/K_m * [E]_0$$

Somit lässt sich bei bekannter Enzymkonzentration und berechneter Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{PPIkatalysiert}}$  die spezifische Aktivität ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) der PPlasen ermitteln. Tabelle 4.1 zeigt die ermittelten Werte für Cyclophilin A1 und Cyclophilin A2.

	CypA1		CypA2	
	Ala-Ala-Pro-Phe	Ala-Phe-Pro-Phe	Ala-Ala-Pro-Phe	Ala-Phe-Pro-Phe
$k_{\text{cat}}/K_m$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	1,13 x 10 <sup>7</sup>	1,11 x 10 <sup>7</sup>	8,04 x 10 <sup>5</sup>	7,73 x 10 <sup>5</sup>

**Tab. 4.1: Ermittelte Werte des Aktivitätstests**

Zum Vergleich katalysiert humanes Cyclophilin Cyp18 mit einer  $k_{\text{cat}}/K_m$  von  $1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (JANOWSKI et al. 1997), Cyp18 (CypA) aus *Streptomyces chrysomallus* besitzt eine  $k_{\text{cat}}/K_m$  von  $3,73 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (PAHL et al. 1992). Das vergleichbare Enzym aus *E.coli* katalysiert mit einer  $k_{\text{cat}}/K_m$  von  $6,74 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (COMPTON et al. 1992).

Die Aktivität des CypA1 war um mehr als das zehnfache höher als die von CypA2. Dies gilt sowohl für das Substrat Ala-Ala-Pro-Phe-4-Nitroanilid als auch für das Substrat Ala-Phe-Pro-Phe-4-Nitroanilid. Es wurden bei beiden Cyclophilinen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Substraten festgestellt. Beide Aktivitäten ließen sich durch Zugabe von Cyclosporin A inhibieren (PERSÖNLICHE MITTEILUNG GOREN, 2001).

## 4.5 KLONIERUNG DER KNOCKOUT-MUTANTEN

### 4.5.1 ALLGEMEIN

Mittels der spezifischen Primer wurde das CypA1-Gen als auch das CypA2-Gen aus der genomischen DNA von *Streptomyces lividans* via PCR gefischt. Die Teilfragmente wurden so gewählt, dass sie über Restriktionsschnittstellen wieder zusammengefügt werden konnten. Nach Kontrolle der DNA-Sequenz durch Sequenzierung wurden in mehren Klonierungsschritten die Teilsequenzen in der richtigen Reihenfolge zusammen kloniert. Weiterhin wurde in die unmittelbare Mitte des jeweiligen PPI-Gens eine Apramycin-Resistenz-Kassette eingefügt. Diese soll zum einen zur Selektion der Knockout-Mutante in *Streptomyces lividans* dienen, als auch zum eigentlichen Knockout des PPI-Gens führen. Das komplette Knockout-Konstrukt wurde dann mittels eines temperatursensitiven Shuttle-Vektors in *Streptomyces lividans* eingebracht. Nach Induktion der homologen Rekombination wurden die Klone durch Resistenz-Selektion und PCR auf positive Knockout-Mutanten gescreent.

### 4.5.2 OPTIMIERUNG DER PCR

#### 4.5.2.1 ALLGEMEIN

Zur Isolierung des CypA1-Gens wurden spezifische Primer mittels Festphasensynthese synthetisiert, aufgereinigt und entsprechend verdünnt. Als Template-DNA für die PCR wurde genomische DNA aus *Streptomyces lividans* isoliert und mit *Bam*HI bzw. *Hind*III verdaut. Dies sollte gewährleisten, dass die Primer an ihren homologen Sequenzen anlagern und nicht durch zu lange Template-Sequenzen unspezifisch annealen. Um gewünschte Reaktionsbedingungen zu erlangen, wurden den Ansätzen entsprechende Puffer zugefügt. Da es sich bei der Streptomyceten-DNA um DNA mit einem sehr hohen GC-Gehalt von durchschnittlich mehr als 70% handelt, wurde dem Ansatz DMSO beigefügt. Tabelle XX zeigt einen beispielhaften Ansatz für die durchgeführten PCRs.

Aufgrund des hohen GC-Gehalts wurden speziell dafür vorgesehene DNA-Polymerasen verwendet. Zum Einsatz kamen Triple Master<sup>TM</sup> DNA-Polymerase, Herkulase Hotstart DNA-Polymerase, MasterAmp<sup>TM</sup> Extra Long DNA-Polymerase, HotMaster<sup>TM</sup> Taq DNA-Polymerase, Taq-DNA-Polymerase und Vent-DNA-

Polymerase. Besonders die Triple Master™ DNA-Polymerase brachte gute Ergebnisse.

Reagenz	Menge in $\mu\text{l}$
Template-DNA ( <i>Hind</i> III bzw. <i>Bam</i> HI)	5
10 x Puffer	5
DMSO	2
A. dem.	25 - 25,5
dNTP's (1,25 mM/dNTP)	8
Forward-Primer (12,5 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2
Reverse-Primer (12,5 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2
DNA-Polymerase	0,5 -1
Gesamtvolumen	50

**Tab. 4.2: PCR-Ansatz**

Tabelle 4.2 zeigt einen typischen PCR-Ansatz.

Aufgrund des hohen GC-Gehalts der Streptomyces-DNA zum einen als auch der massiven Sekundärstrukturbildung stellte sich die Amplifikation vor allem bei der CypA1-Sequenz mittels PCR als schwierig heraus. Viele Sekundärstrukturelemente bilden sich in Bereichen mit hohem GC-Gehalt aus. Es muss also davon ausgegangen werden, dass diese aufgrund der stabileren drei Wasserstoffbrücken zwischen G und C noch schwerer aufzubrechen sind, als solche in denen mehr A und T mit nur zwei Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Ein weiteres Problem ist die Renaturierung der Template-DNA. Vor allem hier kommt es anstelle eines spezifischen Primerannealings zur Ausbildung von Sekundärstrukturen. Daraus resultierte eine geringe Ausbeute bzw. unspezifische Amplifikate.

Zunächst wurde die PCR mit der Standardvariante an DNA-Polymerase, der Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Aufgrund der geringen Ausbeute und oben beschriebener Bedingungen, wurden speziell für GC-reiche Sequenzen modifizierte DNA-Polymerasen eingesetzt (Herkulase Hotstart DNA-Polymerase, Triple Master™ DNA-Polymerase). Weiterhin wurden für die Amplifikation längere Fragmente ebenfalls auf solche Problematiken angepasste Enzyme verwendet. Hierzu zählt die MasterAmp™ Extra Long DNA-Polymerase. Die besten Ergebnisse wurden mit der Triple Master™ DNA-Polymerase erzielt.

#### 4.5.2.2 DER EINSATZ VON CO-SOLVENT

DMSO ist ein Co-Solvent, das DNA durch das Aufbrechen von Basenpaarungen destabilisiert und damit die Schmelztemperatur der DNA erniedrigt. DMSO und weitere Additive wie z.B. Glycercol, Betain oder Acetamid können die Amplifikation GC-reicher DNA-Sequenzen verbessern, auch solche, deren Amplifikation unter Standardbedingungen nicht möglich ist. Deshalb wurde den PCR-Ansätzen DMSO zugesetzt (VARADARAJ et al 1994). Es wurde experimentell die optimale Menge an DMSO ermittelt, da diese von Länge, GC-Gehalt und Komplexität der DNA abhängig ist. Hierzu wurden drei Fragmente unterschiedlicher Länge gewählt und mit 2 bis 8% DMSO in 1%-Schritten getestet. Die Ansätze wurden miteinander verglichen. Die Zugabe von 2 µl DMSO bzw. 4% ergab die besten Ergebnisse.

#### 4.5.2.3 DIE TEMPLAT-DNA

Als Template wurde zunächst genomische DNA aus *Streptomyces lividans* verwendet, nachdem diese mit *HindIII* bzw. *BamHI* behandelt worden war. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass die jeweils gewünschte Zielsequenz nicht geschnitten wurde. Die Konzentration der Template-DNA wurde im UV-Spektrometer bestimmt. Wird zuviel DNA eingesetzt, steigt die Wahrscheinlichkeit von Fehlhybridisierungen zwischen DNA und Primer.

Bei späteren PCRs wurde als Templat sowohl das einzelne aufgereinigte Fragment, als auch das jeweilige Fragment in pGemT-Easy eingesetzt. Die Ergebnisse bezogen auf die unterschiedlichen Template-DNA waren vergleichbar.

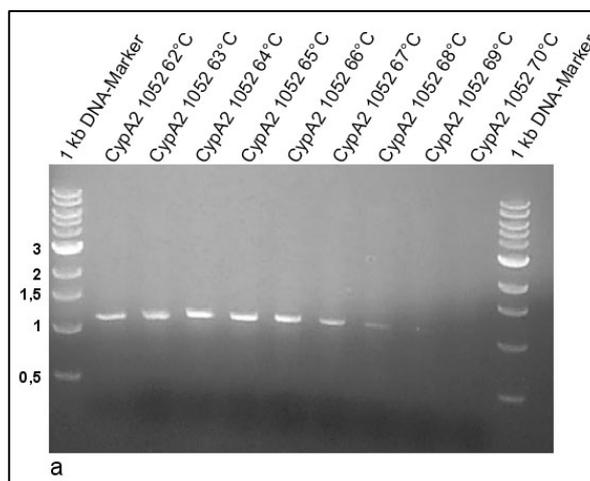
#### 4.5.2.4 DIE ANNEALING-TEMPERATUR

Die Annealingtemperaturen der Primer wurden nach folgender Formel näherungsweise bestimmt:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (nA+nT) + 4^{\circ}\text{C} \times (nG+nC)$$

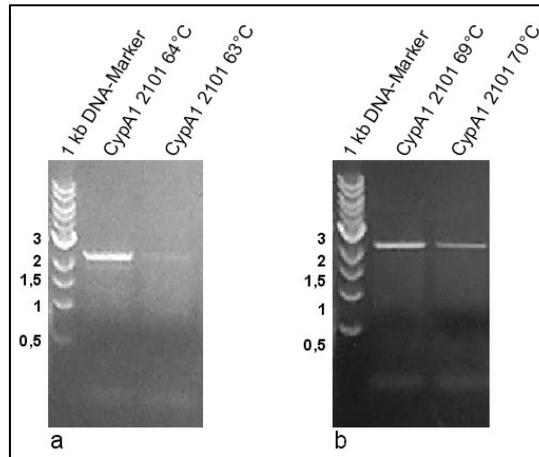
Diese Temperatur gibt Auskunft darüber, bei welcher Temperatur 50% der Primer nicht mehr an das Template binden, nicht aber der Temperatur bei der der Primer zuverlässig hybridisiert. Die Annealingtemperatur wurde daher 5-10°C niedriger angesetzt.

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik wurde nach ersten Versuchen mit geringer Ausbeute die optimale Annealingtemperatur experimentell bestimmt. Die PCRs wurden bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen durchgeführt, um ein optimales Primerannealing zu erhalten. Es wurden Temperaturschritte von einem Grad Celsius gewählt. Hierbei stellte sich heraus, dass schon die Änderung von einem Grad Celsius signifikante Auswirkungen auf die Amplifikation des gewünschten Fragments hatte. Die PCR wurde jeweils mit 20 µl und einem zeitlich verkürztem Programm durchgeführt. Die Cyclenzahl belief sich hierbei nur auf maximal 15 Zyklen.



**Abb. 4.14: Temperaturabhängigkeit der PCR CypA1**

Das Gelbild stellt die Temperaturabhängigkeit der PCR des Fragments CypA2 1052 dar. Der errechnete  $T_m$ -Wert für die Primer 2Au8 und 2Au4 liegt bei 66°C bzw. 62°C. Experimentell wurde ein Wert von 65°C ermittelt.



**Abb. 4.15: Temperaturabhängigkeit der PCR CypA2**

Abbildung a zeigt, wie groß der Unterschied der Ausbeute zwischen nur einem Grad Celsius sein kann. In der zweiten Spur ist der PCR-Ansatz bei einer Annealingtemperatur von 64 °C aufgetragen. Die Intensität der Bande ist relativ hoch. Hingegen sieht man in der dritten Spur nur noch einen leichten Schimmer. Hier war die Annealingtemperatur um ein Grad auf 63°C erniedrigt. Die  $T_m$ -Werte der verwendeten Primer betragen 66°C und 68°C. Abbildung b stellt die gleiche Abhängigkeit am oberen Grenzwert dar.

CypA1	
Fragment [bp]	Optimale Annealingtemperatur [°C]
519	68
1066	61
1052	65
750	61
334	60
2101	68

CypA2	
Fragment	Optimale Annealingtemperatur [°C]
441	60
1051	61
1192	63

**Tab. 4.3: Annealingtemperatur**

Die Tabelle 4.3 gibt die optimalen Annealingtemperaturen der einzelnen Fragmente wieder. Es wurden jeweils 20 µl-Ansätze im Thermocycler einem verkürzten PCR-Programm PCR unterzogen. Die Temperatur, bei der die Banden die höchste Intensität zeigten, wurde für spätere Läufe als Annealingtemperatur eingesetzt.

#### 4.5.2.5 DIE PRIMERWAHL

Die Primer wurden so gewählt, dass sowohl die Cyp-Sequenz als auch flankierende Bereich amplifiziert wurden. Zur homologen Rekombination sind ca.1000 bp auf beiden Seiten der Mutation notwendig. Die Primer 1Au1, 1Au2, 1Au3, 1Au6 (CypA1), sowie 2Au1, 2Au2, 2Au3, 2Au6 (CypA2) wurden so ausgewählt, dass die Generierung einer Schnittstelle, hier *EcoRI*, *BamHI* und *HindIII*, mit möglichst geringer Mutation einherging. Weiterhin wurde versucht, die Anteile an A, T, G und C

möglichst gleichmäßig zu halten. Aufgrund des hohen GC-Gehalts war das jedoch nicht immer möglich. Weiterhin wurde versucht, die Abfolge von mehr als vier gleichen Basen hintereinander zu vermeiden. Am 3'-Ende wurde darauf geachtet, dass ein bis zwei G oder C vorhanden waren, damit eine bessere Bindung und Elongation garantiert waren. Es war jedoch aufgrund der festgelegten Sequenz nicht zu vermeiden, dass mehrere G bzw. C vorhanden waren, die bei zu hoher Anzahl zu Fehlhybridisierung führen können. Dies könnte mit ein Grund für die zum Teil unspezifische Amplifikation sein. Die Primer wurden weiterhin auf Komplementarität untereinander, als auch auf die Möglichkeit zur Ausbildung interner Sekundärstrukturen geprüft. Damit beide Primer mit hoher Wahrscheinlichkeit hybridisierten, wurden die Längen der Primerpaare so gewählt, dass daraus ähnliche  $T_m$ -Werte resultierten.

#### 4.5.2.6 DIE DENATURIERUNG BZW. HOT-START-EXPERIMENTE

Die Denaturierungszeit sollte aufgrund der hohen Temperatur und der damit verbundenen Primerdepurinierung und Nukleotid-Zersetzung möglichst kurz gehalten werden. Auf der anderen Seite, benötigt die Templat-DNA eine gewisse Zeit, um zu denaturieren und den Primern eine Anlagerung zu ermöglichen. Vor allem bei GC-reichen Sequenzen ist es sinnvoll, die initiale Denaturierungsphase aufgrund des stärkeren Zusammenhalts der Doppelstränge länger durchzuführen.

Die Zyklenzahl wurde auf 30 beschränkt. Bei mehr als 30 Zyklen kam es zu Schmiereffekten. Wurde eine PCR zur Ermittlung von empirischen Daten wie optimaler Annealingtemperatur durchgeführt, wurde die Zyklenzahl auf 15 reduziert.

Zu Beginn der PCR kann es aufgrund der noch niedrigen Temperaturen zu Fehlhybridisierungen kommen. Daher wurde zunächst eine initiale Denaturierungsphase von ca. 5 min durchgeführt. Um bei diesen hohen Temperaturen einen optimalen Enzymeinsatz zu gewährleisten, wurden zum Teil Hotstart-Enzyme verwendet (Herkulase<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase, HotMaster<sup>™</sup>Taq DNA-Polymerase). Die Herkulase wird z.B. nach Abdiffusion eines temperatursensitiven Antikörpers freigesetzt.

#### 4.5.2.7 DIE PCR-PROGRAMME

Alle Komponenten der PCR wurden bis zum Einstellen des Ansatzes in das PCR-Gerät und dem Starten der PCR auf Eis gelagert. Im Anschluss an die PCR wurden die Proben bei 4°C bzw. -20°C gelagert, bzw. direkt aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Fragmente wurden zunächst anhand ihrer Größe identifiziert. Später nach der Klonierung in pGemT-Easy wurde die genaue DNA-Sequenz durch Sequenzierung ermittelt.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98	3	1
Zugabe der DNA-Polymerase	97	2	1
Denaturierung	95,5	1	29
Annealing	s. Tab. 4.3	1	29
Synthese	72	1:30	29
Finale Synthese	72	10	1
Lagerung	4		

**Tab. 4.4: Programm für Hotstart-Enzyme (Herkulase® Hotstart DNA Polymerase, HotMaster™Taq DNA-Polymerase)**

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	94,5	1	29
Annealing	s. Tab. 4.3	1:30	29
Synthese	72	1:30	29
Finale Synthese	72	5	1
Lagerung	4		

**Tab. 4.5: Verkürztes Programm für die allgemeine Amplifikation (Triple Master™ DNA-Polymerase, Taq-DNA-Polymerase und Vent-DNA-Polymerase)**

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	94,5	1	15
Annealing	s. Tab. 4.3	1:30	15
Synthese	72	1:30	15
Finale Synthese	72	5	1
Lagerung	4		

Tab. 4.6: Programm für die Optimierung der Annealingtemperaturen und des DMSO-Gehalts (Triple Master™ DNA-Polymerase)

## 4.5.3 KLONIERUNG IN PGEMT-EASY

### 4.5.3.1 DAS A-TAILING

Thermostabile DNAPolymerasen mit Proofreading-Funktion wie z.B. die hier verwendeten DNA-Polymerasen generieren am Ende des amplifizierten Fragments ein stumpfes Ende (blunt end). Dennoch können diese Fragmente nach Behandlung mit Taq-DNA-Polymerase zur Ligation mit dem pGemT-Easy Vektor eingesetzt werden. Um eine erfolgreiche Ligation zu erreichen, benötigen die Fragmente ein 3'-überhängendes Adenosin.

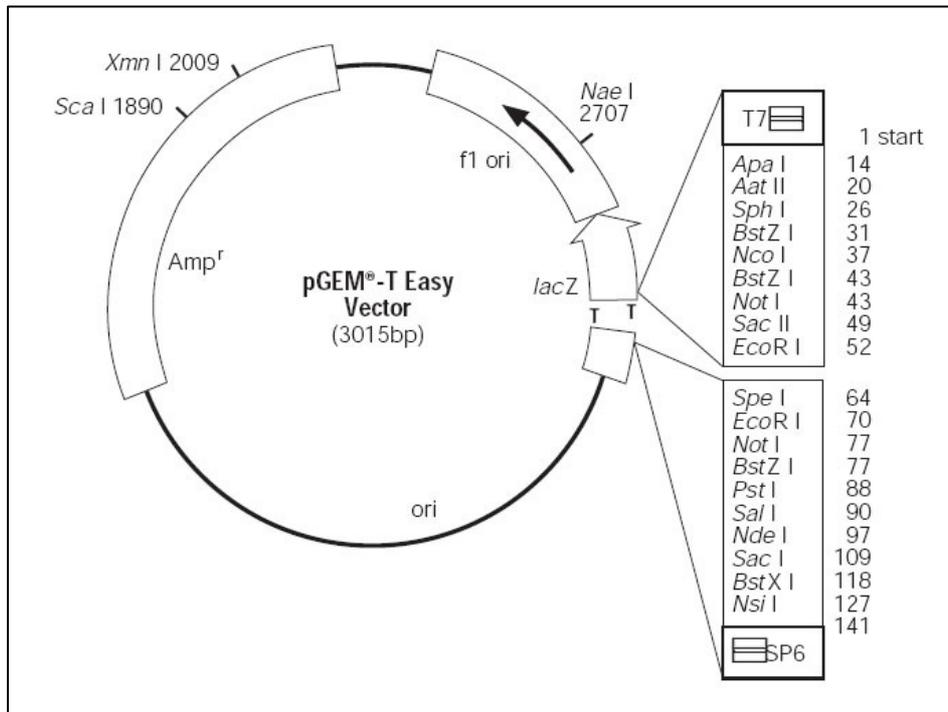
Hierzu wurden die betreffenden Fragmente 30 min nach der PCR und Auftrennung mittels Gelelektrophorese mit Taq-DNA-Polymerase inkubiert. Diese baut am 3'-Ende ein zusätzliches Adenosin ein, sodass der benötigte Überhang entsteht. Nach einer Aufreinigung mittels Quiagen Reaction Cleanup Kit wurde der Ansatz weiter zur Ligation verwendet.

Werden die Fragmente nach der PCR nicht aufgereinigt und gleich einem A-Tailing unterzogen, kann es passieren, dass die Proofreading-Funktion der bei der PCR verwendeten DNA-Polymerase das zusätzliche Adenosin wieder abbaut.

### 4.5.3.2 LIGATION UND SELEKTION MITTELS BLAU-WEIß-SELEKTION

Dem Vektor pGemT-Easy wurde nach Restriktion mit *EcoRV* ein 3'-terminales Thymidin angefügt. Diese Stelle befindet sich inmitten des  $\beta$ -Galaktosidasegens. Hier ist ebenfalls eine Multiple Cloning Site vorhanden. Die Insertion eines DNA-Fragments über die überhängenden Thymidine verhindert die Transkription des  $\alpha$ -

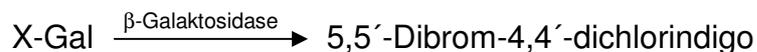
Peptides und erlaubt eine schnelle Selektion der rekombinanten Klone. Positive Klone können direkt aufgrund der Farbreaktion identifiziert werden.



**Abb. 4.16: Übersicht pGemT- Easy (Promega)**

An Position 60 befindet sich das 3'-überlappende Thymindin. Dieses ist innerhalb des *lacZ* angesiedelt. Um die Position befindet sich die Multiple-Cloning Site.

Wird die  $\beta$ -Galaktosidase in der Zelle exprimiert, wird dem Medium beigefügtes 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (X-Gal) abgebaut und die Kolonie färbt sich blau.

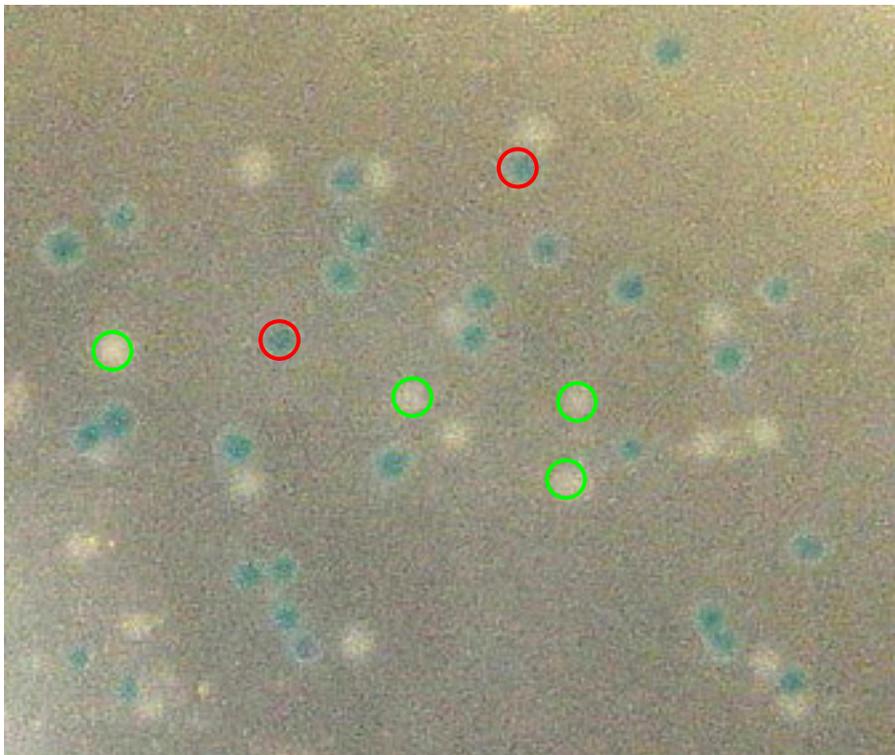


Rekombinante Klone, deren  $\beta$ -Galaktosidase-Sequenz unterbrochen worden ist, können diese nicht exprimieren und damit auch kein X-Gal abbauen. Sie erscheinen weiß. Zusätzlich zum X-Gal wird dem Nährmedium noch Isopropylthiogalaktosid (IPTG) zugegeben. Dieses Galaktose-Derivat induziert den *lac*-Promotor.

Weiterhin ist auf dem pGemT-Easy Vektor die genetische Information zur Ausbildung einer Ampicillinresistenz vorhanden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Klone ohne Plasmid und damit ohne die Resistenz auf der Transformationsplatte wachsen. Um die PCR-Produkte in genügender Menge für die Sequenzierungsreaktion als auch für die spätere Klonierung zu erhalten, wurde diese nach dem A-Tailing mit

pGemT-Easy ligiert. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10  $\mu$ l. Daher wurden 0,5 ml-Caps verwendet, um geringe DNA-Wechselwirkungen mit der Tubenwand zu erhalten. Weiterhin wurde die mitgelieferte T4-DNA-Ligase verwendet, um auszuschließen, dass eventuelle Exonukleasen die Überhänge degradieren. Der Ligationsansatz wurde meist über Nacht bei 4 °C inkubiert, um die maximale Anzahl an positiven Transformaten zu erhalten.

Die Transformation erfolgte standardmäßig mit kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  bzw. JM 109. Nach der Inkubationszeit wurden Selektionsplatten erhalten. Die folgende Abb. 4.17 zeigt einen Ausschnitt einer Transformationsplatte. Zu sehen sind positive weiße (grün eingerahmt), als auch negative blaue (rot eingerahmt) Kolonien.



**Abb. 4.17: Ausschnitt Transformationsplatte; Blau-Weiß-Selektion**

In Abbildung 4.17 ist ein Ausschnitt einer Transformationsplatte zu sehen. Grün dargestellt sind positive Klone. Der rote Kreis zeigt negative, blaue Klone, die die  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren und damit in der Lage sind 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo herzustellen.

Wie schon beschrieben stellen die weißen Kolonien positive Klone dar. Das im Medium vorhandene X-Gal kann nicht zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo abgebaut werden, da die Insertion der DNA-Fragmente die Expression des  $\beta$ -Galaktosidasegens unterbinden.

Positive weiße Kolonien wurden in mit flüssigem Nährmedium gefüllte Reagenzgläser überführt und inkubiert. Hierbei wurde weiterhin mit dem Antibiotikum Ampicillin inkubiert, um eine Kontamination zu vermeiden.

Die über Nacht gewachsenen Klone wurden mittels Standardminipräparation behandelt. Hierbei wurde die Plasmidisolierung mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit durchgeführt, um sicher zu stellen, dass eventuelle Reste von RNA und Enzymen abgetrennt worden sind. Es erfolgte sicherheitshalber eine Ethanol-Präzipitation. Der DNA-Gehalt der Probe wurde im UV-Spektrometer bestimmt. Für die anschließende Sequenzierung wurden die Proben so verdünnt, dass für ca. fünf Sequenzierläufe je 2 µg zur Verfügung standen. Um sicher zu stellen, dass auch wirklich das gewünschte Plasmid erhalten wurde, wurden Proberestriktionen durchgeführt. Diese gaben Aufschluss in welcher Orientierung das Fragment ligiert war.

#### 4.5.4 SEQUENZIERUNG

Wie bereits dargestellt, wurden der eigentlich kodierende Bereich für CypA1 und CypA2 über pGemTCpyA1 respektive pGemTCypA2 sequenziert. Für die Knockout-Mutanten wurden zusätzlich Bereiche gewählt, die das Cyclophilin umgeben. Im Zuge der einzelnen Strategien wurden diese Bereiche ebenfalls sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung der von pGemTCypA1 und pGemTCypA2 sind in Abb. 4.2 bzw. Abb. 4.6 dargestellt. Die CypA1-Fragmente pGemT2101, pGemT334 und pGemT1052, als auch der CypA2-Fragmente pGemT442, pGemT1052 und pGemT1192 finden sich im Anhang. Nähere Erläuterungen zu den Fragmenten finden sich in den einzelnen Klonierungsstrategien. Im Allgemeinen waren keine signifikante Änderungen in der DNA-Sequenz im Vergleich zu *Streptomyces coelicolor* zu finden.

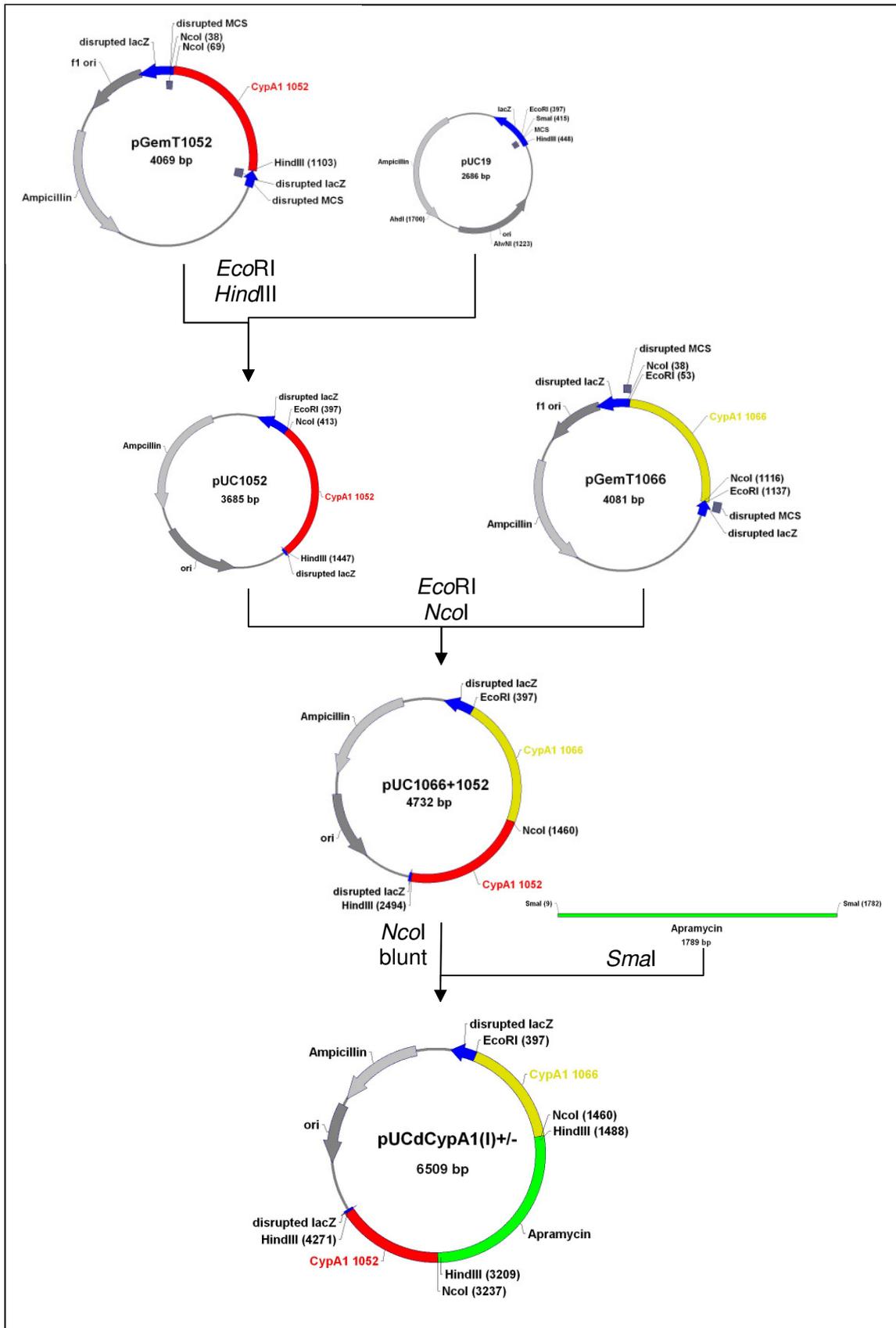
Vergleiche der in Aminosäuresequenz übersetzten Proteine CypA1 und CypA2 mit weiteren Organismen u.a. *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces chrysomallus* und *Saccharomyces cerevisiae* finden sich in Abb. 4.3 und Abb. 4.5.

#### 4.5.5 CYP A 1 STRATEGIE I

Aufgrund des hohen GC-Gehalts in *Streptomyces lividans* wurde zunächst von einer kompletten Amplifikation des CypA1-Gens abgesehen. Da zur Knockout-Konstruktion nicht nur das eigentliche Gen, sondern ebenfalls Bereiche der umgebenen Sequenzen verwendet wurden, hat das zu amplifizierende Stück eine Größe von ca. 2200 bp. Um eine homologe Rekombination zu gewährleisten, sollten ca. 1000 bp die mutierte Sequenz umgeben bzw. mit der genomischen DNA homolog sein. Zunächst sollte das CypA1-Gen inklusive umgebender Sequenzen in zwei Teilstücken via PCR amplifiziert werden. Abb. 4.18 zeigt die Klonierungsstrategie I.

Nachdem die entsprechenden Fragmente sequenziert waren, wurde das Fragment 1052 aus pGemT1052 in pUC19 transferiert werden. Aufgrund der weiteren Klonierung war es technisch nicht möglich, mit dem pGemT-Easy-System zu arbeiten. Aus diesem Grund wurde das Fragment 1052 in pUC19 kloniert. Daraus resultierte das Plasmid pUC1052. Über eine *NcoI*-Schnittstelle sollten die beiden Fragmente 1066 und 1052 wieder zur kompletten CypA1-Sequenz zusammen kloniert werden. Gleichfalls lag *NcoI* günstig in der Mitte der Sequenz und besaß nur eine Restriktionsschnittstelle im ausgewählten Abschnitt. Daher wurde diese Schnittstelle zum Einbringen von Apramycin verwendet. Nachdem das Apramycin-Gen in die Mitte der amplifizierten CypA1-Sequenz eingeführt wurde, stehen zur homologen Rekombination noch ca. 1000 bp an jeder Seite zur Verfügung. Das Knockoutkonstrukt sollte in einen Shuttle-Vektor transferiert werden, um dann in *Streptomyces lividans* transformiert zu werden.

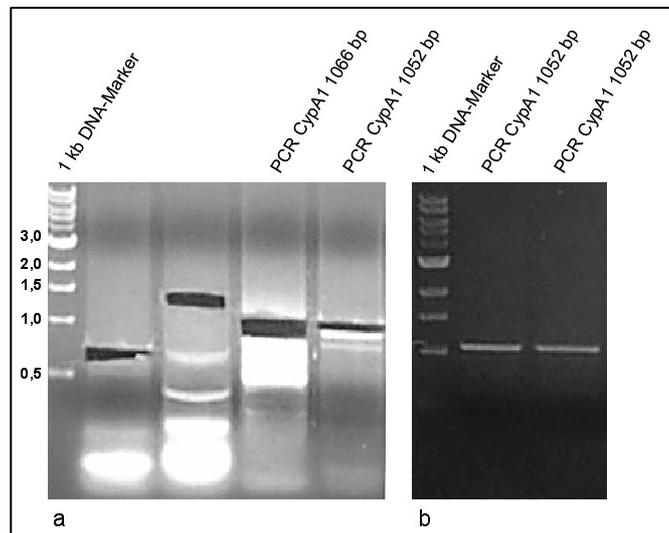
Das Fragment 1066 wurde mit den Primern 1Au3 (CypA1for, *EcoRI*) ACCGGCGAA  
TTCACCTCGGCCGACGCCG und 1Au4 (CypA1rev, *NcoI*)  
CGTTCGCCATGGACAGGAGG amplifiziert. Der Primer 1Au3 wurde so gewählt, dass sich durch geringe Mutation die Schnittstelle für *EcoRI* generieren ließ. Weiterhin wurden 6 Basen vor der einmutierten Schnittstelle im Primer mitsynthetisiert, um den späteren Restriktionsschnitt mit *EcoRI* zu gewährleisten. Der Primer 1Au4 wurde so gewählt, dass die natürlich vorhandene *NcoI*-Schnittstelle zur Klonierung ausgenutzt werden konnte.



**Abb. 4.18: Klonierungsstrategie I**

Mittels der über Primer einklonierten Restriktionsschnittstellen wurde nach Kontrolle durch Sequenzierung das Fragment 1052 in pUC19 einkloniert werden. Im Folgenden werden die Fragmente 1052 und 1066 wieder zusammengefügt. Nach Einbringen der Apramycinresistenz wird das Knockout-Konstrukt in einen Shuttle-Vektor transferiert.

Das Fragment 1052 wurde mit den Primern 1Au5 (CypA1for, *NcoI*) TCCTGTCCA TGGCGAACGCG und 1Au6 (CypA1rev, *HindIII*) CCACAGAAAGCTTGCCGAGCAGGAACGGCG amplifiziert. Auch hier wurden unter oben erwähnten Kriterien Primer ausgewählt. In den Primer 1Au6 wurde zur späteren Vereinfachung der Klonierung *HindIII* einmutiert.



**Abb. 4.19: PCR CypA1 1066 und 1052**

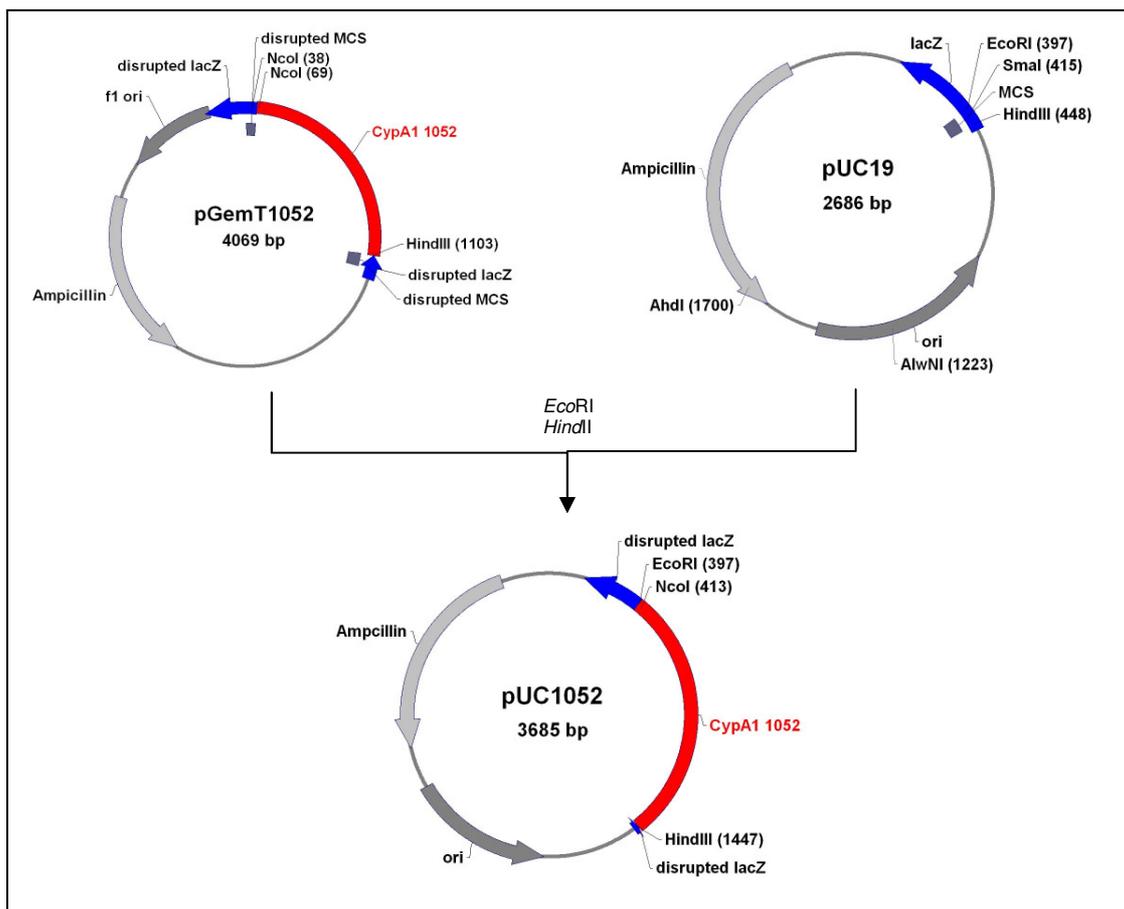
In der ersten Spur ist jeweils als Längenstandard der 1 kb-DNA-Marker aufgetragen. In Abb. a ist in der dritten Spur der PCR-Ansatz 1066 (50  $\mu$ l) aufgetragen. In Abb. b ist das Ergebnis der PCR des Fragments 1052 zu sehen. Man erkennt unspezifische Amplifikationsprodukte in der dritten Spur beim Fragment 1066, hingegen nur eine spezifische Bande beim Fragment 1052.

Die amplifizierten Fragmente wurden nach der PCR mittels Gelelektrophorese aufgereinigt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.19 dargestellt. Für das Fragment 1052 gestaltete sich die Amplifikation problemlos, hingegen Fragment 1066 unspezifische Produkte aufwies. Nach der Aufreinigung wurden die Fragmente jeweils einem A-Tailing unterzogen und nach erneuter Aufreinigung in der Ligation mit pGemT-Easy eingesetzt. Das jeweilige Fragment in pGemT-Easy-Vektor ergaben pGemT1052 bzw. pGemT1066.

Probleme ergaben sich beim Fragment 1066. Wie in der Abb. 4.19 zu sehen ist, konnte trotz verschiedener Bedingungen, PCR-Methoden und -Systeme kein spezifisches Amplifikat erhalten werden. Man kann deutlich die unspezifischen Produkte im Bereich von 0,5 bis 1,2 kb erkennen. Dies ist auf den hohen GC-Gehalt von 69,2% und der Ausbildung von Sekundärstrukturen. In weiteren Ansätzen bzw. Gelen trat das Fragment 1066 immer als Doppelbande auf. Versuche die Doppelbanden vollständig voneinander zu trennen, schlugen fehl. Die isolierten Banden zeigte ein negatives Ergebnis bei der Sequenzierung.

Der pGemT1052-Vektor wurde in *E. coli* JM109 transformiert und über Nacht kultiviert. Positive weiße Klone wurden über Nacht in Flüssigkulturen inkubiert. Am folgenden Tag wurden diese Proben einer Minipräparation nach Standard-Methoden unterzogen. Hierzu wurde der QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit benutzt, da die Proben für die Sequenzierung einen hohen Reinheitsgrad aufweisen müssen. Die erhaltenen Plasmide wurden mit den Standard-Primern M13-forward und M13-reverse sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung finden sich im Anhang. Signifikante Abweichungen von der angenommenen Ursprungssequenz waren nicht zu beobachten.

pGemT1052 wurde mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten. Nach dem Verdau wurde der Ansatz gereinigt und in der Ligation mit dem *EcoRI* / *HindIII* geschnittenen pUC19 eingesetzt. Nach Transformation unter Ampicillin-Selektion und ÜNK wurde das Plasmid pUC1052 isoliert und mittels Kontrollrestriktionsverdau nachgewiesen.



**Abb. 4.20: Klonierung von pUC1052**

Mittels *EcoRI* und *HindIII* wurde das Fragment 1052 in den Vektor pUC19 inkloniert.

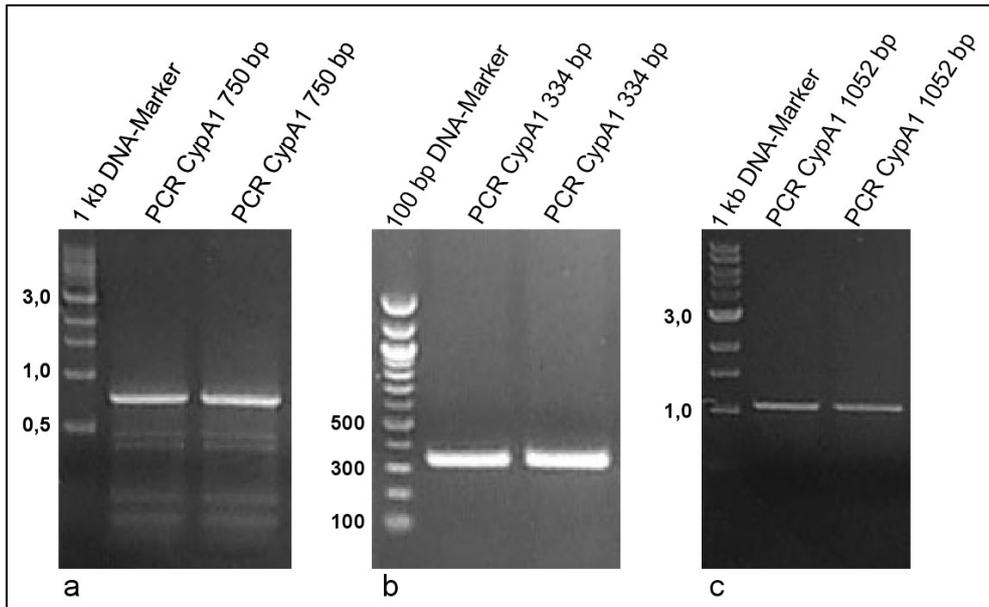
Beim Fragment 1066 konnte wie oben beschrieben keine eindeutige Trennung der Doppelbanden erreicht werden. Deshalb wurde von einer weiteren Fortführung der Strategie abgesehen. Strategie II beschreibt die daraus resultierende Weiterführung.

#### 4.5.6 CYP A1 STRATEGIE II

Das Fragment 1066 wurde in zwei kleinere Teilfragmente (750 bp und 334bp) aufgeteilt, so dass eine bessere Amplifikationsrate zu erwarten ist. Aufgrund der nun unterschiedlichen Verwendung von Restriktionsschnittstellen wurde eine neue Strategie entwickelt.

Das Fragment 750 wurde mit den Primern 1Au3 (CypA1for, *EcoRI*) ACCGGCGAA  
TTCACCTCGGCCGACGCCG und 1Au7 (CypA1rev, *BstEII*) GTGACGGGTGACCCC  
CG amplifiziert. Der Primer 1Au3 wurde so gewählt, dass sich durch geringe Mutation die Schnittstelle für *EcoRI* einbringen ließ. Weiterhin wurden 6 Basen vor der einmutierten Schnittstelle mitsynthetisiert, um den späteren Restriktionschnitt mit *EcoRI* zu gewährleisten. Das Fragment 334 wurde mit den Primern 1Au8 (CypA1for, *BstEII*) ACC GGG GGT CAC CCG TC und 1Au4 (CypA1rev, *NcoI*) CGT TCG CCA TGG ACA GGA G amplifiziert. Die Fragmente wurden so gewählt, dass sie über eine natürlich vorhandene *BstEII*-Schnittstelle wieder verknüpft werden konnten. 1052 wurde wie in Strategie II erhalten.

Zunächst wurden die alle drei Fragmente via PCR amplifiziert und in pGemT-Easy kloniert. Nach der Kontroll-Sequenzierung sollte pGemT750 mit *EcoRI* und *BstEII* geschnitten werden. pGemT334 wurde mit *BstEII* / *SalI* geschnitten. In einer Ligation sollten die Fragmente 334 bp und 750 bp in den vorbereitenden mit *EcoRI* und *SalI* geschnittenen pUC19 kloniert. Daraus sollte der Vektor pUC750+334 resultieren. pUC750+334 sollte mit *NcoI* und *HindIII* geschnitten werden. Als Insert wurde das Fragment 1052 aus pGemT1052 mit *NcoI* und *HindIII* heraus geschnitten. Die aufgereinigten Fragmente sollten ligiert und anschließend in *E. coli* JM109 transformiert werden. Unter Ampicillin-Selektion sollte das Plasmid pUC750+334+1052 nach Anzucht unter Ampicillin-Selektion erhalten werden.



**Abb. 4.21: PCR CypA1 750, 334 und 1052**

In der ersten Spur ist jeweils als Längenstandard der 1 kb-DNA-Marker aufgetragen. In Abb. a ist der PCR-Ansatz 750 (50 µl) aufgetragen. Auch hier finden sich wie bei dem 1066 großen Fragment aus Strategie I unspezifisch Banden. In Abb. b ist das Ergebnis der PCR des Fragments 334 zu sehen. Abb. c zeigt das Produkt der PCR des Fragments 1052.

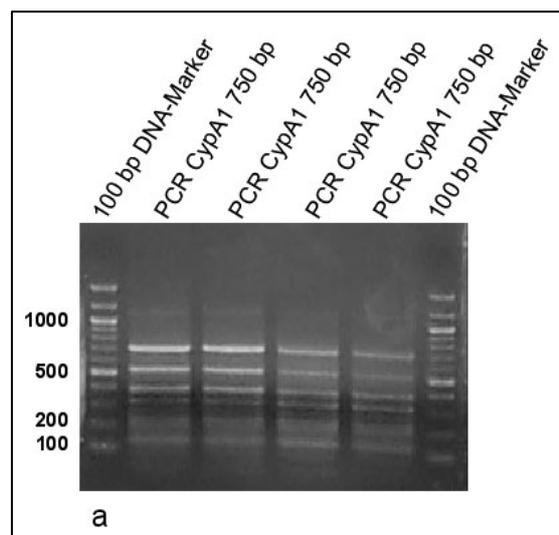
pUC750+334 sollte mit *Nco*I und *Hind*III geschnitten werden. Als Insert wurde das Fragment 1052 aus pGemT1052 mit *Nco*I und *Hind*III herausgeschnitten. Die aufgereinigten Fragmente sollten ligiert und anschließend in *E.coli* JM109 transformiert werden. Unter Ampicillin-Selektion sollte das Plasmid pUC750+334+1052 nach Anzucht unter Ampicillin-Selektion erhalten werden.

Zum Einbringen der Apramycin-Resistenzkassette sollte der Vektor pUC750+334+1052 mit *Nco*I geschnitten werden. Es sollte ein Blunt Ending dieses 5'-Überhangs folgen. Das mit *Sma*I blunt geschnittene Apramycin sollte so in die CypA1-Sequenz integriert werden. Es sollte der Vektor pUCdCypA1(III)+/- resultieren. Mittels Sequenzierung sollte festgestellt werden, in welcher Orientierung die Apramycinresistenz eingebaut wurde.

Beim Versuch das Fragment 750 via PCR zu amplifizieren, waren auf dem Gel unspezifische Banden zu finden. Das bei ca. 750 bp isolierte Fragment wurde in pGemT-Easy inkloniert und zur Kontrolle mit den Primern M13for und M13rev sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung entsprach nicht der erwarteten Sequenz, die hätte ähnlich der von *Streptomyces coelicolor* sein müssen. Zunächst

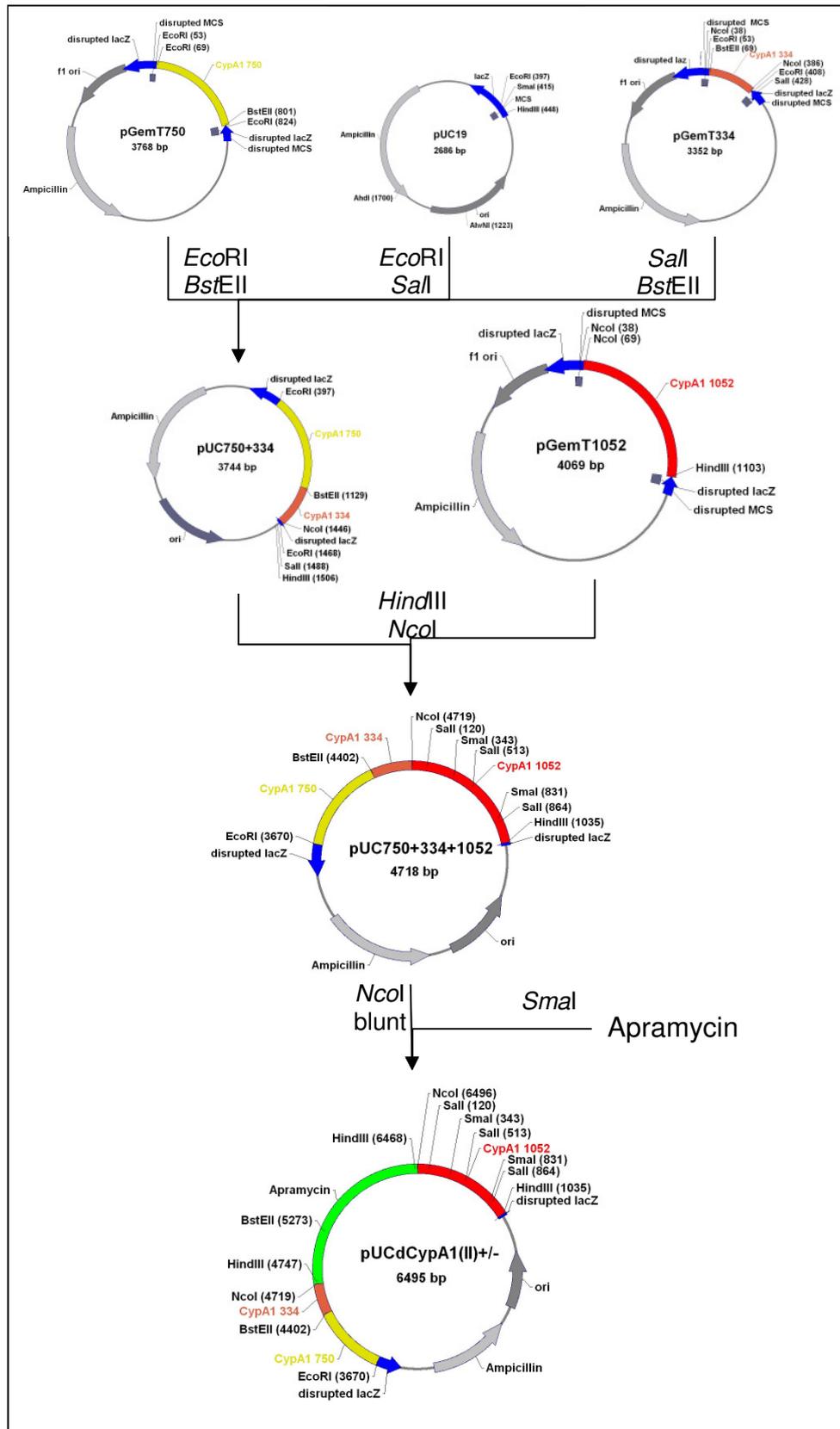
wurden die Bedingungen der PCR so verändert, dass die Primer spezifischer binden konnten. Es wurde experimentell versucht, ein Temperaturoptimum für das Anlagern der Primer an die Template-DNA zu finden. Weiterhin wurde versucht eine möglichst hohe Annealingtemperatur beizubehalten, ohne jedoch die Ausbeute zu gering werden zu lassen. Im Endeffekt wurde die Länge der Primer variiert. Dies alles führte jedoch zu keinem besseren Ergebnis.

Das Fragment 750 bp ließ sich mittels PCR nicht amplifizieren und erwies sich als derjenige Abschnitt, der Sekundärstrukturen ausbildete. Isolierte Banden auf Höhe der erwarteten Länge ergaben nicht das gewünschte Produkt. Es wurden zum Teil ähnliche Bereiche des Genoms von *Streptomyces lividans* amplifiziert. Dem hohen GC-Gehalt von 72,6% und der Ausbildung von Sekundärstrukturen konnte trotz mehrfach veränderten PCR-Bedingungen nicht entgegengewirkt werden.



**Abb. 4.22: PCR CypA1 750**

Die Abbildung zeigt verschiedene PCR-Ansätze des Fragments 750. In der ersten und letzten Spur ein 100 bp DNA-Marker aufgetragen. Die Bande um 700 bp wurde isoliert und in pGemT-Easy inkloniert, zeigte jedoch nach der Sequenzierung ein negatives Ergebnis. Trotz verschiedener PCR-Bedingungen konnte kein eindeutigeres Ergebnis erzielt werden. Dies lässt sich mit dem hohen GC-Gehalt von 72,6% und der Tendenz zu Ausbildung von Sekundärstrukturen erklären.

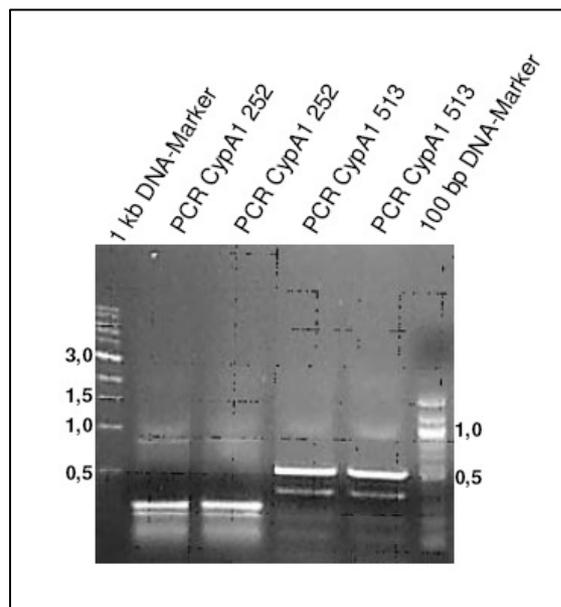


**Abb. 4.23: Überblick Klonierungsstrategie II**

Das in Strategie II erfolglos amplifizierte Fragment 1066 wurde in zwei kleinere Fragmente aufgeteilt. Mittels *BstEII* sollten die Fragmente später wieder zusammen kloniert werden. Es wurde davon ausgegangen, dass die Amplifikation bessere Ergebnisse bringen würde. Das Fragment 750 erwies sich jedoch als derjenige Teil, der Sekundärstrukturen ausbildete.

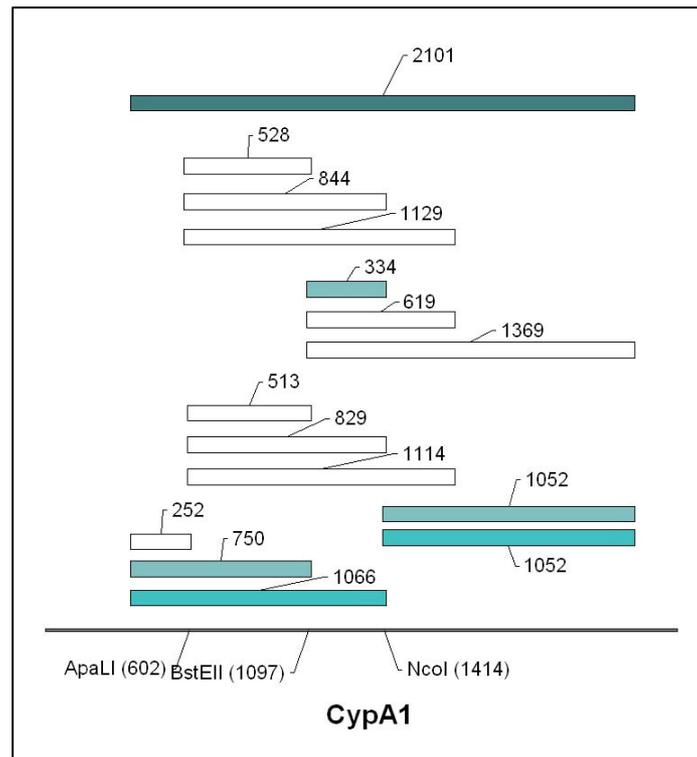
### 4.5.7 CYP A1 STRATEGIE III

Aufgrund dieser Amplifikationsprobleme wurden diverse PCR-Experimente durchgeführt, um das Problem mit dem ersten Abschnitt der CypA1-Sequenz in den Griff zu bekommen. Hierbei wurden verschiedene Kombinationen von Primern untersucht. Eine Übersicht ist in Abb. 4.25 dargestellt. Erfolgreich ließ sich ein kleiner 5`-Bereich (252 bp) mittels PCR vervielfältigen. Selbst dieser kleine Abschnitt ließ sich nicht mit befriedigender Spezifität amplifizieren. Die isolierten Fragmente wurden in pGemT-Easy kloniert und sequenziert. Für das Fragment 252 wurden die Primer 1Au3 (CypA1for, *Eco*RI) ACCGGCGAATTCACCTCGGCCGACGCCG und 1Au12 (CypA1rev, *Apa*LI) TAGGCGTGCACCGTCGTC verwendet, für das Fragment 513 die Primer 1Au9 (CypA1for, *Apa*LI) ACGACGGTGCACGCCTAC und 1Au7 (CypA1rev, *Bst*EII) GTGACGGGTGACCCCG. Über *Apa*LI hätten die beiden Fragmente in der späteren Klonierung wieder zusammengefügt werden können.



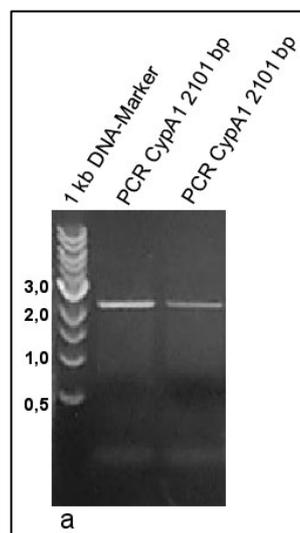
**Abb. 4.24: PCR CypA1 252 und 513**

In der zweiten und dritten Spur ist der PCR-Ansatz des Fragments 252 bp (50 µl) aufgetragen. Die massive Ausbildung von Sekundärstrukturen führt dazu, dass keine spezifischen Produkte amplifiziert werden konnten. In der dritten und vierten Spur Fragment 513 bp (50 µl). Auch hier sind unspezifische Banden zu erkennen.



**Abb. 4.25: PCR-Übersicht CypA1**

Die Abbildung gibt eine Übersicht über die PCR-Experimente. Es wurden verschiedene Primer miteinander kombiniert, um den Teil zu identifizieren, der für die schlechte Amplifikation des ersten Abschnitts verantwortlich ist. In Helltürkis sind die Fragmente 1066 und 1052 der Strategie I hervorgehoben. Strategie II (750, 334 und 1052) ist in türkis dargestellt. Ganz oben in dunkeltürkis ist das gesamte Fragment 2101 der Strategie III zu erkennen.

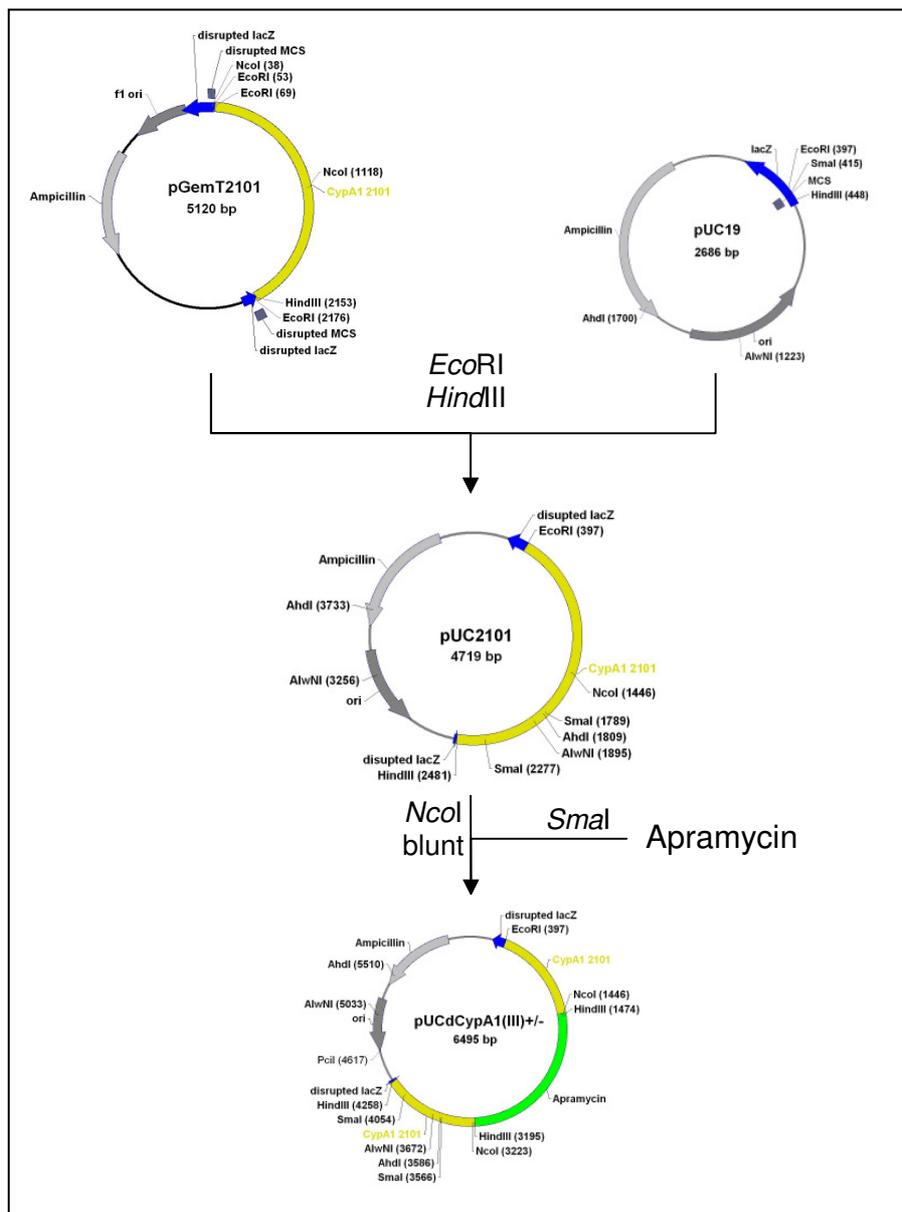


**Abb. 4.26: PCR CypA1 2101**

In der Abbildung ist die PCR des CypA1-Gens inklusive flankierender Bereiche dargestellt. Der optimale Annealingbereich befand sich hier bei 68 °C.

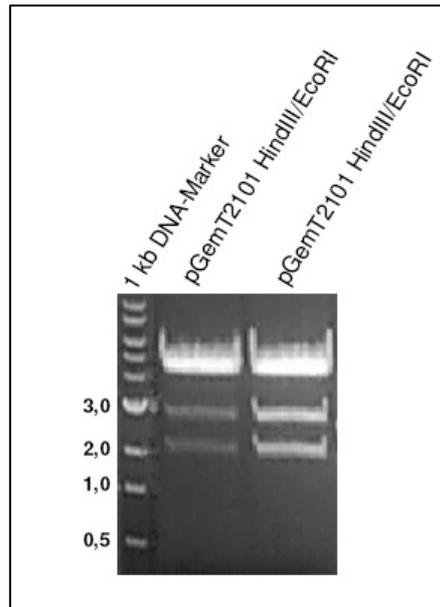
Im Zuge dieser Experimente wurde auch die Primerpaarung 1Au3 und 1Au6 gewählt. Trotz der Länge des Fragments von 2101 bp und der bekannten Schwierigkeiten bei der Amplifikation des ersten Abschnitts ergab die PCR ein positives Ergebnis. Das

Fragment 2101 wurde mit den Primern 1Au3 (CypA1for, *EcoRI*) ACCGGCGAA TTCACCTCGGCCGACGCCG und 1Au6 (CypA1rev, *HindIII*) CCACAGAAGCTTGCCGAGCAGGAACGGCG amplifiziert. Der Primer 1Au3 generiert wie oben beschrieben eine *EcoRI*-Schnittstelle (unterstrichen dargestellt). Es wurde darauf geachtet, mit möglichst geringen Basenveränderungen diese Schnittstelle einzufügen. Weiterhin wurden 6 Basen vor der einmutierten Schnittstelle mitsynthetisiert, um den späteren Restriktionschnitt mit *EcoRI* zu gewährleisten. Das gleiche Verfahren wurde beim Primer Au05 angewendet. Hier wurde die Schnittstelle *HindIII* generiert.



**Abb. 4.27: Klonierungsstrategie IV**

Die komplette Sequenz inklusive flankierender Bereiche wurde mittels PCR amplifiziert. Das Fragment 2101 wurde mit Hilfe der inklonierten Restriktionsschnittstellen in pUC19 kloniert. Danach erfolgte die Einklonierung der Apramycin-Resistenz. Es resultierte der Vektor pUCdCypA1(IV)+/-.



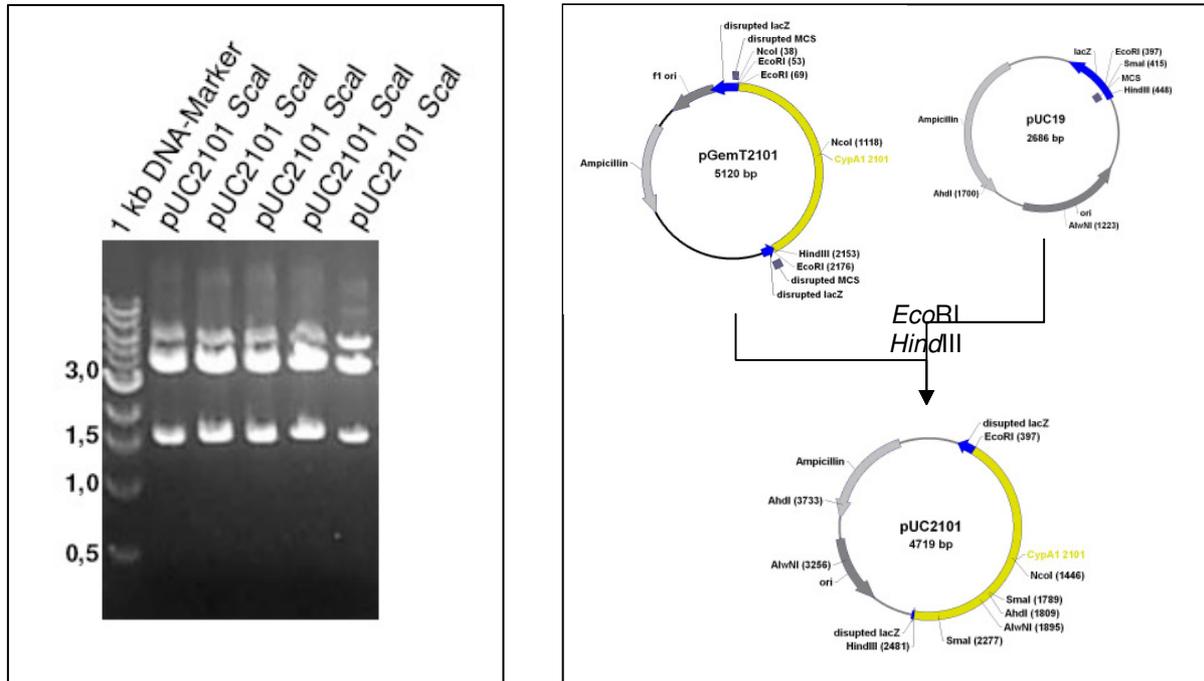
**Abb. 4.28: pGemT2101 mit *EcoRI* und *HindIII***

Zu erwarten waren die Bandengrößen 0,02 kb, 2,08 kb und 2,99 kb, die in den Spuren eins und zwei zu sehen sind. Zur weiteren Klonierung wurde das Fragment 2,08 kb aus dem Gel isoliert und mit dem *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen pUC19 zu pUC2101 ligiert.

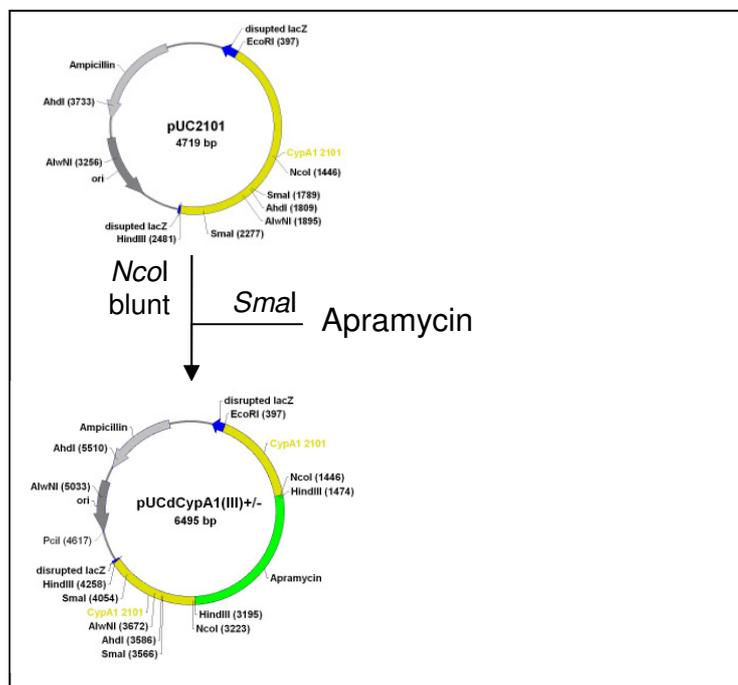
Nach Amplifikation, Isolierung und Aufreinigung des Fragments 2101 wurde ein A-Tailing durchgeführt, um die Ligation mit pGemT-Easy zu garantieren. Im Anschluss an die erneute Aufreinigung wurde das Fragment 2101 mit pGemT-Easy ligiert. Über Blau-Weiss-Selektion wurden positive Klone auf der Transformationsplatte ermittelt und in Über-Nacht Kulturen weiter angezogen. Nach Isolierung des Plasmids pGemT2101 und dessen Aufreinigung wurde zur Kontrolle eine Probe mit M13for- und M13rev-Primern sequenziert. Diese bestätigte das gewünschte Fragment erhalten zu haben.

Um den Schnitt mit *NcoI* und damit das gezielte Einfügen der Apramycin-Resistenz zu gewährleisten, musste das Fragment 2101 aus dem pGemT-Easy Vektor in pUC19 überführt werden. Hierzu wurde pGemT2101 mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten. Ebenfalls wurde der Vektor pUC19 mit genannten Restriktionsenzymen geschnitten. Der Ligationsansatz wurde dann zur Transformation in *E. coli* JM109 verwendet. Nach Selektion auf einer Plattenkultur unter Ampicillin wurden positive Klone in Über-Nacht-Kulturen angezogen. Das Plasmid pUC2101 wurde mittels Minipräparation isoliert und mit *NcoI* geschnitten. *NcoI* wurde als bestmögliche Schnittstelle für das Einklonieren der Apramycin-Resistenz ermittelt. Die *NcoI*-Erkennungsequenz befindet sich nur einmal im CypA1-Gen. Zum anderen befindet

sich ihre Position günstig in der Mitte, so dass im Endeffekt ca. 1000 bp an den Flanken zur homologen Rekombination zur Verfügung stehen.



**Abb. 4.29: Kontrollrestriktionsverdau von pUC2101 mit Scal (a), Klonierung von pUC2101 (b)**  
 In der zweiten bis fünften Spur in Abb. a ist der Restriktionsansatz von pUC2101 mit Scal aufgetragen. Es wurden Fragmente der Größe 1,43 kb und 3,29 kb erwartet, die in den Spuren zu sehen sind. Abb. b zeigt den Klonierungsschritt zum Vektor pUC2101.



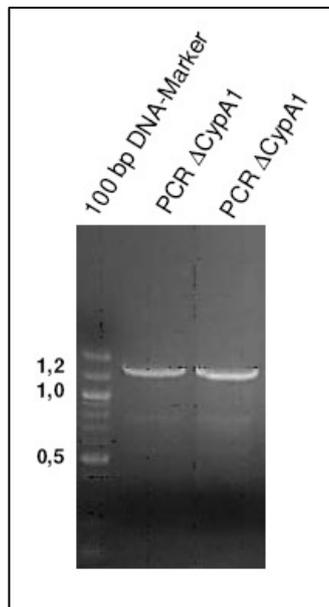
**Abb. 4.30: Klonierung von pUCdCypA1(IV)+/-**  
 Mittels SmaI und einer blunt ending unterzogenen NcoI-Schnittstelle wurde die Apramycin-Resistenzkassette in den Vektor pUC2101 einkloniert.

Das *NcoI*-geschnittene Plasmid pUC2101 wurde einem Blunt-Ending unterzogen, um mit dem *SmaI* geschnittenen Apramycin ligieren zu können. Der Ligationsansatz wurde in *E.coli* JM109 transformiert und unter Ampicillin-Selektion über Nacht inkubiert. Positive Klone wurden in Über-Nacht-Kulturen vermehrt und das Plasmid pUCdCypA1(IV)+/- nach Minipräparation erhalten. Um Informationen über die Orientierung der Apramycin-Resistenz zu bekommen, wurde eine Probe sequenziert. Es wurden folgende Primer zur Sequenzierung verwendet: Au2 (Apr+) CGA GAA GTT CGC GGA CG und Au3 (Apr-) AGA GCA GGC GCT TGA AG, als auch die Standardprimer M13for und M13rev.

Zur weiteren Klonierung wurde pUCdCypA1 zunächst mit *EcoRI* bei 37°C geschnitten. Nach einer Stunde und Zugabe von *TfiI* wurde die Inkubationstemperatur auf 65°C erhöht. Das Fragment von 4055 bp Größe wurde mittels Gelelektrophorese identifiziert und deren Ende einem mit Klenow-Fragment zu stumpfen Enden modifiziert. Die Vektoren pGM160del und pGM160 wurden mit *HindIII* geschnitten. Diese Schnittstelle wurde ebenfalls einem blunt-ending unterzogen. Die Restriktion mit *HindIII* von pGM160 ließ zwei Fragmente der Größe von 6,2 kb und 1,6 kb erwarten. Beim Vektor pGM160del war die 1,6 kb große DNA-Sequenz, die eine Gentamicinresistenz-Kassette enthielt, schon eliminiert. Daher zeigt sich auf dem Gelbild nur ein linearisierter Vektor der Größe 6,17 kb. Aus der Ligation von pGM (*HindIII*, blunt) und dCypA1 (*EcoRI*, *TfiI*, blunt) resultierte der Vektor pGMdCypA1.

pGMdCypA1 wurde nach Isolation in  $\text{dam}^-/\text{dcm}^-$ -*E.colis* JM 110 in *Streptomyces lividans* transformiert, um hier eine optimale Transformation zu gewährleisten. Die Transformation erfolgte nach Standardmethoden. Eine Selektion fand zunächst noch mit Thiostrepton statt. Auf der Transformationsplatte gewachsenen Klone wurden zunächst auf R2-Platten überimpft und nochmals bei 28°C inkubiert. Von diesen Platten wurden Flüssigkulturen zur Herstellung einer Sporensuspension angeimpft. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der Thiostrepton Selektion. Mit erhaltenen Sporen wurden dann Flüssigkulturen angeimpft, die für 10 Tage bei 40°C inkubiert wurden. Der Temperaturshift diente als Induktion der homologen Rekombination. Diese Temperatur erlaubt es nicht, dass sich der Vektor in *Streptomyces* repliziert. Bei Double-Crossover-Experimenten empfiehlt es sich mehrere Runden bei erhöhter Temperatur wachsen zu lassen. Daher wurde hier eine Wachstumszeit von 10 Tagen

angesetzt. Die Abwesenheit des Vektor selektierenden Antibiotikums, z.B. Thiostrepton, ermöglicht die Identifikation der Thiostrepton-Kolonien, bei denen ein Double-Crossover und damit eine vollständige homologe Rekombination des gewünschten Gens, stattgefunden hat. Wäre Thiostrepton in diesem Schritt vorhanden, würden die Klone nach homologer Rekombination nicht weiter wachsen, da dabei die Thiostreptonresistenz „verloren“ geht. Da bei einem Temperaturrückgang das Plasmid wiederum aus dem Chromosom heraus geschnitten werden kann, muss die Identifikation der Klone bei fortwährend 37° C erfolgen. Von positiven Klonen wurde genomische DNA isoliert. Hierzu wurden Klone auf Transformationsplatten angezogen und dann in Flüssigmedium überimpft. Nach 2-3 Tagen wurde die genomische DNA nach Standardmethoden isoliert. Die Inkubation wurde sowohl bei 28°C als auch bei 37°C durchgeführt, um zu gewährleisten, dass das Knockoutkonstrukt im Genom verblieb. Beide Ansätze zeigten jedoch im Endeffekt das gewünschte Ergebnis bei der Kontroll-PCR. Für die PCR wurde die genomische DNA mit SpeI geschnitten. SpeI schneidet nicht in der Knockout-Sequenz, so dass diese für die PCR erhalten bleibt. Positive Klone wurden mittels folgender Primer überprüft: 1AuHRfor (CypA1for) CGTCACAATGGTGCGATGAG und 1AuHRrev (CypA1rev) TGGACGACGAGCCGTTTCGAT.



**Abb. 4.31: Kontroll-PCR der genomischen DNA der Knockout-Mutante**

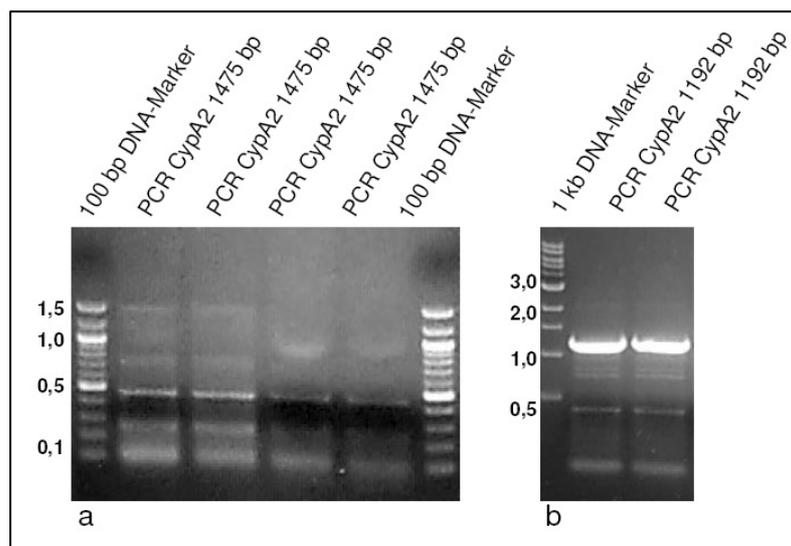
In der ersten und zweiten Spur wird das Ergebnis der PCR mit dem Primer 1AuHRfor und 1AuHRrev dargestellt. Das erwartete Fragment hat die Größe 1396 bp. Dies ist der Nachweis für eine erfolgreiche homologe Rekombination.

Die Kulturen zeigten im Vergleich zum Wildtyp kein verändertes Wachstumsverhalten. Es wird daher davon ausgegangen, dass die Funktion des ausgeschalteten CypA1 Gens entweder durch das noch intakte CypA2-Gen oder durch weitere noch nicht identifizierte PPlasen ersetzt wird.

#### 4.5.8 CYPA2 STRATEGIE I

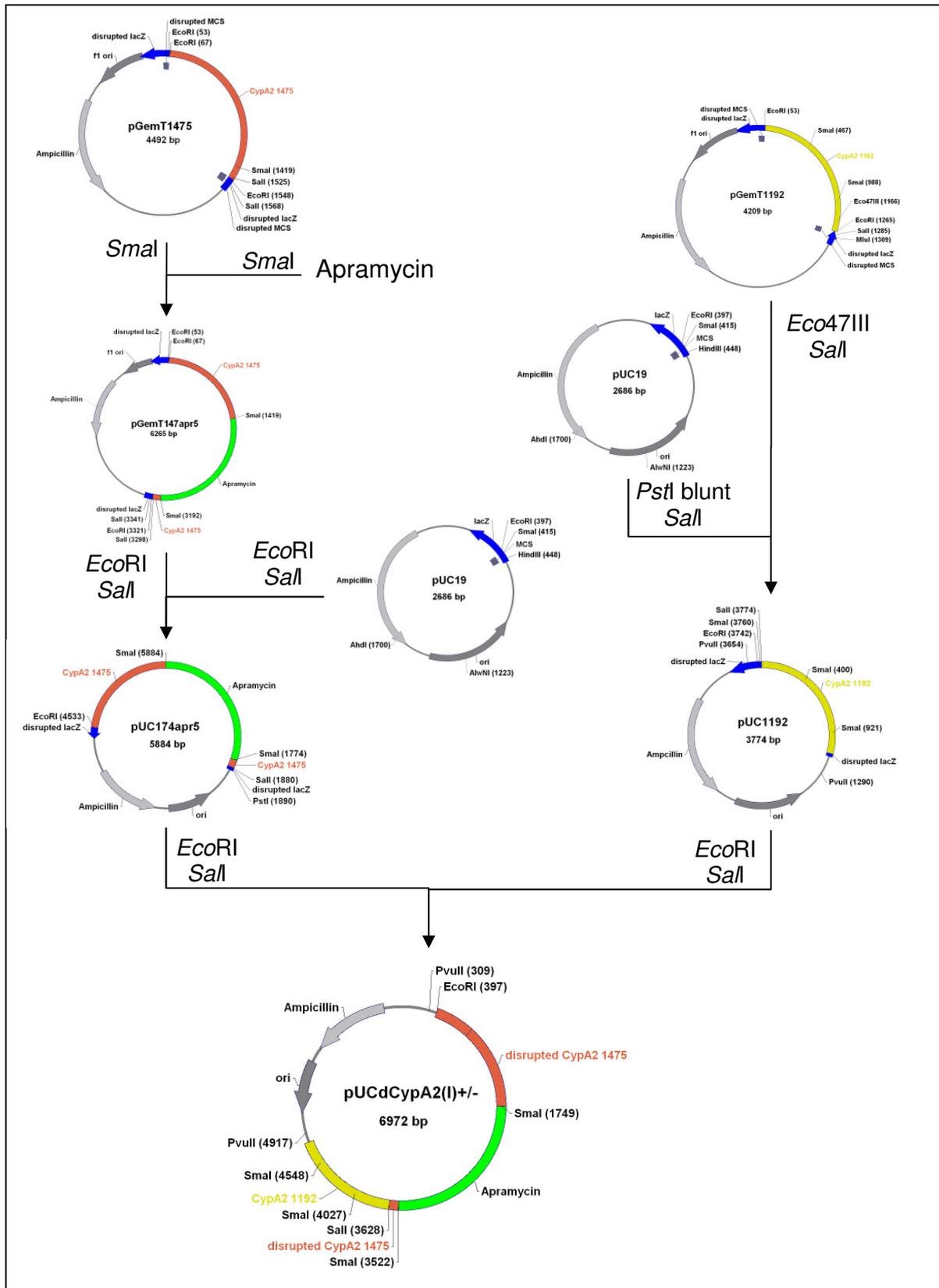
Analog zu CypA1 wurde auch für CypA2 eine Strategie zur Klonierung der Knockoutmutante entwickelt. Die Fragmente 1475 und 1192 wurden jeweils mittels PCR aus dem Genom isoliert und nach Aufreinigung in pGemT-Easy kloniert. Für das Fragment 1475 wurden folgende Primer verwendet: 2Au3 (CypA2for, *EcoRI*) CGAGCGGAATTCAGCGGGGCTCGTCGCC und 2Au4 (CypA2rev, *SalI*) GATGGTGTGACGACCTTCTG. Für Fragment 1192 wurden 2Au5 (CypA2for, *SalI*) AAGGTCGTCGACACCATCGC und 2Au6 (CypA2rev, *HindIII*) GACCTGAAGCTTCACTGGTCAGCGACAGGGGG in der PCR eingesetzt.

Mit den Primern 2Au3 und 2Au6 sollten die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII* generiert werden. 1475 und 1192 sollten über eine im Genom vorhandene *SalI*-Schnittstelle zusammengefügt werden. Das Fragment 1192 wurde wie Abb. 4.32 zeigt, in ausreichender Menge und spezifisch erhalten. Es stellte sich heraus, dass die durch den Primer eingeführte *HindIII*-Schnittstelle nicht mutiert worden war. Im flankierenden Bereich wurde eine passende Schnittstelle (*Eco47III*) gefunden, um 1192 über einen zusätzlichen Klonierungsschritt an die erste Teilsequenz anzufügen.



**Abb. 4.32: PCR des Cyclophilins A2 in Teilfragmenten**

In Abb. a erkennt man die erfolglose Amplifikation des Fragments 1475. Es wurden durch unspezifisches Annealing der Primer kleinere Fragmente amplifiziert. Gründe hierfür könnten der hohe



**Abb. 4.33: Klonierungsstrategie I**

Nach Kontrolle durch Sequenzierung sollte zunächst in das Fragmente 1475 die Apramycinresistenz-Kassette einkloniert werden. Im Folgenden sollten die Fragmente wieder zu pUCdCypA2(I) zusammengefügt werden.

GC-Gehalt und die Ausbildung von Sekundärstrukturen sein. Abb. b zeigt die erfolgreiche Amplifikation des Fragments 1192.

Fragment 1475 konnte nicht in ausreichender Menge erhalten werden. Die Amplifikation fiel trotz verschiedener Primer nicht spezifisch aus. Abb. 4.32 zeigt das Gelbild der PCR. Zu sehen sind unspezifisch amplifizierte, kleinere Fragmente. Es wurden zunächst Primer und Annealing-Temperatur variiert, später wurden verschiedene DNA-Polymerasen eingesetzt. Keine Variation der PCR führte zu einem besserem Ergebnis. Auch hier wird davon ausgegangen, dass der hohe GC-Gehalt von 69,7% und die Möglichkeit zur Ausbildung von Sekundärstrukturen der Grund für die erschwerte Amplifikation sind.

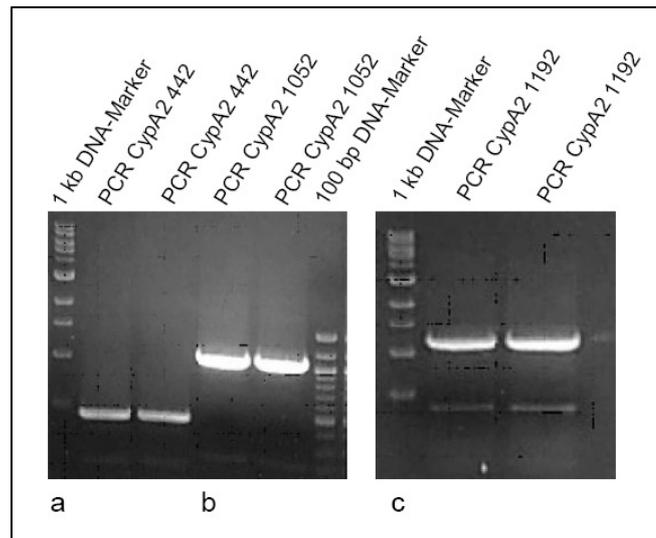
Daher wurde Strategie I verworfen und das Fragment 1475 in zwei kleinere Fragmente aufgeteilt, um die Amplifikation zu erleichtern.

#### 4.5.9 CYP A2 STRATEGIE II

Das Fragment 1475 wurde in zwei kleinere Fragmente 442 und 1052 zerlegt. Anhand der vorliegenden Sequenzhomologen *Streptomyces coelicolor*-Sequenz wurde nach einer passenden Einteilung gesucht. Die beiden Fragmente 442 und 1052 wurden so gewählt, dass sie in der späteren Klonierung über eine *Mlu*I-Schnittstelle wieder zusammengefügt werden konnten. Mit folgenden Primern gelang eine erfolgreiche Amplifikation:

442	2Au3	(CypA2for,	<i>Eco</i> RI)
CGAGCGGAATTCAGCGGGGCTCGTCGCC	und	2Au7	(CypA2rev, <i>Mlu</i> I)
GTCCGTACGCGTCTGGCC,	1052	2Au8	(CypA2for, <i>Mlu</i> I)
GGCCAGACGCGTACGG	AC	und	2Au4 (CypA2rev, <i>Sa</i> II)
GATGGTGTGACGACCTTCTG.			

Abb. 4.35 gibt einen Überblick über die erarbeitete Klonierungsstrategie. Nach Amplifikation und Identifizierung via Gelelektrophorese wurden die Fragmente einem A-Tailing und einer Aufreinigung unterzogen, bevor sie mit pGemT-Easy ligiert wurden. Nach Transformation in *E.coli* JM109 und Selektion unter Ampicillin und lacZ-Kontrolle wurden positive weiße Klone in Über-Nacht-Roller-Kulturen überimpft und inkubiert. Die aus diesen Kulturen isolierten Plasmide pGemT442, pGemT1052, pGemT1192 wurden zunächst einem Kontrollrestriktionsverdau unterzogen und dann sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die Kontrollrestriktionsverdauergebnisse.



**Abb. 4.34: PCR des Cyclophilins A2 in Teilfragmenten**

Auf der zweiten und dritten Spur ist das Amplifikationsprodukt von 442 (a) zu erkennen. In der vierten und fünften Spur wurde das Fragment 1052 (b) aufgetragen. Im zweiten Gelbild sind in der zweiten und dritten Spur die PCR-Produkte von 1192 aufgetragen.

Eine weitere Klonierung im pGemT-Easy-System war nicht möglich. Daher wurde pGemT442 mit *EcoRI* und *MluI* geschnitten, pGemT1052 mit *SalI* und *MluI*. Beide Fragmente wurden mit dem *EcoRI* und *SalI* geschnittenem pUC19 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E.coli* transformiert und unter Ampicillin selektiert. Der resultierende Vektor pUC442+1052 wurde mittels Kontrollrestriktionsverdau mit *EcoRI* und *SalI* überprüft und mit *SmaI* geschnitten, um die Apramycinresistenz einklonieren zu können. Die Schnittstelle befand sich bezogen auf die gesamte Cyp-Sequenz nahezu mittig, so dass genügend flankierende Bereiche für die homologe Rekombination zur Verfügung standen. Aus dieser Ligation resultierte der Vektor pUC442+105apr2.

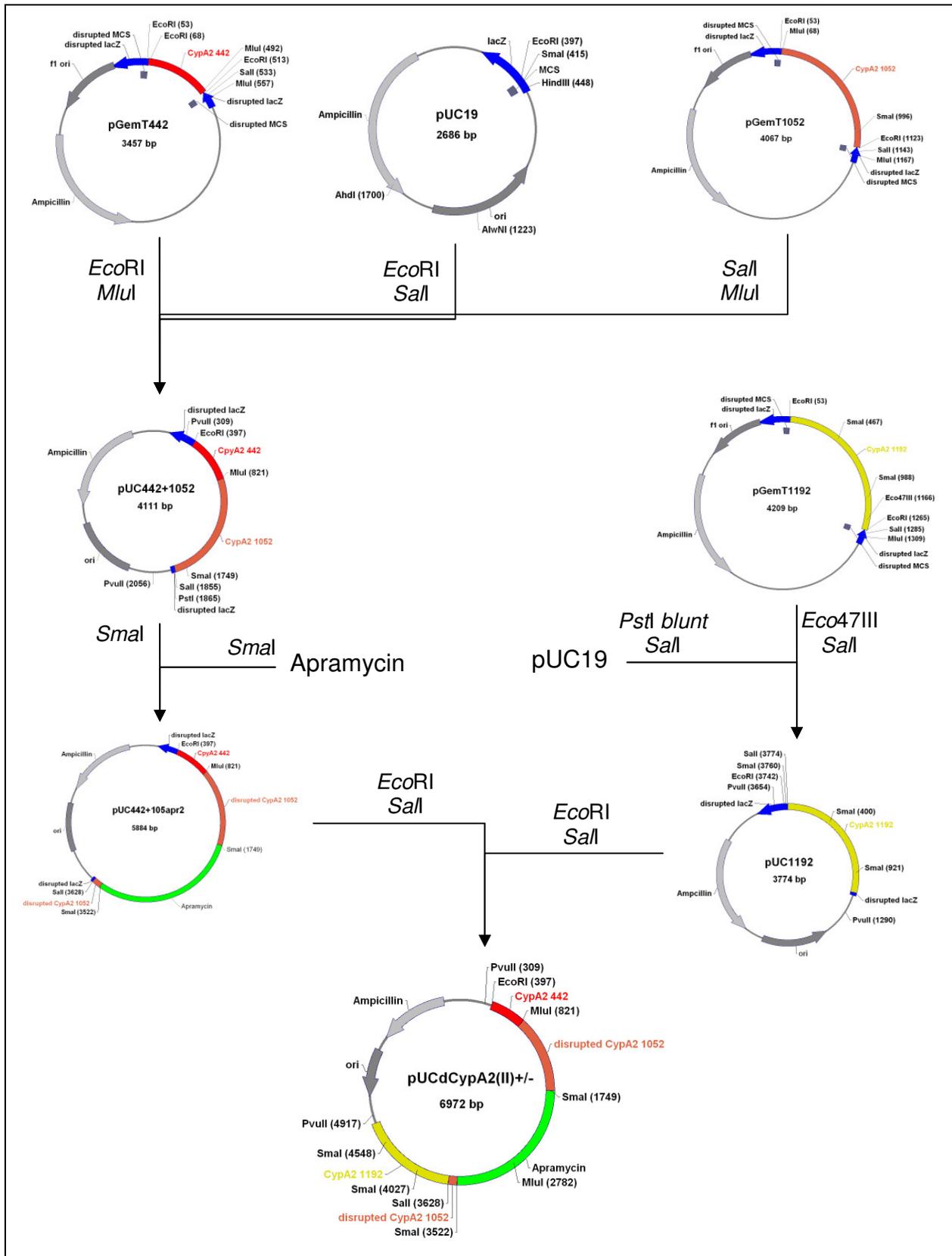
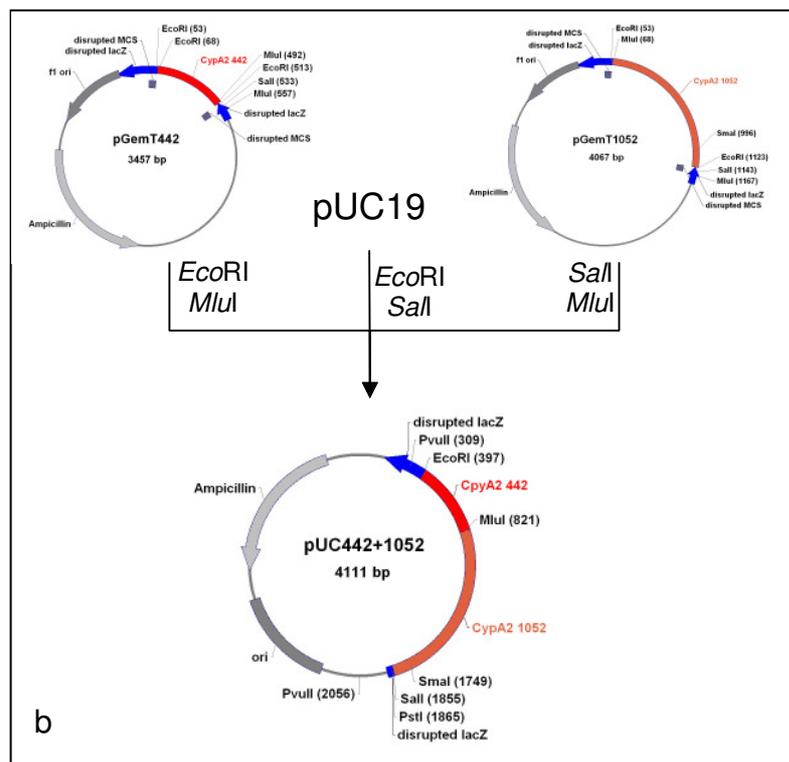
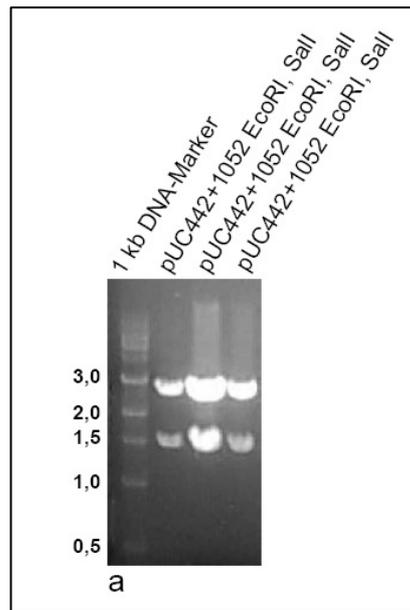


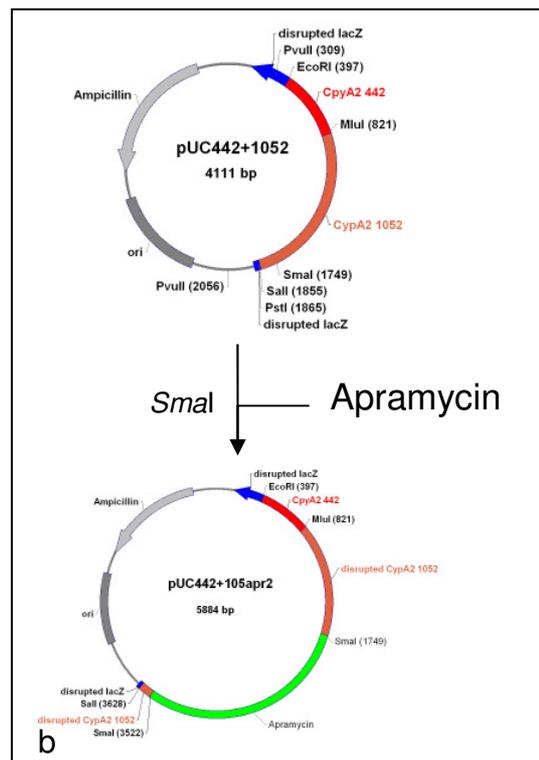
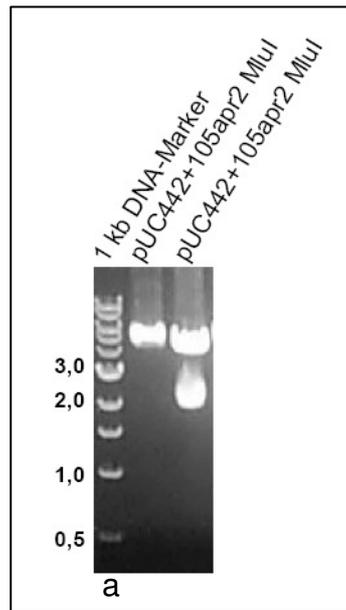
Abb. 4.35: Überblick Klonierungsstrategie II

Das Fragment 1475 wurde in die Teilfragmente 442 und 1052 aufgeteilt und getrennt amplifiziert. Nach Klonierung in pGemT-Easy und Sequenzierung wurden die Teile wieder zusammengefügt. In die Mitte des Gens wurde eine Apramycinresistenz-Kassette eingefügt. Der resultierende Vektor pUCdCypA2(II) wurde dann in pGM160 überführt und in *Streptomyces* transformiert.



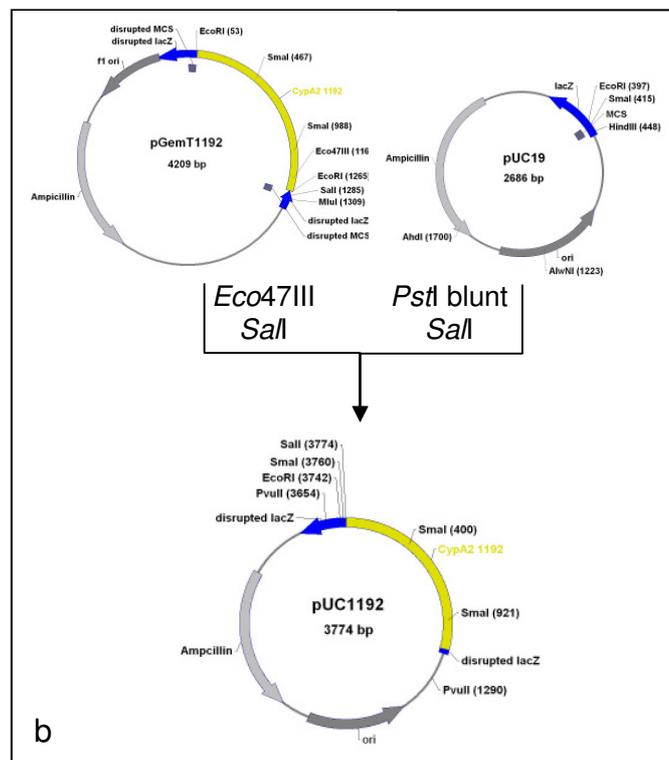
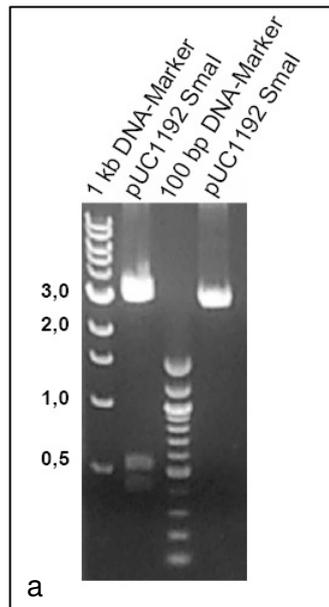
**Abb. 4.36: Kontrollrestriktionsverdau von pUC442+1052 mit *EcoRI* und *SalI* (a), Klonierung von pUC442+1052 (b)**

Der Vektor pUC442+1052 wurde zur Kontrolle mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten. Aus diesem Schnitt sollten die Fragmente mit der Größe von 1,5 kb und 2,7 kb resultieren. Auf dem Gelbild lassen sich diese Fragmente eindeutig den erwarteten Größen zuordnen. Abb. b zeigt den Klonierungsschritt im Detail.



**Abb. 4.37: Kontrollrestriktionsverdau von pUC442+105apr2 mit MluI (a), Klonierung von pUC442+105apr2 (b)**

Im nachfolgenden Schritt wurde die Apramycinresistenz-Kassette über eine *SmaI*-Schnittstelle mittig in das CypA2-Gen einkloniert. Es resultierte der Vektor pUC442+105apr2, der in Abb. a zur Kontrolle mit MluI geschnitten wurde. Es wurden Fragmente von der Größe von 1,9 kb und 3,9 kb erwartet. Auf der zweiten Spur sieht man das erwartete Ergebnis. Die erste Spur zeigt ein negatives Ligationereignis. Hier wurde der Vektor durch MluI linearisiert. Die zweite MluI-Schnittstelle wurde durch das Insert Apramycin erst eingeführt.



**Abb. 4.38: Kontrollrestriktionsverdau von pUC1192 mit *SmaI* (a), Klonierung von pUC1192 (b)**  
 Der Vektor pUC1192 wurde zur Kontrolle mit *SmaI* geschnitten. Diese Schnitte sollten folgende Fragmente auf dem Gel zur Folge haben: 2,8 kb, 0,5 kb und 0,4 kb. Die erwarteten Fragmente sind in der zweiten Spur der Abb. a zu sehen. Abb. b zeigt den Klonierungsschritt im Detail.

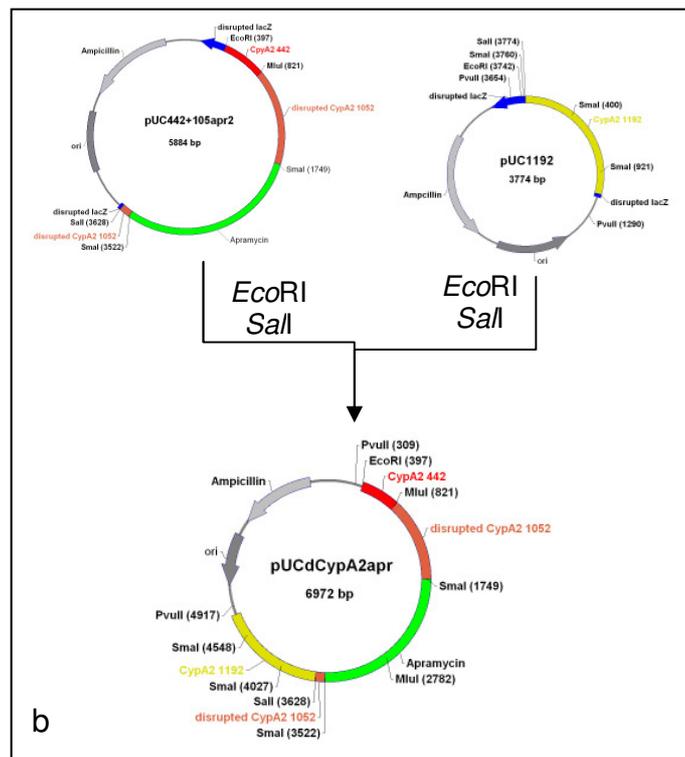
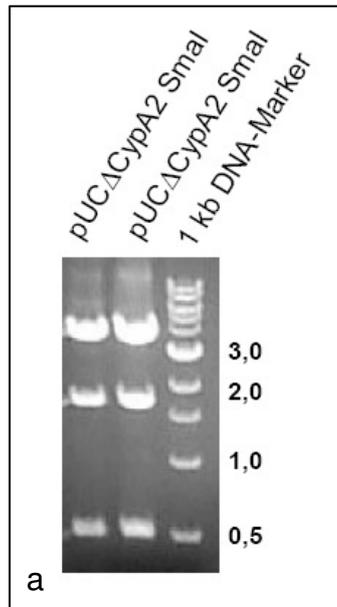
Wie oben beschrieben, konnte bei der Amplifikation des dritten Fragments 1192 nicht die gewünschte *HindIII*-Schnittstelle generiert werden. Daher musste das Fragment nach Ligation mit pGemT-Easy zu pGemT1192 ebenfalls zunächst in pUC19 transferiert werden. Hierzu wurde pGemT1192 mit *Eco47III* und *SalI* geschnitten. Der pUC19-Vektor wurde zunächst mit *PstI* geschnitten. Die *PstI*-Schnittstelle wurde

dann einem blunt-ending unterzogen. Im zweiten Schritt wurde mit *SalI* geschnitten. Die Fragmente 1192 (*Eco47III/SalI*) und pUC19 (*PstI* blunt/*SalI*) wurden ligiert und nach Standardmethoden transformiert und selektiert. Es resultierte der Vektor pUC1192.

In der finalen Ligation zum vollständigen Knockout-Konstrukt wurde pUC442+105apr2 und pUC1192 jeweils mit *SalI* und *EcoRI* geschnitten. Aus der Ligation beider Teile resultierte das im pUC19 befindlich Knockout-Konstrukt pUCdCypA2apr.

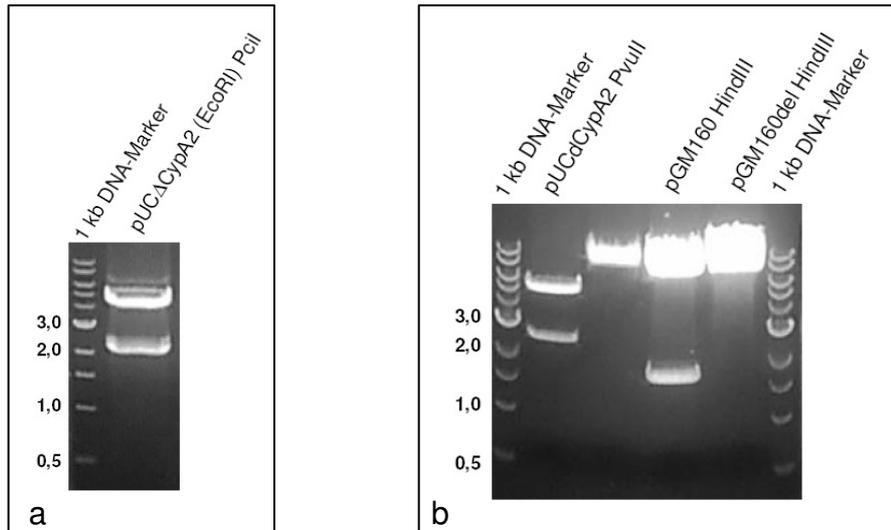
Zunächst wurde der Vektor pUCdCypA2 mit *PvuII* geschnitten. Eine Ligation mit *PvuII* geschnittenem dCypA2-Fragment mit dem entsprechend vorbereitenden pGM160 waren jedoch erfolglos.

pUCdCypA2apr wurde sequentiell zunächst mit *EcoRI* dann mit *PciI* geschnitten. Die Schnittstelle *EcoRI* wurde folgend einem blunt-ending unterzogen, so dass an beiden Seiten glatte Enden generiert wurden. Die Vektoren pGM160del und pGM160 wurden mit *HindIII* geschnitten. Diese Schnittstelle wurde ebenfalls einem blunt-ending unterzogen. Die Restriktion mit *HindIII* von pGM160 ließ zwei Fragmente der Größe von 6,2 kb und 1,6 kb erwarten. Beim Vektor pGM160del war die 1,6 kb große DNA-Sequenz, die eine Gentamicinresistenz-Kassete enthielt, schon eliminiert. Daher zeigt sich auf dem Gelbild nur ein linearisierter Vektor der Größe 6,17 kb. Aus der Ligation resultierte der Vektor pGMdCypA2apr. Da die Klonierung bis dahin in *dam*<sup>+</sup>/*dcm*<sup>+</sup>-Zellen stattgefunden hatte, musste der Vektor in *dam*<sup>-</sup>/*dcm*<sup>-</sup>-*E. coli* JM110 übertragen werden, um eine optimale Transformation in *Streptomyces lividans* zu gewährleisten. Der Vektor pGMdCypA2 wurde mit *PstI* einem Kontrollrestriktionsverdau unterzogen. Es wurden Fragmente von 8,75 kb, 1,21 Kb und 1 kb erwartet, die in der ersten Spur der Abb. 4.41 zu sehen sind.



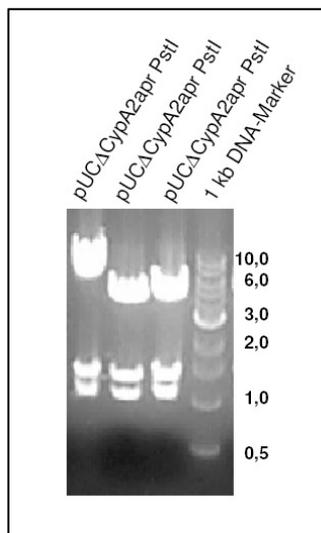
**Abb. 4.39: Kontrollrestriktionsverdau von pUCdCypA2apr mit *SmaI* (a), Klonierung von pUCdCypA2apr (b)**

Der Vektor pUCdCypA2apr wurde zur Kontrolle mit *SmaI* geschnitten. Erwartet wurden die Fragmente der Größe 4,2 kb, 1,8 kb, 0,52 kb und 0,51 kb. In der ersten und zweiten Spur der Abb. a sind diese Fragmente im Vergleich zum Größenmarker in der dritten Spur zu erkennen. Abb. b zeigt den Klonierungsschritt im Detail.



**Abb. 4.40: Restriktion von pUCdCypA2 mit *EcoRI* und *PciI* (a), Restriktion von pGM160**

Abb. a zeigt die Restriktion des pUCdCypA2 *EcoRI* geschnittenen Vektors mit *PciI*. Die erwarteten Fragmente besitzen die Größe von 4,7 kb und 2,2 kb. Abb. b zeigt die Restriktion von pGM160 bzw. pGM160del mit *HindIII*. In der zweiten Spur ist der mit *PvuII* geschnittene Vektor pUCdCypA2 zu erkennen. Zu sehen sind die Fragmente der Größe 4,6 kb und 2,3 kb.

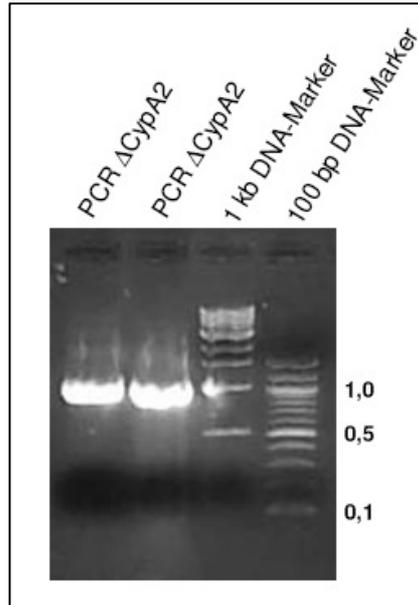


**Abb. 4.41: Kontrollrestriktionsverdau von pGMdCypA2 mit *PstI***

In der ersten Spur sind die erwarteten Fragmente von pGMdCypA2 nach Restriktion mit *PstI* zu erkennen. In der zweiten und dritten Spur hingegen sieht man negative Klone, die das Insert nicht enthalten und daher Fragmente von 5,66 kb, 1,21 kb und 1 kb erkennen lassen.

pGMdCypA2 wurde nach Isolation in  $\text{dam}^-/\text{dcm}^-$ -*E.colis* JM 110 in *Streptomyces lividans* transformiert. Die Transformation erfolgte nach Standardmethoden. Eine Selektion fand zunächst noch mit Thiostrepton statt. Auf der Transformationsplatte gewachsenen Klone wurden zunächst auf R2-Platten überimpft und nochmals bei 28 °C inkubiert. Von diesen Platten wurden Flüssigkulturen zur Herstellung einer Sporensuspension angeimpft. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der Thiostrepton

Selektion. Mit erhaltenen Sporen wurden dann Flüssigkulturen angeimpft, die für 10 Tage bei 40 °C inkubiert worden. Der Temperaturshift diente als Induktion der homologen Rekombination. Diese Temperatur erlaubt es nicht, dass sich der Vektor in *Streptomyces* repliziert. Bei Double-Crossover-Experimenten empfiehlt es sich, mehrere Wachstumszyklen bei erhöhter Temperatur wachsen zu lassen. Daher wurde hier eine Wachstumszeit von 10 Tagen angesetzt. Die Abwesenheit des Vektor-selektierenden Antibiotikums, z.B. Thiostrepton, ermöglicht die Identifikation der Thiostrepton-Kolonien, bei denen ein Double-Crossover und damit eine vollständige homologe Rekombination des gewünschten Gens stattgefunden hat. Wäre Thiostrepton in diesem Schritt vorhanden, würden die Klone nach homologer Rekombination nicht weiter wachsen, da dabei die Thiostreptonresistenz „verloren“ geht. Da bei einem Temperaturrückgang das Plasmid wiederum aus dem Chromosom heraus geschnitten werden kann, muss die Identifikation der Klone bei fortwährend 37 °C erfolgen. Von positiven Klonen wurde schließlich genomische DNA isoliert. Hierzu wurden Klone auf Transformationsplatten angezogen und dann in Flüssigmedium überimpft. Nach 2-3 Tagen wurde die genomische DNA nach Standardmethoden isoliert. Die Inkubation wurde sowohl bei 28 °C als auch bei 37 °C durchgeführt, um zu gewährleisten, dass das Knockoutkonstrukt im Genom verblieb. Beide Ansätze zeigten jedoch am Ende das gewünschte Ergebnis bei der Kontroll-PCR. Für die PCR wurde die genomische DNA mit SpeI geschnitten. SpeI schneidet nicht in der Knockout-Sequenz, so dass diese für die PCR erhalten bleibt. Positive Klone wurde mittels folgender Primer überprüft: 2AuHRfor AGCCAAGGTGACATCGAGGT und 2AuHRrev GCGCCAGAATGTGTCAGAGA. Die Primer wurden so gewählt, dass der forward-Primer 2AuHRfor seine Annealing-Position in der CypA2-Sequenz findet und 2AuHRrev im Bereich der Apramycinresistenz bindet. Das Ergebnis der PCR lies ein 1066 bp großes Fragment erwarten. Hiermit konnte eine erfolgreiche homologe Rekombination nachgewiesen werden.



**Abb. 4.42: Kontroll-PCR der genomischen DNA der Knockout-Mutante**

In der ersten und zweiten Spur wird das Ergebnis der PCR mit dem Primer 2AuHRfor und 2AuHRrev dargestellt. Das erwartete Fragment hat die Größe 1066 bp. Dies ist der Nachweis für eine erfolgreiche homologe Rekombination.

Die Kulturen zeigten im Vergleich zum Wildtyp kein verändertes Wachstumsverhalten. Es wird daher davon ausgegangen, dass die Funktion des ausgeschalteten CypA2 Gens entweder durch das noch intakte CypA1-Gen oder durch weitere noch nicht identifizierte PPlasen übernommen wird.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

### 5.1 ALLGEMEIN

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Knockout-Mutanten für die Cyclophiline CypA1 und CypA2 hergestellt. Für die Konstruktion wurde nicht nur das eigentliche Gen verwendet, sondern auch umliegende Bereiche. Im Endeffekt standen der homologen Rekombination an beiden Seiten des Knockout-Konstrukts ca. 1000 bp zur Verfügung.

Zunächst wurden die DNA-Abschnitte der Cyclophiline aus der genomischen DNA von *Streptomyces lividans* mittels PCR isoliert. Aufgrund des hohen GC-Gehalts wurde die Amplifikation in Fragmenten durchgeführt. Es wurden verschiedene PCR-Bedingungen getestet und für jedes Fragment optimale Bedingungen ermittelt.

Nach Aufreinigung und A-Tailing folgte eine Ligation mit pGemT-Easy. Die erhaltenen Fragmente wurden sequenziert und anschließend über mehrere Klonierungsschritte in *E. coli* wieder zusammengefügt. Dabei wurde eine Apramycinresistenz-Kassette so in das Gen eingebaut, dass die eigentliche Information für das Cyclophilin-Gen zerstört wurde. Das daraus resultierende Knockout-Konstrukt wurde in den temperatursensitiven pGM160, einem *E.coli*-*Streptomyces*-Shuttle Vektor, kloniert und in *Streptomyces lividans* transformiert. Nach einem Temperaturshift integrierte der temperatursensitive Vektor über homologe Rekombination in das Genom. Die DNA der potenziellen Mutanten wurde auf den zielgerichteten Einbau des Knockout-Konstrukts im gewünschten Cyclophilin-Gen untersucht. Mittels PCR konnten entsprechende Amplifikate hergestellt werden, die den Nachweis für die erfolgreiche homologe Rekombination lieferten.

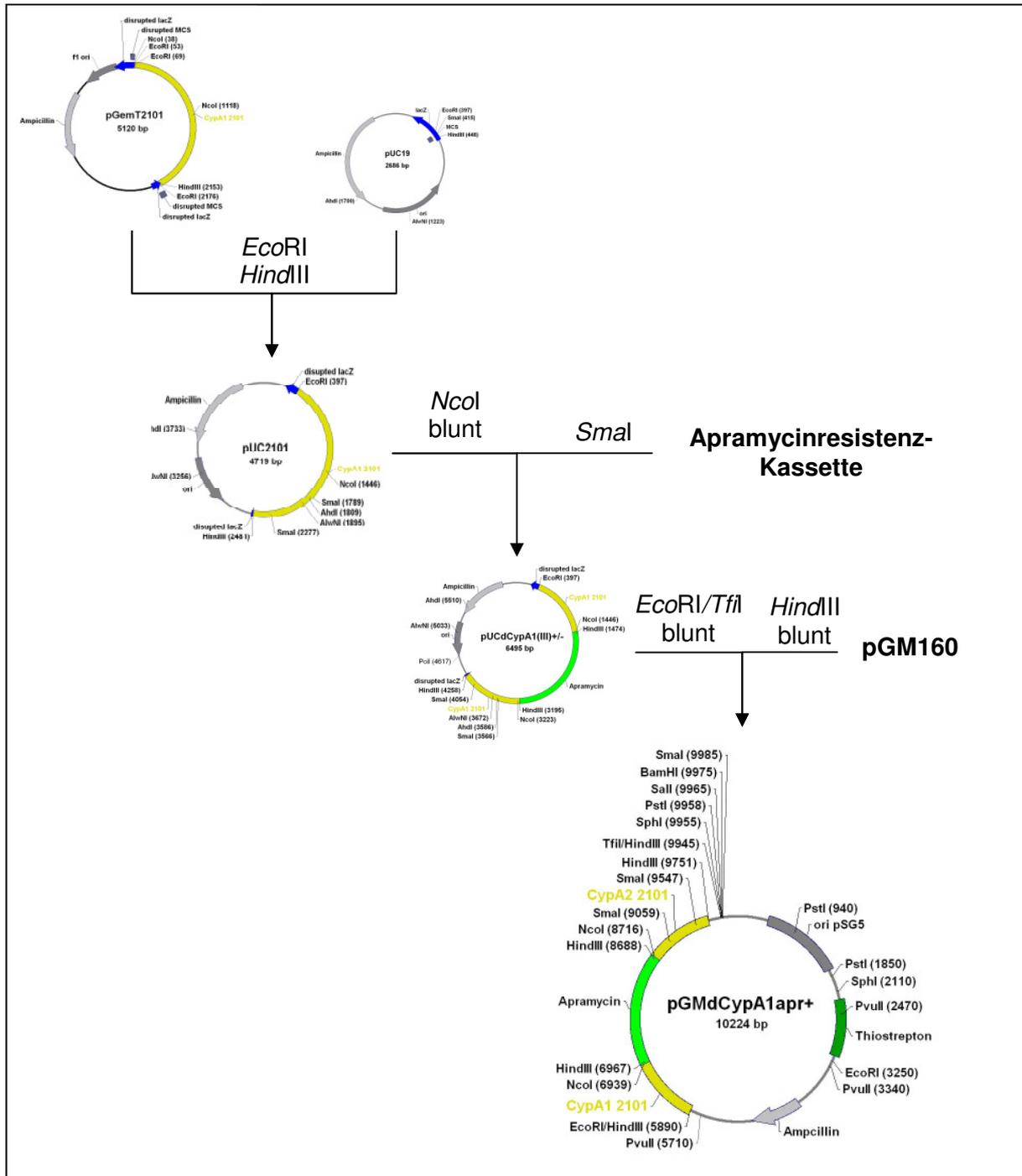
### 5.2 CYCLOPHILIN A1

Für die Isolation mittels PCR wurden verschiedene Strategien entwickelt und getestet. Im Ergebnis konnte CypA1 als komplette Sequenz (Fragment 2101 bp) erfolgreich erhalten werden.

Nach Ligation mit pGemT-Easy zu pGemT2101 wurde das Fragment sequenziert. pGemT2101 wurde mit *EcoRI/HindIII* geschnitten und in pUC19 kloniert. Zum Einfügen der Apramycinresistenz-Kassette wurde der daraus resultierende Vektor pUC2101 mit *NcoI* geschnitten. Die Schnittstelle wurde einem blunt-ending unterzogen und mit der *SmaI*-geschnittenem Apramycinresistenz-Kassette in einer Ligation eingesetzt. Aus diesem Klonierungsschritt ging der Vektor pUC $\Delta$ CypA1(III) hervor.

Das Knockout-Konstrukt  $\Delta$ CypA1(III) wurde mit *EcoRI* blunt/*TfiI* blunt geschnitten und mit pGM160 (*HindIII* blunt) ligiert. Es resultierte der Knockout-Konstrukt-Vektor pGM $\Delta$ CypA1. Zur besseren Transformations-effizienz in Streptomyceten wurde der Vektor zunächst in *dcm*<sup>-</sup>/*dam*<sup>-</sup> *E.coli* JM110 übertragen.

Der Vektor pGM $\Delta$ CypA1 wurde mittels Transformation in *Streptomyces lividans* eingebracht. Zunächst wurden mittels Thiostrepton Klone selektiert. Positive Klone wurden dann einem Temperaturshift unterzogen, der zur homologen Rekombination führte. Diese Klone waren Thiostrepton sensibel und Apramycin resistent. Die DNA der potenziellen Mutanten wurde auf den zielgerichteten Einbau des Knockout-Konstrukts im Cyclophilin A1-Gen untersucht. Mittels PCR konnten entsprechende Amplifikate hergestellt werden, die den Nachweis für die erfolgreiche homologe Rekombination lieferten.



**Abb. 5.1: Strategie zur Herstellung des Knockout-Konstrukts pGMΔCypA1**

Der Vektor pGMΔCypA1apr+ entspricht dem Vektor pGMΔCypA1. Das „+“ steht für die Orientierung des inklonierten Fragments ΔCypA1 in pGM160.

### 5.3 CYCLOPHILIN A2

Wie bei CypA1 wurden verschiedene Strategien entworfen und getestet, um CypA2 zu erhalten. Das Cyclophilin A2 konnte in Abschnitten (Fragmente 442 bp, 1052 bp und 1192 bp) mittels PCR isoliert werden. Nach Aufreinigung und A-Tailing wurden die Fragmente mit pGemT-Easy ligiert und es resultierten die Vektoren pGemT442, pGemT1052 und pGemT1192.

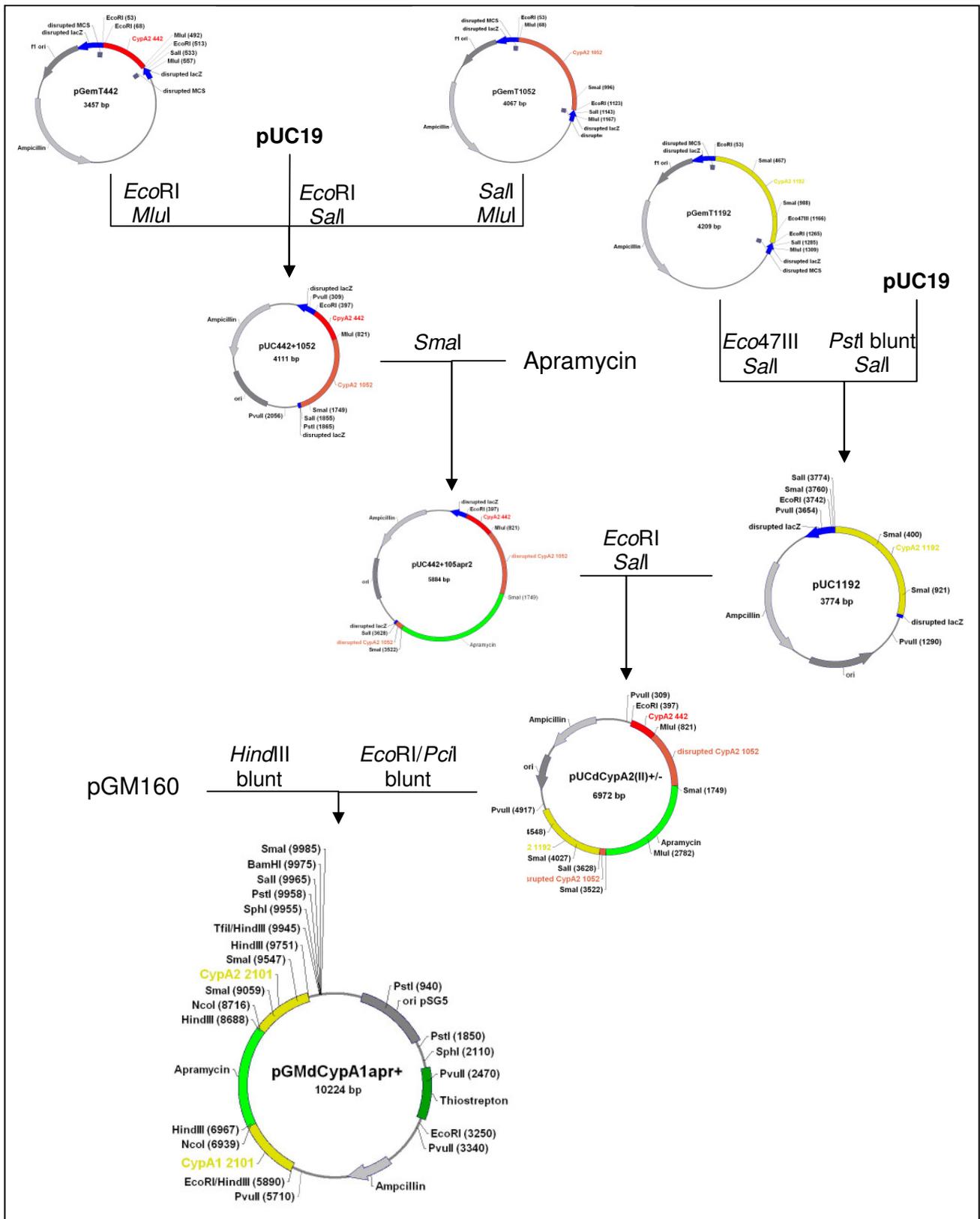
pGemT442 wurde mit *EcoRI* und *MluI*, pGemT1052 mit *MluI* und *SalI* geschnitten. Die restringierten Fragmente wurden in einer Ligation mit dem *EcoRI/SalI* geschnittenen Vektor pUC19 eingesetzt. Der daraus resultierende Vektor pUC442+1052 wurde mit *SmaI* geschnitten und mit der ebenfalls *SmaI* restringierten Apramycinresistenz-Kassette ligiert.

Aus dieser Ligation entstand der Vektor pUC442+105apr2. Um schließlich das Fragment 1192 anzufügen, wurde pGemT1192 mit *Eco47III* und *SalI* geschnitten. Das restringierte Fragment 1192 wurde mit dem *PstI* blunt/*SalI* geschnittenen Vektor pUC19 zu pUC1192 ligiert. Zur Klonierung von pUC $\Delta$ CypA2(II) wurden pUC442+105apr2 und pUC1192 mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten und die Fragmente ligiert.

Das Knockout-Konstrukt  $\Delta$ CypA2(II) wurde mit *EcoRI* blunt/*PciI* blunt geschnitten und mit pGM160 (*HindIII* blunt) ligiert. Es resultierte der Knockout-Konstrukt-Vektor pGM $\Delta$ CypA2. Zur besseren Transformationseffizienz in Streptomyceten wurde der Vektor zunächst in dcm<sup>-</sup>/dam<sup>-</sup> *E.coli* JM110 übertragen. Der Vektor pGM $\Delta$ CypA2 wurde mittels Transformation in *Streptomyces lividans* eingebracht. Zunächst wurden mittels Thiostrepton Klone selektiert, die den Vektor enthielten. Positive Klone wurden dann einem Temperaturshift unterzogen, der zur homologen Rekombination führte. Diese Klone waren Thiostrepton sensibel und Apramycin resistent. Die DNA der potenziellen Mutanten wurde auf den zielgerichteten Einbau des Knockout-Konstrukts im Cyclophilin A1-Gen untersucht. Mittels PCR konnten entsprechende Amplifikate hergestellt werden, die den Nachweis für die erfolgreiche homologe Rekombination lieferten. Beide Knockout-Mutanten zeigten im Gegensatz zum Wildtyp keinen veränderten Phänotyp. Eine mögliche Interpretation ist die funktionelle gegenseitige Komplementation beider Cyclophiline oder anderer Enzyme.

Zur weiteren Aufklärung der Katalyse der *cis/trans* Isomerisation in *Streptomyces lividans* wäre die Herstellung einer Doppel-Knockout-Mutante  $\Delta\text{CypA1}/\Delta\text{CypA2}$  interessant, um zu klären, inwieweit die oben postulierte funktionelle gegenseitige Komplementation beider Cyclophiline vorliegt.

Der physiologische Zustand des Zellstoffwechsels kann durch extreme Umweltbedingungen wie Nährstoffdefizienz oder Hitzeschock in radikaler Weise verändert werden. Bei diesen Prozessen können Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen beteiligt sein, indem sie durch Isomerisation der Prolyl-Bindung ein Enzym modulieren oder bei der Expression von neuen Proteinen im Rahmen der Proteinfaltung mitwirken. Experimente unter veränderten Wachstumsbedingungen wie z.B. Nährstoffdefizienz oder Hitzeschock können Aufschluss darüber geben, ob in diesem Fall Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen an der Modulation von Enzymen beteiligt sind.



**Abb.5.2: Strategie zur Herstellung des Knockout-Konstrukts pGMΔCypA2**

Der Vektor pGMΔCypA2apr+ entspricht dem Vektor pGMΔCypA2. Das „+“ steht für die Orientierung des inklonierten Fragments ΔCypA2 in pGM160.

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

ALLISON, A. C., EUGUI, E. M.; Preferential suppression of lymphocyte proliferation by mycophenolic acid and predicted long-term effects of mycophenolate mofetil in transplantation, **1994** *Transplant Proc.*, 26, 3205-3210.

ANDERSON A.S., WELLINGTON E. M.; The taxonomy of *Streptomyces* and related genera, **2001** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51(Pt 3), 797-814

ANNE, J., VAN MELLAERT, L.; *Streptomyces lividans* as host of heterologous protein production, **1993** *FEMS Microbiol. Lett.*, 114, 121-128

Alvarez, M. A., Chater, K. F., Rodicio, M. R.; Complex transcription of an operon encoding the Sall restriction- modification system of *Streptomyces albus* G.; **1993** *Mol. Microbiol.*, 8(2), 243-52

Alvarez, A.J., Buttner, M.P., Toranzos, G.A., Dvorsky, E.A., Toro, A., Heikes, T.B.; Use of solid-phase PCR for enhanced detection of airborne microorganisms, **1994** *Appl. Env. Microbiol.*, 60, 374-376

ALVAREZ, A. J., BUTTNER, M. P., STETZENBACH, L. D.; PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference, **1995** *Appl. Env. Microbiol.*, 61, 3639-3544

ARETZ, W., KOLLER, K. P., RIEß, G.; Proteolytic enzymes from recombinant *Streptomyces lividans*, **1989** *FEMS Microbiol. Lett.*, 65, 31-36

AUMÜLLER, T., FISCHER G.; Regulation of peptide bond *cis/trans* isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes; **2003** *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol*, 148, 105-150

BÄCHINGER H. P., The Influence of Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase on the *in vitro* Folging of Type III Collagen, **1987** *J. Biol. Chem.*, 262, 35, 17144-17148

BALBACH, J., STEEGHORN, C., SCHINDLER, TH., SCHMID F. X.; A Protein Folding Intermediate of Ribonuclease T1 Characterized at High Resolution 1D and 2D Real-Time NMR Spectroscopy, **1999** *J. Mol. Biol.*, 285, 829-842

BALTZ, R. H.; Gene expression using Streptomyces, **1990** *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1, 12-20

BALTZ, R. H.; Genetic manipulation of antibiotic-producing Streptomyces, **1999** *Trends Microbiol.*, 6, 76-83

BAO, K., HU, Z., ZHOU, X., ZHOU, Q., DENG, Z.; A bifunctional cosmid vector for the mobilized conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* sp., **1997** *Pro. Nat. Sci.*, 7, 5

BEHRENS, S., MAIER, R., DE COCK, H., SCHMID F. X., GROSS, C. A.; The SurA periplasmic PPLase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity, **2001** *EMBO J.*, 20, 1&2, 285-294

BENTLEY, S. D., CHATER, K. F., CERDENO-TARRAGA, A. M., CHALLIS, G. L., THOMSON, N. R., JAMES, K. D., HARRIS, D. E., QUAIL, M. A., KIESER, H., HARPER, D., BATEMAN, A., BROWN, S., CHANDRA, G., CHEN, C. W., COLLINS, M., CRONIN, A., FRASER, A., GOBLE, A., HIGALGO, J., HORNSPY, T., HOWARTH, S., HUANG, C. H., KIESER, T., LARKE, L., MURPHY, L., OLIVER, K., O'NEIL, S., RABBINOWICH, E., RAJANDREAM, M. A., RUTHERFORD, K., RUTTER, S., SEEGER, K., SAUNDERS, D., SHARP, S., SQUARES, R., SQUARES, S., TAYLOR, K., WARREN, T., WIETZORREK, A., WOODWARD, J., BARRELL, B. G., PARKHILL, J., HOPWOOD, D. A.; Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2), **2002** *Nature*, 417, 141-147

BERGER, R., SCHAUWECKER, F., KELLER U.; Transcriptional analysis of the cylophilin A gene (*cypA*) of *Streptomyces chrysomallus*; **1999** *FEMS Microbiol. Letters*, 178, 39-45

BERGER, R., HOFFMANN, M., KELLER, U.; Molecular analysis of a gene encoding a cell-bound esterase from *Streptomyces chrysomallus*, **1998** *J. Bacteriol.*, 180, 6396-6399

BIBB, M., J., FINDLAY, P. R., JOHNSON, M. W.; The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences, **1984** *Gene*, 30, 157-166

BIERMAN, M., LOGAN, R., O'BRIEN, K., SENO, E. T., NAGARAJA RAO, R., SCHONER, B. E.; Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces spp.*, **1992** *Gene*, 116, 43-49

BINNIE, C., COSSAR, J.D., STEWART, D.I.; Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*, **1997** *Trends Biotechnol.*, 15(8), 315-20

BOREL, J. F., BAUMANN, G., CHAPMAN, I., DONATSCH, P., FAHR, A., MUELLER, E. A., VIGOURET, J. M.; In vivo pharmacological effects of cyclosporin and some analogues, **1996** *Adv. Pharmacol.*, 35, 115-246

BOREL, J. F., FEURER, C., GUBLER, H. U. UND STAHELIN, H.; Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocyte agent, **1976** *Agents Action* 6, 468-475

BOTHMANN, H., PLÜCKTHUN, A.; The Periplasmatic *Escherichial coli* Peptidylprolyl *cis,trans*-Isomerase FkpA, **2000** *J. Biol. Chem.*, 275, 22, 17100-17105

BRANDTS, J. F., LIN, L.-N.; Proline isomerization studied with proteolytic enzymes, **1986** *Meth. Enzymol.*, 131, 107-126

BRANDSCH, M., THUNECKE, F., KULLERTZ, G., SCHUTKOWSKI, M., FISCHER, G., NEUBERT, K.; Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H<sup>+</sup>/Peptide-Symporter, PEPT1, **1998** *J. Biol. Chem.*, 273, 3861-3864

BRAATEN, D., ANSARI, H. UND LUBAN, J. ; The hydrophobic pocket of cyclophilin is the binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein, **1997** *Journal of Virology* 71, 2107-2113

BURG, R.W., MILLER, B.M., BAKER, E.E., BIRNBAUM, J., CURRIE, S.A., HARTMAN, R.,; Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organism and Fermentation, **1979** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 15, 361-367

BULL, A. T., GOODFELLOW, M. AND SLATER, J. H.; Biodiversity as a source of innovation in biotechnology, **1992** *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 219- 252.

CHANG, P. C., COHEN, S. N.; Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid, **1994** *Science*, 265, 952-954

CHATER, K. F.; Genetics of differentiation in *Streptomyces*, **1993** *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 685-713

CHATER, K. F.; Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?, **2001** *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 667-673

CHATER, K. F., HOPWOOD, D. A., KIESER, T., THOMPSON, C. J.; Gene cloning in *Streptomyces*, **1982** *Current Topics in Microbiol. Immunol.*, 96, 69-95

CHATER, K. F.; Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation, **1989** *Trends in Genetics*, 5, 372-377

CHAUVEROCHE, M.-K., CHIGO, J.-M., D'ENFERT, C.; A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, **2000** *Nucleic Acids Res.*, 28, 22, 1-6

CHEN, C. W.; Complications and implications of linear bacterial chromosomes, **1996** *Trends Genet.* 12, 192-196

CLUBB, R. T., FERGUSON, S. B., WALSH, C. T., WAGNER, G.; Three-Dimensional Solution Structure of *Escherichia coli* Periplasmic Cyclophilin, **1994** *Biochemistry*, 33, 2761-2772

COURT, D. L., SAWITZKE J. A., THOMASON L. C.; Genetic Engineering Using Homologous Recombination, **2002** *Annu. Rev. Genet.*, 36, 361-388

CRECY-LAGARD, V., SERVANT-MOISSON, P., VIALA, J., GRANDVALET, C., MAZODIER, P. ; Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*, **1999** *Mol. Microbiol.*, 32, 3, 505-517

DARTIGALONGUE, C., RAINA, S.; A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*, **1998** *EMBO J.*, 17, 3968-80

DATSENKO, K. A., WANNER, B. L.; One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, **2000** *PNAS*, 97, 12, 6640-6645

DECKER, H., HAAG, S.; Cloning and Characterization of a Polyketide Synthase Gene from *Streptomyces fradiae* Tü2717, Which Carries the Genes for Biosynthesis of the Angucycline Antibiotic Urdamycin A and a Gene Probably involved in Its Oxygenation, **1995** *J. Bacteriol.*, 177, 21, 6126-6136

DEL MORAL, R. G., OLMO, A., OSUNA, A., AGUILAR, M., CARVIA, R., BECERRA, P., ARREBOLA, F., GUILLEN, M., REGUERO, M. E., ASENSIO, C., O'VALLE, F.; Role of P-glycoprotein in chronic cyclosporine nephrotoxicity and its relationship to intrarenal angiotensin II deposits, **1998** *Transplant Proc.*, 30, 2014-2016

DEMAIN, A. L.; Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, **1999** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 455-463

DENIS, F., BRZEZINSKI, R.; A versatile shuttle cosmid vector for use in *Escherichia coli* and actinomycetes, **1992** *Gene*, 111, 115-118

DHARMALINGAM, K., CULLUM, J.; Genetic instability in *Streptomyces*, **1996** *J. Biosci.*, 21, 433-444

DOLINSKI, K., MUIR, S., CARDENA, M., HEITMAN J.; All Cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*, **1997** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 13093-13098

DOLINSKI, K., SCHOLZ, C., MUIR, R. S., ROSPERT, S., SCHMID, F. X., CARDENAS, M. E., HEITMAN, J.; Functions of FKBP12 and mitochondrial cyclophilin active site residues in vitro and in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*, **1997** *Mol. Biol. Cell*, 8, 2267-2280

DORFMAN, T., WEIMANN, A., BORSETTI, A., WALSH, C. T., GOTTLINGER, H. G.; Active-site residues of cyclophilin A are crucial for its incorporation into human immunodeficiency virus type 1 virions, **1997** *J. Virol.*, 71, 7110-7113

EGAN, S., WIENER, P., KALLIFIDAS, D., WELLINGTON, E. M. H.; Transfer of *streptomycin* biosynthesis gene clusters within *streptomyces* isolated from soil, **1998** *Appl. Env. Microbiol.*, 64, 5061-5063

FANGHÄNEL, J., FISCHER G.; Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases, **2004** *Frontiers in Bioscience*, 9, 3453-3478

FLÄRDH, K.; Growth polarity and cell division in *Streptomyces*, **2003** *Curr. Op. Microbiol.*, 6, 564-571

FISCHER G.; Chemical Aspects of peptide bond isomerisation, **2000** *Chem. Soc. Rev.*, 29, 119-127

FISCHER G., BANG, H., MECH C.; Nachweis einer Enzymkatalyse für die *cis-trans*-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden, **1984** *Biomed. Biochim. Acta*, 43, 10, 1101-1111

FISCHER, G., WITTMANN-LIEBOLD, B., LANG, K., KIEFHABER, T., SCHMID, F. X.; Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins, **1989** *Nature*, 337, 476-478

FISCHER, S., MICHNICK, S., KARPLUS, M.; A mechanism for rotamase catalysis by the FK506 binding protein (FKBP), **1994** *Biochemistry*, 32, 13830-13837

FISCHER G., TRADLER, TH., ZARNT T.; The mode of action of peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases in vivo: binding vs. Catalysis, **1998** *FEBS Letters*, 426, 17-20

FISCHER, G., DECARIS, B., LEBLOND, P.; Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA, **1997** *J. Bacterio.*, 179, 4533-4558

FISCHER G., WITTMANN-LIEBOLD B., LANG, K., KIEFHABER TH., SCHMID, F. X.; Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins; **1989** *Nature*, 337, 476-478

FLETT, F., MERSINIAS, V., SMITH, C. P.; High efficiency intergeneric conjugal transfert of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes, **1997** *FEMS Microbiol. Lett.*, 155, 223-229

FRANKE, E. K., YUAN, H. E. H., LUBAN, J.; Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions, **1994** *Nature* 372, 359-362.

Fujii, I., Ebizuka, Y.; Anthracycline biosynthesis in *Streptomyces galileus*, **1997** *Chem. Rev.*, 97, 2511-2523

GALAT, A., METCALFE, S. M.; Peptidylproline *cis/trans* isomerases, **1995** *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 63, 67-118

GALAT, A.; Peptidylproline *cis-trans*-isomerases: immunophilins, **1993** *Eur. J. Biochemistry*, 216, 689-707

GILBERT, M., MOROSOLI, R., SHARECK, F., KLUEPFEL, D.; Production and secretion of proteins by *Streptomycetes*, **1995** *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15, 13-39

GÖTHEL, S. F., MARAHIEL, M. A.; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalyst, **1999** *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 423-436

GUST, B., CHALLIS, G. L., FOWLER, K., KIESER, T., CHATER K. F.; PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin, **2003** *PNAS*, 100, 4, 1541-1546

HANAHAH, D.; Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid, **1983** *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580

HÄNDLER, B., HOFER-WARBINEK, R., HOFER E.; Complementary DNA for human T-cell cyclophilin, **1987** *EMBO J.*, 6, 947-950

HÄNDLER, B., KELLER, R., HIESTAND, P.C., KOCHER, H.P., WEGMANN, G., MOVVA, N.R.; Yeast cyclophilin: isolation and characterization of the protein, cDNA and gene, **1989** *Gene*, 83, 39-46

HANDSCHUHMACHER, R. E., HARDING, M. W., RICE, J., DRUGGE, R. J., SPEICHER, D. W.; Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein of Cyclosporin A, **1984** *Science*, 226, 544-547

HANES, S. D., SHANK, P. R. UND BOSTIAN, K. A.; Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*, **1989** *Yeast* 5, 55-72

HANI, J., STUMPF, G. UND DOMDEY, H; PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases, **1995** *FEBS Letters*, 365,198-202

HARDING, M. W., GALAT, A., UEHLING, D. E., SCHREIBER, S. L.; A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis/trans* Peptidyl-Prolyl Isomerase, **1989** *Nature*, 341, 758-560

HAYANO, T., TAKAHASHI, N., KATO, S., MAKI, N., SUZUKI, M.; Two distinct forms of peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells, **1991** *Biochemistry*, 30, 3041-3048

HENDERSON G., KRYGSMANN P., DAVEY C. C., MALEK, L. T.; Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*, **1987** *J. Bacteriol.*, 169, 3778-3784

HERR, R. R., JAHNKE, H. K., ARGOUDELIS, A.D.; The structure of streptozotocin, **1967** *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 4808-4809

HESTERKAMP, T., BUKAU, B.; *The Escherichia coli* trigger factor, **1996** *FEBS Lett.*, 389, 32-34

HESTERKAMP, T., BUKAU, B.; Identification of the prolyl isomerase domain of *Escherichia coli* trigger factor, **1996** *FEBS Lett.*, 385, 67-71

HILLEMANN, D., PÜHLER, A., WOHLLEBEN, W.; Gene disruption and gene replacement in *Streptomyces* via single stranded DNA transformation of integration vectors, **1991** *Nucleic Acids Res.*, 19, 4, 727-731

HOFFMANN, K., HANDSCHUMACHER, R. E.; Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90, **1995** *Biochem. J.*, 307, 5-8

HOLLIDAY, R.; A. mechanism for gene conversion in fungi, **1964** *Genet. Res.*, 5, 282-304

HOPWOOD, D. A., KIESER, T., WRIGHT, H. M., BIBB, M. J.; Plasmid recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66, **1983** *J. Gen. Microbiol.*, 129, 2257-2269

HOPWOOD, D. A., BIBB, M. J., CHATER, K. F., KIESER, T.; Plasmid and phage vectors for gene cloning and analysis in *Streptomyces* spp., **1987** *Methods Enzymol.* 153, 116-166

HOPWOOD, D. A., CHATER, K. F., BIBB, M. J.; Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model streptomycete; **1995** *Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production*, L.C. Vining and C. Stuttard, Ed., Butterworth-Heinemann, Toronto, 65-102

HOWARD, K.S., MCLEAN, P.A., HANSEN, F.B., LEMLEY, P.V., KOBLAN, K.S. AND ORME-JOHNSON, W.H.; *Klebsiella pneumoniae nifM* gene product is required for stabilisation and activation of nitrogenase iron protein in *Escherichia coli*, **1989** *J. Biol. Chem.* 261, 772-778

HUANG, C. H., LIN, Y. S., YANG, Y. L. HUANG, S. W., CHEN, C. W.; The telomeres of *streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures, **1998** *Mol. Microbiol.*, 28, 905-916

INQUE, S., HIGASHIYAMA, K., UCHIDA, T., HIRATSU, K.; Chromosomal Circularization in *Streptomyces griseus* by Nonhomologous Recombination of Deletion Ends, **2003** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 1101-1108

IVERY, M. T. G.; Immunophilins: switched on protein binding domains?, **2000** *Med. Res. Rev.*, 20, 452-484

JABS, A., WEISS, M.S., HILGENFELD, R.; Non-proline cis peptide bonds in proteins, **1999** *J. Mol. Biol.*, 286, 291-304

JACOBS, M., ANDERSEN, J. B., KONTINEN, V. UND SARVAS, M.; *Bacillus subtilis* PrsA is required in vivo as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences, **1993** *Mol. Microbiol.*, 8, 957-966

JACOBS, M., ANDERSEN, J. B., KONTINEN, V., SARVAS, M.; *Bacillus subtilis* PrsA is required in vivo as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences, **1998** *Mol. Microbiol.*, 8, 957-966

JANOWSKI, B., WÖLLNER, S., SCHUKOWSKI, M., FISCHER, G.; A Protease-Free Assay for Peptidyl Prolyl *cis/trans* Isomerases Using Standard Peptide Substrates, **1997** *Anal. Biochem.*, 252, 299-307

JAKOMOWICZ, D., MAJKA, J., MESSER, W., SPECK, C., FERNDANEZ, M., MARTIN, M., C., SANCHEZ, J., SCHAUWECKER, F., KELLER, U., SCHREMPF, H., ZAKRZEWSKA-CZERWINKSA, J.; Structural Elements of the *Streptomyces* oriC region and their interactions with the DnaA protein, **1998** *Microbiol.*, 144, 1281-1290

KALLEN, J., SEDRANI, R., ZENKE, G., WAGNER, J.; Structure of Human Cyclophilin A in Complex with the Novel Immunosuppressant Sanglifehrin A at 1.6 Å Resolution, **2005** *J. Biol. Chem.*, 280, 21965-21971

KANDROR, O., SHERMAN, M., MOERSHELL, R., GOLDBERG, A. L.; Trigger factor associates with GroEL in vivo and promotes its binding to certain polypeptides, **1997** *J. Biol. Chem.* 272, 1734

KAWAMUKAI, M., MATSUDA, H., FUJII, W., UTSUMI, R., KOMANO, T.; Nucleotide sequences of *fic* and *fic-1* genes involved in cell filamentation induced by cyclic AMP in *Escherichia coli*, **1989** *J. Bacteriol.*, 171, 4525-4529

KIESER, T., BIBB, M. J., BUTTNER, M. J., CHATER, K. F., HOPWOOD, D. A.; Practical *Streptomyces* Genetics, **2000** *The John Innes Foundation*, Norwich, United Kingdom

KIESER, H. M., KIESER, T., HOPWOOD, D. A.; A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome, **1992** *J. Bacteriol.* 174, 5496-5507

KIESER, T., HOPWOOD, D. A.; Genetic manipulation of *Streptomyces*: integrating vectors and gene replacement, **1991** *Methods Enzymol.*, 204, 430-458

KONTINEN, V. P., SARIS, P., SARVAS, M.; A gene (prsA) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export, **1991** *Mol. Microbiol.* 5, 1273-1283

KONTINEN, V.P. AND SARVAS, M.; The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion, **1993** *Mol. Microbiol.* 8, 727-737

KUTZNER, K. J.; The family *Streptomycetaceae*, **1986** In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (eds): The prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, vol. 2, Springer-Verlag, New York, 2028-2090

LABES, G., SIMON, R., WOHLLEBEN, W.; A rapid method for the analysis of plasmid content and copy number in various Streptomyces grown on agar plates, **1990** *Nucl. Acids Res.*, 18, 2197

LACKS, S., GREENBERG, B.; Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation, **1977** *J. Mol. Biol.*, 114, 153-168

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

LANG, K., SCHMID, F.; Protein-disulphide isomerase and prolyl isomerase act differently and independently as catalysts of protein folding, **1988** *Nature*, 331, 453-455

LAMMERTYN, E., VAN MELLAERT, L., BIJNENS, A.P., JORIS, B., ANNÉ, J.; Codon adjustment to maximise heterologous gene expression in *Streptomyces lividans* can lead to decreased mRNA stability and protein yield, **1996** *Mol Gen Genet.*, 250, 223-229

LANG, K., SCHMID, F. X., FISCHER, G.; Catalysis of protein folding by prolyl isomerase; **1981** *Nature*, 329, 268-270

LAZAR, S. W., KOLTER, R.; SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins, **1996** *J. of Bacteriol.* 178, 1770-1773

LAZZARINI, A., CAVALETTI, L., TOPPO, G., MARINELLI, F.; Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics, **2001** *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 399-405

LEBLOND, P., FISCHER, G., FRANCOU, F. X., BERGER, F., GUERINEAU, M., DECARIS, B.; The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA, **1996** *Mol. Microbiol.* 19, 261-271

LIN, Y. S., KIESER, H. M., HOPWOOD, D. A., CHEN, C. W.; The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear, **1993** *Mol. Microbiol.*, 10, 923-933

LIU, S., XIE, F.; Involvement of the Ca(2+)-protein kinase C and adenylate cyclase signal pathways in the activation of thymocytes in response to whole-body irradiation with low dose X-rays, **2000** *Chin. Med. Sci. J.*, 15, 1-7

LIU, J., FARMER, J. D., LANE, W. S., FRIEDMAN, J., WEISSMAN, I., SCHREIBER, S. L.; Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes, **1991** *Cell*, 66, 807-815

LUBAN, J., BOSSOLT, K. L., FRANKE, E. K., KALPANA, G. V., GOFF, S. P.; Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B, **1993** *Cell* 73, 1067-1078

LUBAN, J.; Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions, **1996** *Cell*, 87, 1157-1159

LODISH, H. F., KONG, N.; Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum, **1991** *J. Biol. Chem.*, 266, 14835-14838.

LU, K. P., HANES, S. D., HUNTER, T.; A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis, **1996** *Nature* 380, 544-547

MA, L., HSIEH-WILSON, L. C., SCHLUTZ, P. G.; Antibody catalysis of peptidyl-prolyl cis-trans isomerization in the folding of Rnase T1, **1998** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7251-7256

MANTECA, A., KAMPHAUSEN, TH., FANGHANTEL, J., FISCHER, G., SANCHEZ, J.; Cloning and characterization of a *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 cyclophilin related to gram negative bacteria cyclophilins, **2004** *FEBS Lett.*, 572, 19-26

MARKS, A.; Cellular Functions of Immunophilins, **1999** *Phys. Reviews*, 76, 631-649

MCCAFFREY, P. G., PERRINO, B. A., SODERLING, T. R. UND RAO, A.; NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs, **1993** *J. Biol. Chem.*, 268, 3747-3752

MESELSON, M. S., RADDING, C. M.; A general model for genetic recombination, **1975** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 358-361

MINAS, W., BAILEY, J. E., DUETZ, W.; *Streptomyces* in micro-cultures: growth, production of secondary metabolites and storage and retrieval in th 96-well format, **2000** *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78, 297-305

MÜCKE, M., SCHMID F. X.; Enzymatic Catalysis of Prolyl Isomerization in an Unfolding Protein, **1992** *Biochemistry*, 31, 7848-7854

MAYR, L. M., SCHMIDT F. X.; Kinetic Models for Unfolding and Refolding of Ribonuclease T1 with Substitution of *Cis*-proline 29 by Alanine, **1993** *J. Mol. Biol.*, 231, 913-926

MOREAU, A.; DUEZ, C., DUSART, J.; Improvement of GC-rich template amplifikation by inverse PCR, **1994** *Biotechniques*, 17, 232-234

MURPHY, K. C.; Use of Bacteriophage  $\lambda$  Recombination Functions To Promote Gene Replacement in *Escherichia coli*, **1988** *J. Bacteriol.*, 180, 8, 2063-2071

MURPHY, K. C., CAMPELLONE, K. G., POTEETE, A. R.; PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*, **2000** *Gene*, 246, 321-330

MUTH, G., NUßBAUMER, B., WOHLLEBEN, W., PÜHLER A.; A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes, **1989** *Mol. Gen. Genet.*, 219, 341-348

MNIYAPPA, K., GANESH, N., GUHAN, N., SINGH, P., MANJUNATH, G. P., DATTA, S., CHANDRA, N. R., VIJAYAN, M.; Homologous recombination in mycobacteria, **2004** *Curr. Science*, 86, 1, 141-148

NAKANO, T., MIYAKE, K., IKEDA, M., MIZUKAMI, T., KATSUMATA, R.; Mechanism of the incidental production of a melanin-like pigment during 6-demethylchlortetracycline production in *Streptomyces aureofaciens*, **2000**, *Appl. Env. Microbiol.*, 66, 1400-1404

OCHI, K.; A taxonomic study of the genus *Streptomyces* by analysis of ribosomal protein AT-L30, **1995** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 507-14

OH, S.-H., CHATER, K. F.; Denaturation of Circular or Linear DNA Facilitates Targeted Integrative Transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): Possible Relevance to Other Organisms, **1997**, *J. Bacteriol.*, 179, 1, 122-127

OHMAN, R., RIDELL, M.; Selective enzyme staining procedures for characterization of mycobacterial immunoprecipitates, **1986** *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, 79, 145-148

OWENS-GRILLO, J. K., HOFFMANN, K., HUTCHINSON, K. A., YEM, A. W., DEIBEL JR., M. R., HANDSCHUMACHER, R. E., PRATT, W. B.; The cyclosporin A-binding immunophilin CyP40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor, **1995** *J. Biol. Chem.*, 270, 20479-20484.

OWENS-GRILLO, J. K., STANCATO, L. F., HOFFMANN, K., PRATT, W. B. UND KRISHNA, P.; Binding of immunophilins to the 90 kDa heat shock protein (hsp90) via a tetratricopeptide repeat domain is a conserved protein interaction in plants, **1996** *Biochemistry*, 35, 15249-15255

PAHL, A., GEWIES, A., KELLER, U.; ScCypB is a novel second cytosolic cyclophilin from *Streptomyces chrysomallus* which ist phylogenetically distant from ScCypA, **1997** *Microbiol.*, 143, 117-126

PAHL, A., KELLER, U.; FK-506-Binding Proteins from Streptomycetes Producing Immunosuppressive Macrolactones of the FK-506 Type, **1992** *J. Bacteriol.* 174, 5888-5894

PAHL, A., ÜHLEIN, M., BANG H., SCHLUMBOHM, W., KELLER U.; *Streptomyces* possess peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases that strongly resemble cyclophilins from eukaryotic organisms; **1992** *Mol. Microbiol.* 6, 23, 3551-3558

PAHL, A., KELLER, U.; *Streptomyces chrysomallus* FKBP-33 is a novel immunophilin consisting of two FK506 binding domains; its gene ist transcriptionally coupled to the FKBP-12 gene, **1994** *EMBO J.* 13, 3472-3480

PAHL, A., GEWIES, A., KELLER U.; ScCypB is a novel second cytosolic cyclophilin from *Streptomyces chrysomallus* which is phylogenetically distant from ScCypA, **1997** *Microbiol.*, 143, 117-126

PARADKAR, A., TREFZER, A., CHAKRABURRY, R., STASSI, D.; *Streptomyces* Genetics: A Genomic Perspective, **2003** *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23, 1-27

PARANTHAMAN, S., DHARMALINGAM, K.; Intergeneric Conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. Stran C5: Chromosomal Integration and Expression of Recombinant Plasmids Carrying the *chiC* Gene, **2003** *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 84-91

PERNODET, J.-L., MAZODIER, P.; Global Analysis of *Streptomyces*, **2002** Genomics of GC-rich Gram-Positive Bacteria, Caister Academic Press, Wymondham, UK

PLIYEV, B. K., BURVITS, B. Y.; Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerases: Structure and Funktions, **1999** *Biochemistry (Moscow)*, 64, 738-751

RADDING, C. M.; Homologous pairing and strand exchange in genetic recombination, **1982** *Annu. Rev. Genet.*, 405-437

RAHFELD, J. U., RUCKNAGEL, K. P., SCHELBERT, B., LUDWIG, B., HACKER, J., MANN, K. UND FISCHER, G.; Confirmation of the existence of a third family among peptidylprolyl *cis/trans* isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin, **1994**, *FEBS Letters* **352**, 180-184

RAHFELD, J. U., SCHIERHORN, A., MANN, K. UND FISCHER, G.; A novel peptidylprolyl *cis/trans* isomerase from *Escherichia coli*. SWISS-Prot-Sequenzeintrag S45525, 1994 *FEBS Letters*, 343, 65-69

RAMACHANDRAN, G. N., SASISEKHARAN, V.; Conformation of polypeptides and proteins, **1968** *Adv. Prot. Chem.*, 23, 283-438

REDENBACH, M., KIESER, H. M., DENAPAITE, D., EICHNER, A., CULLUM, J., KINASHI, H., HOPWOOD, D. A.; A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome, **1996** *Mol. Microbiol.*, 21, 1, 77-96

REIMER, U., SCHERER G., DREWELLO, M., KRUBER, S., SCHUTKOWSKI, M., FISCHER G.; Side-Chain Effects on Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerisation, **1998** *J. Mol. Biol.* 279, 449-460

RICHARDSON, M. A., KUHSTOSS, S., SOLENBERG, P., SCHAUS, N. A., NAGARAJA RAO, R.; A new shuttle cosmid vector, pKC505, for streptomycetes: its use in the cloning of three different streptomycin-resistance genes from a *Streptomyces ambofaciens* library, **1987** *Gene* 61, 231-241

RIDELL, M., WALLERSTRÖM, G., WILLIAMS, S. T.; Immunodiffusion analysis of phonetically defined strains of *Streptomyces*, *Streptoverticillium* and *Nocardiopsis*, **1986** *Sys. Appl. Microbiol.*, 8, 24-27

ROTH, M., MÜLLER, G., NEIGENFIND, M., HOFFMEINER, C., GEUTHER, R.; Genetics and Product Formation in *Streptomyces*, **1991** Plenum Press, London, 305-313

SABATINI, D. M., ERDJUMENT-BROMAGE, H., LUI, M., TEMPST, P., SNYDER, S.H.; RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs, **1994** *Cell*, 78, 35-43.

SCHAERLEKENS, K., SCHIEROVA, M., LAMMERTYN, E., GEUKENS, N., ANNE, J., VAN MELLAERT, L.; Twin-Arginine Translocation Pathway in *Streptomyces lividans*, **2001** *J. Bacteriol.*, 138, 23, 6727-6732

SCHINDLER, T., MAYR, L. M., LANDT, O., HAHN, U., SCHMID, F. X.; The role of a trans-proline in the folding mechanism of ribonuclease T1, **1996** *Eur. J. Biochem.* 241, 516-524

SCHIENE-FISCHER C., YU, C.; Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases, **2001** *FEBS Letter*, 495, 1-6

SCHIENE-FISCHER, C., FISCHER G.; Direct Measurement Indicates a Slow *cis/trans* Isomerization at the Secondary Amide Peptide Bond of Glycylglycine, **2001** *J. Am. Chem. Soc.* 123, 6227-6231

SCHIENE, C., FISCHER G.; Enzymes that catalyse the restructuring of proteins, **2000** *Curr. Op. Struc. Biol.*, 10, 40-45

SCHMID, F. X.; Protein folding. Prolyl isomerases join to fold, **1995** *Curr. Biol.*, 5, 993-994

SCHMID, F. X., FRECH, C., SCHOLZ, C., WALTER, S.; Catalyzed and assisted protein folding of ribonuclease T1, **1996** *Biol. Chem.*, 377, 417-424

SCHNEIDER, D., BRUTON, C. J., CHATER, K. F.; Duplicated gene clusters suggest an interplay of glycogen and trehalose metabolism during sequential stages of aerial mycelium development in *Streptomyces coelicolor* A3(2), **2000** *Mol. Gen. Genet.*, 263, 543-553

SCHOLZ, G., STOLLER, G., ZARNT, T., FISCHER, G., SCHMID, F. X.; Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding, **1997** *EMBO J.*, 16, 54-58

SCHREIBER, S. L., CRABTREE, G. R.; The mechanism of action of cyclosporin A and FK506, **1992** *Immunol Today.*, 13, 136-142

SCHREIBER, S. L.; Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways, **1992** *Cell*, 70, 365-368

SMITH, G. R.; How homologous recombination is initiated: unexpected evidence for single-strand nicks from v(d)j-site-specific recombination, **2004** *Cell* 117, 146-148

STEINMANN, B., BRUCKNER, P., SUPERTI-FURGA, A.; Cyclosporin A Slows Collagen Triple-helix Formation *in Vivo*: Indirect Evidence for a Physiologic Role of Peptidyl-Prolyl *cis-trans*-Isomerase, **1991** *J. Biol. Chem.* 266, 2, 1299-1303

STOLLER, G., RUCKNAGEL, K. P., NIERHAUS, K. H., SCHMID, F. X., FISCHER, G., RAHFELD, J. U.; A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor, **1995** *EMBO Journal*, 14, 4939-4948

STOLLER, G., TRADLER, T., RUCKNAGEL, K. P., RAHFELD, J.-U. UND FISCHER, G.; An 11.8 kDa proteolytic fragment of the *E. coli* trigger factor represents the domain carrying the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity, **1996** *FEBS Letters*, 384, 117-122

SZOSTAK, J. W., ORR-WEAVER, T. L., ROTHSTEIN, R. J.; The double-strand break repair model for recombination, **1983** *Cell*, 33, 25-35

TAKANO, E., WHITE, J., THOMPSON, C., J., BIBB, M. J.; Construction of thiostrepton-inducible, high-copy number expression vectors for use in *Streptomyces* spp., **1995** *Gene*, 166, 133-137

THALI, M., BUKOVSKY, A., KONDO, E., ROSENWIRTH, B, WALSH, C. T., SODROSKI, J., GOTTLINGER, H. G.; Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions, **1994** *Nature*, 372, 363-365

TOMICH, P. K., YAGI, Y.; The Utility of *Streptomycetes* as hosts for gene cloning, **1990** *Genet. Eng.*, 12, 53-72

UCHIDA, T., MIYAWAKI, M., KINASHI, H.; Chromosomal Arm Replacement in *Streomyces griseus*, **2003** *J. Bacteriol.*, 185, 3, 1120-1124

VANCE, J. E., LEBLANC, D. A., WINGFIELD, P., LONDON, R. E.; Conformational selectivity of HIV-1 protease cleavage of Xaa-Pro peptide bonds and its implications, **1997** *J. Biol. Chem.*, 272, 15603-15606

VARADARAJ, K.; SKINNER, D. M.; Denaturants or cosolvents improve specificity of PCR amplification of G+C-rich DNA using engineered DNA-Polymerase, **1994** *Gene*, 140, 1-5

VEERARAGHAVAN, S., NALL, B. T., FINK, A. L.; Effect of Prolyl Isomerase on the Folding Reactions of *Staphylococcal* Nuclease, **1997** *Biochemistry*, 36, 15134-15139

VEZINA, C., KUDELSKI, A., SEHGAL, S. N.; Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle, **1975** *J. Antibiotics*, 28, 721-726

VILLAREJO, M. R., ZABIN, I.;  $\beta$ -galactosidase from termination and Deletion Mutant Strains, **1974** *J. Bacteriol.*; 110, 171-178

WIEGERS, K., RUTTER, G., SCHUBERT, U., GRATTINGER, M. UND KRAUSSLICH, H. G.; Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1

particle maturation and does not destabilize the mature capsid, **1999** *Virology*, 257, 261-274

WILLIAMS, K. A., DEBER, C. M.; Proline residues in transmembrane helices: structural or dynamic role?, **1991** *Biochemistry*, 30, 8919-8923

WOHLLEBEN, W., HARTMANN, V., HILLEMANN D., KREY, K., MUTH, G., NUBBAUMER, B., PELZER, S.; Transfer and establishment of DNA in *Streptomyces*, **1994** *Acta Microbio. Immunol. Hung.* 41, 381-389

WOHLLEBEN, W. MUTH, G., KALINOWSKI, J., REHM, H. J., REED, G., PÜHLER, A.; GENETIC Fundamentals and Genetic Engineering, **1986** *Biotechnology Vol.2*, Verlagsgesellschaft Chemie, Weinheim, 455-505

WRIGHT, F., BIBB, M. J.; Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome, **1992** *Gene*, 113, 55-65

XIAO, J., MELTON, R. E., KIESER T.; High- frequency homologous plasmid-plasmid recombination coupled with conjugation of plasmid SCP2 in *Streptomyces*, **1994** *Mol. Microbiol.* 14, 3, 547-555

XU, C., LIAO, J., XIE, W., CHENG, Y., ZHU, G., YANG, Y., CHEN, C., TAO, L., NIU, L. WANG, Y.; Construction of the glucose isomerase deficient strain of *Streptomyces* M1033 by homologous recombination, **2000** *Chin. Sci. Bull.*, 45, 1, 64-69

YANG, C. C., HUANG, C. H., LI, C. Y., TSAY, Y. G. LEE, S. C. CHEN. C. W.; The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins, **2002** *Mol. Microbiol.* 43, 297-305

YANISH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, X.; Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp and pUC19 vector, **1985** *Gene*, 33, 103-119

YARON, A., NAIDER, F.; Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins, **1993** *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 28, 31-81

YOKOI, H., KONDO, H., FURUYA, A., HANAI, N., IKEDA, J. E. UND ANAZAWA, H.; Characterization of cyclophilin 40: highly conserved protein that directly associates with Hsp90, **1996** *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19, 506-511

ZHANG, Y., BUCHHOLZ, F., MUYRERS, J. P. P., STEWART, A. F.; A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*, **1998** *Nat. Genetics*, 20, 123-128

ZHANG, Y., MUYRERS, J. P. P., TESTA, G., STEWART, A. F.; DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*, **2000**, *Nat. Biotechnol.*, 18, 1314-1317

ZHAO, Y., KE, H.; Chrystal Structure Implies That Cyclophilin Predominantly Catalyzes the Trans to Cis Isomerization, **1996** *Biochemistry*, 35, 7356-7361

ZHAO, Y., CHEN, Y., SCHUTKOWSKI, M., FISCHER, G., KE, H.; Cyclophilin A complexed with a fragment of HIV-1 gag protein: Insights into HIV-1 infectious activity, **1997** *Structure*, 5, 139-146

## VII. ANHANG

### 7.1 PLASMID-KARTEN

#### 7.1.1 pGemTCypA1

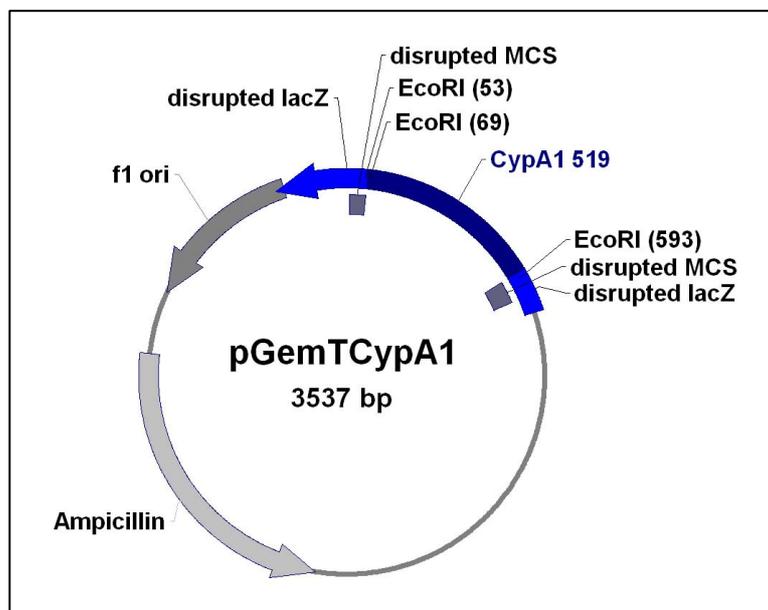


Abb. 7.1: Plasmid zur Sequenzierung des CypA1

#### 7.1.2 pGemTCypA2

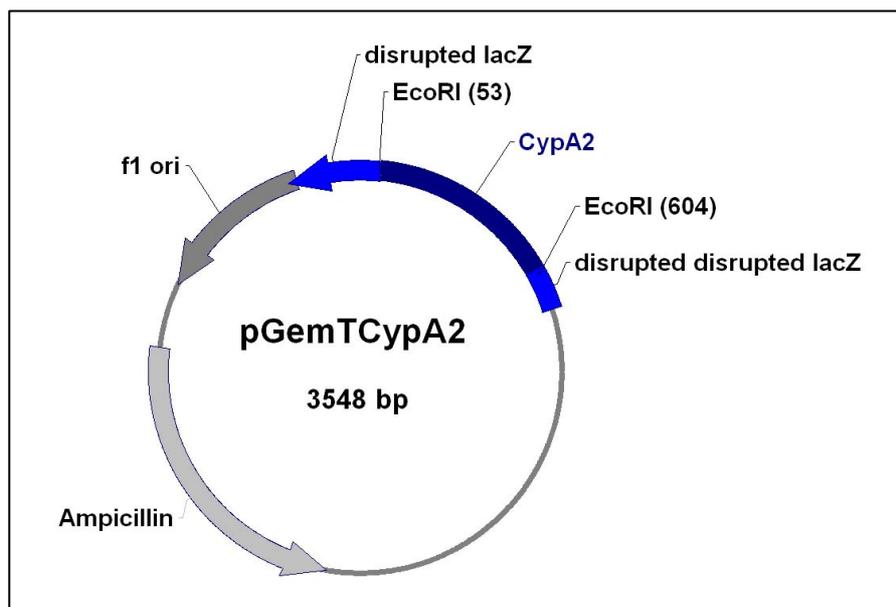


Abb. 7.2: Plasmid zur Sequenzierung des CypA2

## 7.1.3 pQECypA1

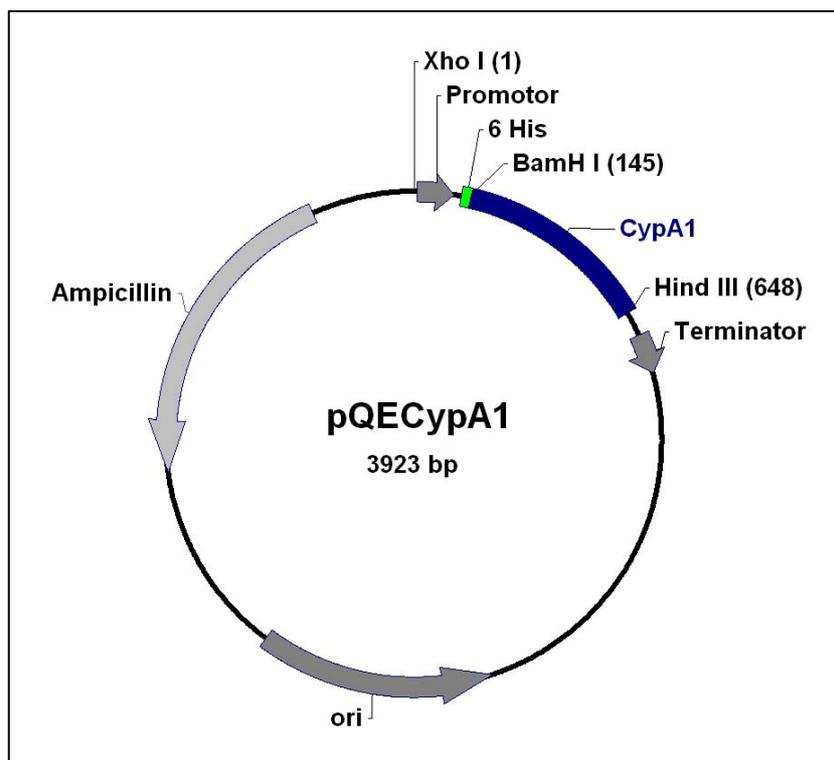


Abb. 7.3: Plasmid zur Überexpression des CypA1

## 7.1.4 pQECypA2

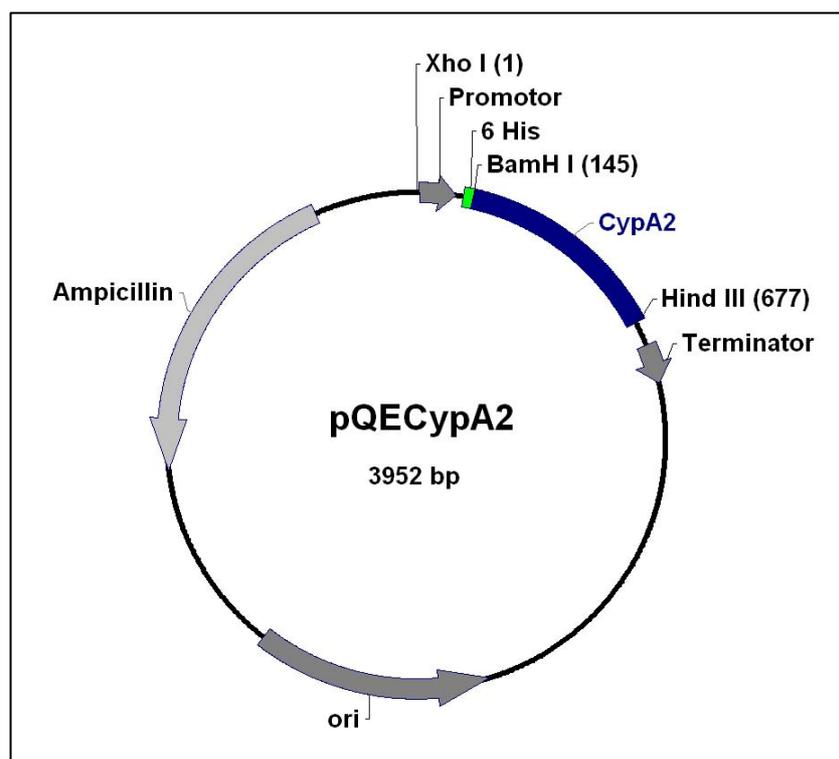
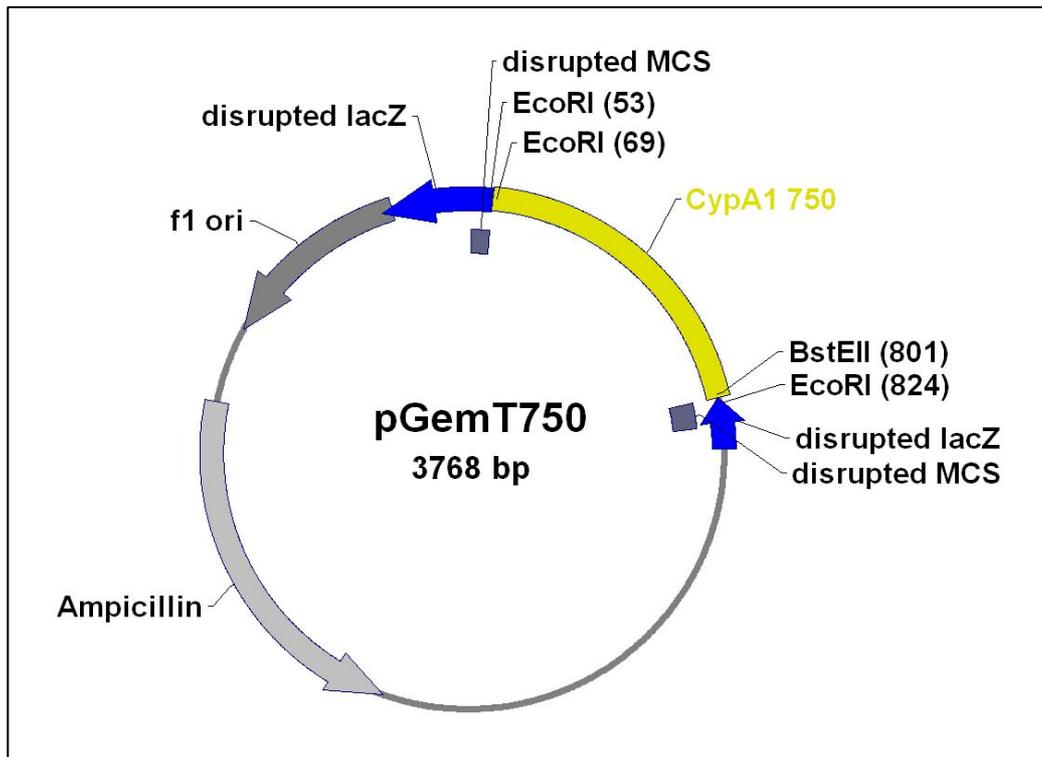


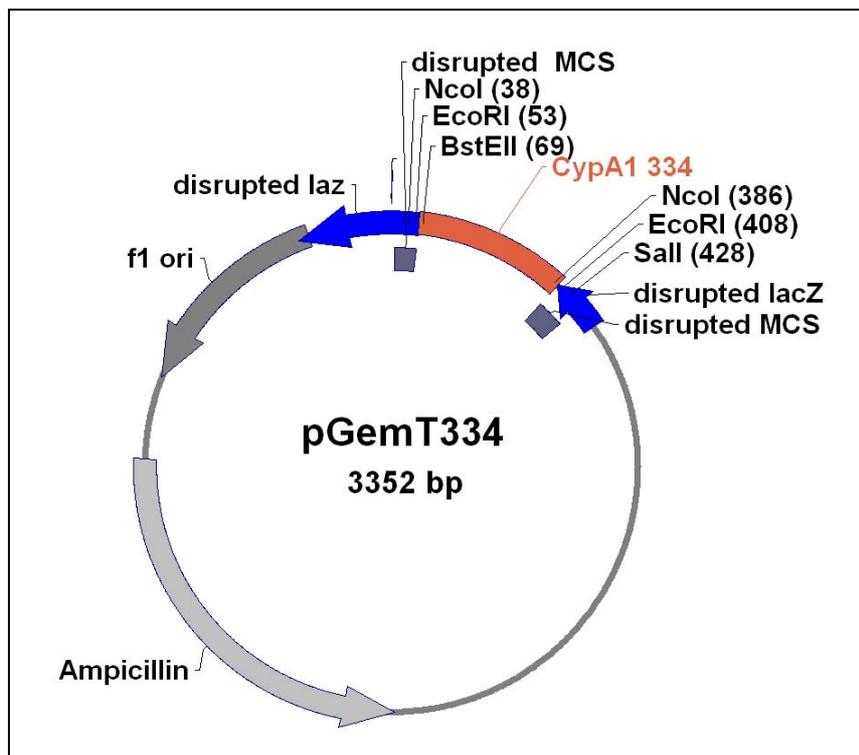
Abb. 7.4: Plasmid zur Überexpression des CypA2

## 7.1.5 Plasmide zu CypA1 – Strategie II

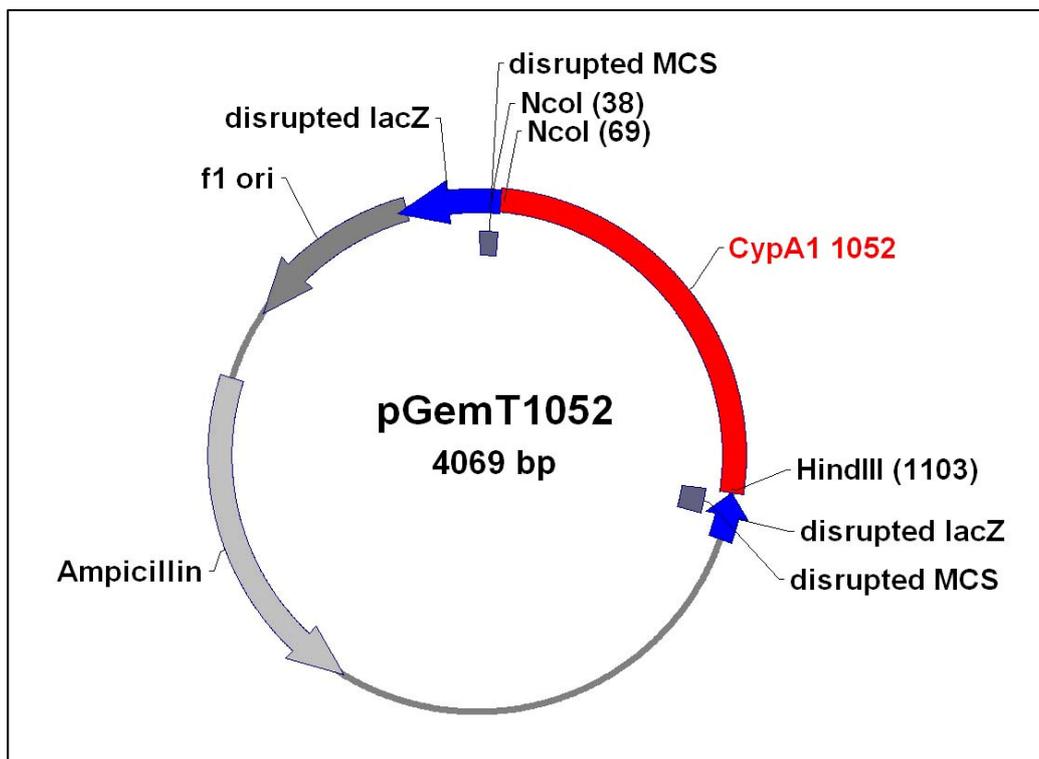
## 7.1.5.1 pGemT750

Abb. 7.5: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA1

## 7.1.5.2 pGemT334

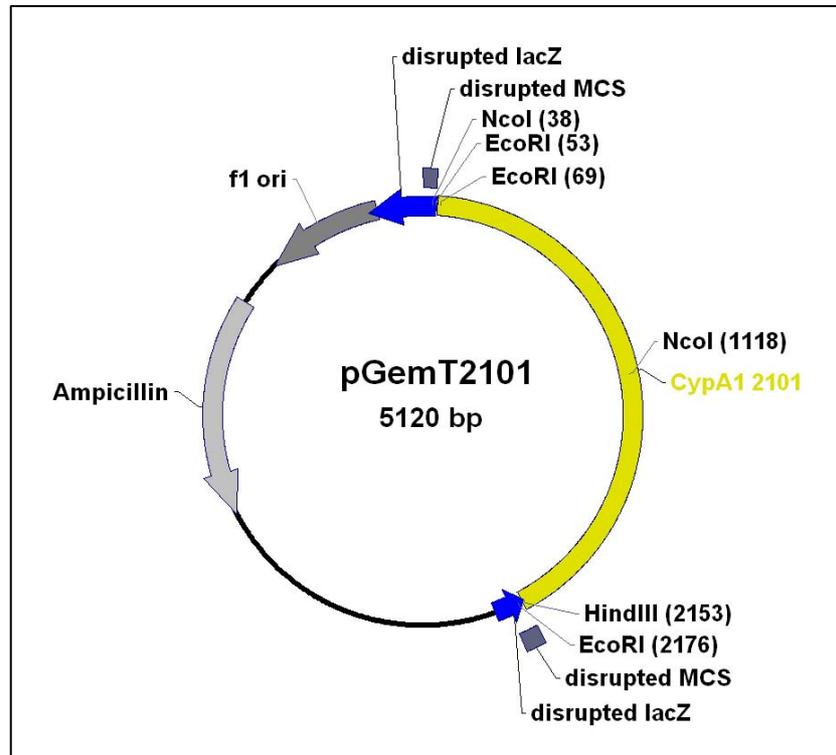
Abb. 7.6: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA1

## 7.1.5.3 pGemT1052 (CypA1)

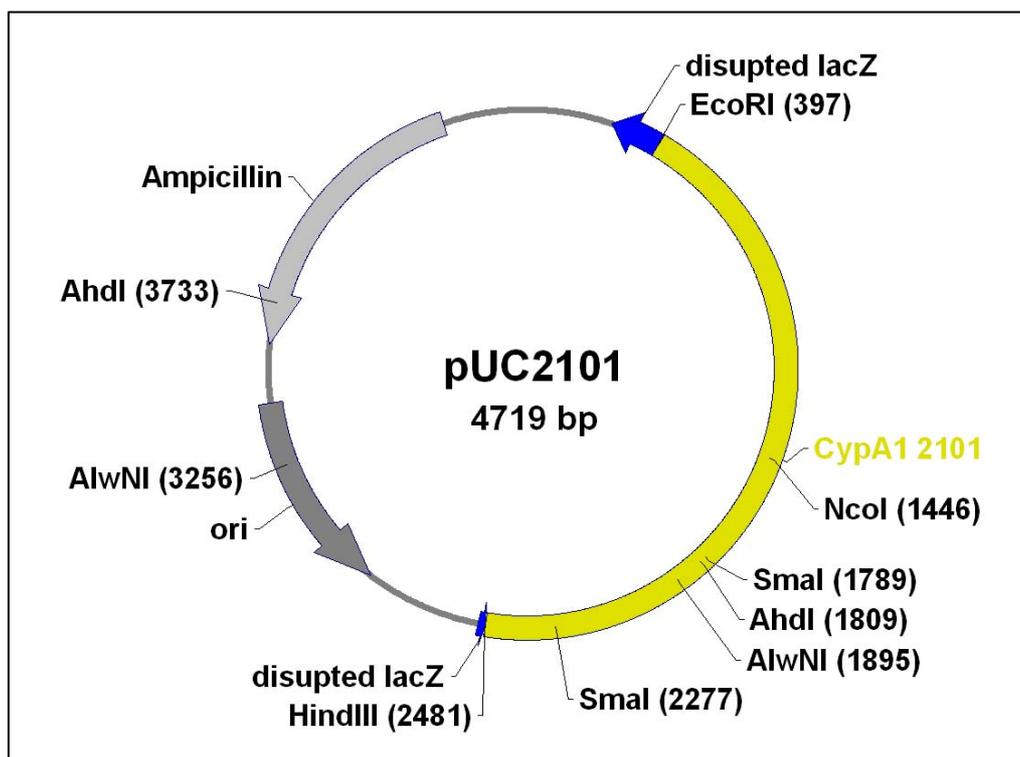
Abb. 7.7: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA1

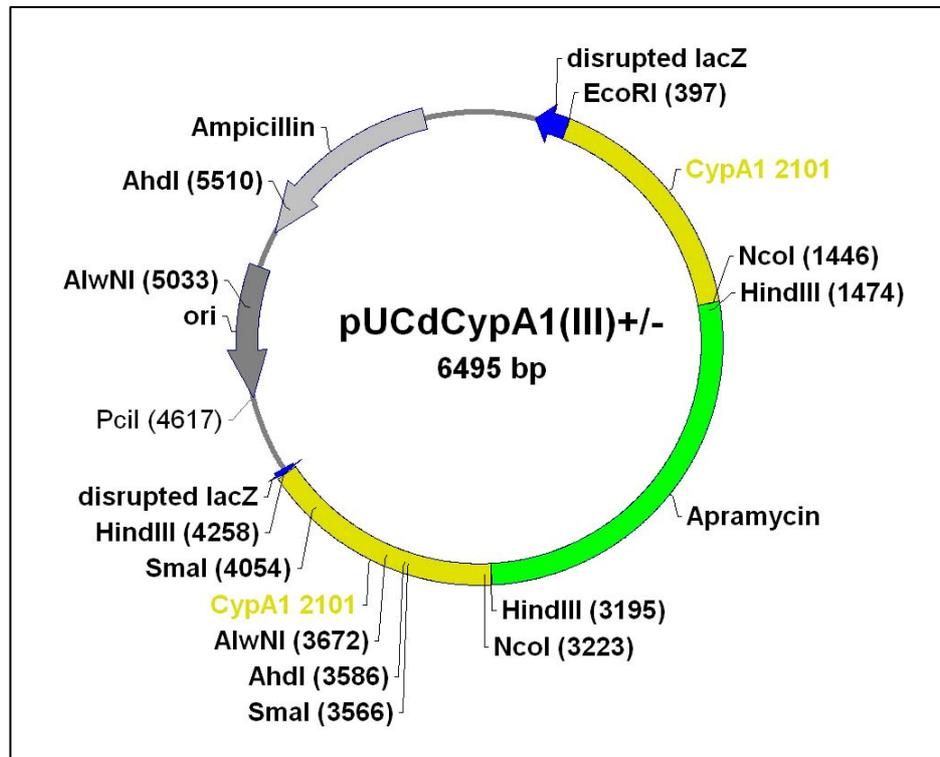
## 7.1.6 Plasmide zu CypA1 – Strategie III

## 7.1.6.1 pGemT2101

Abb. 7.8: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA1

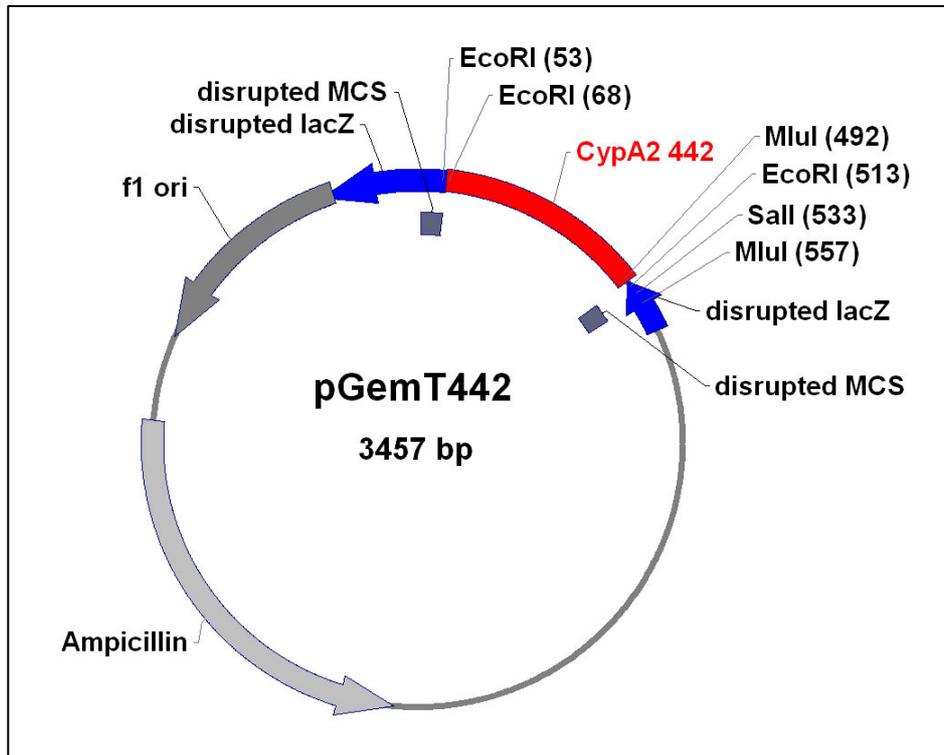
## 7.1.6.2 pUC2101

Abb. 7.9: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA1

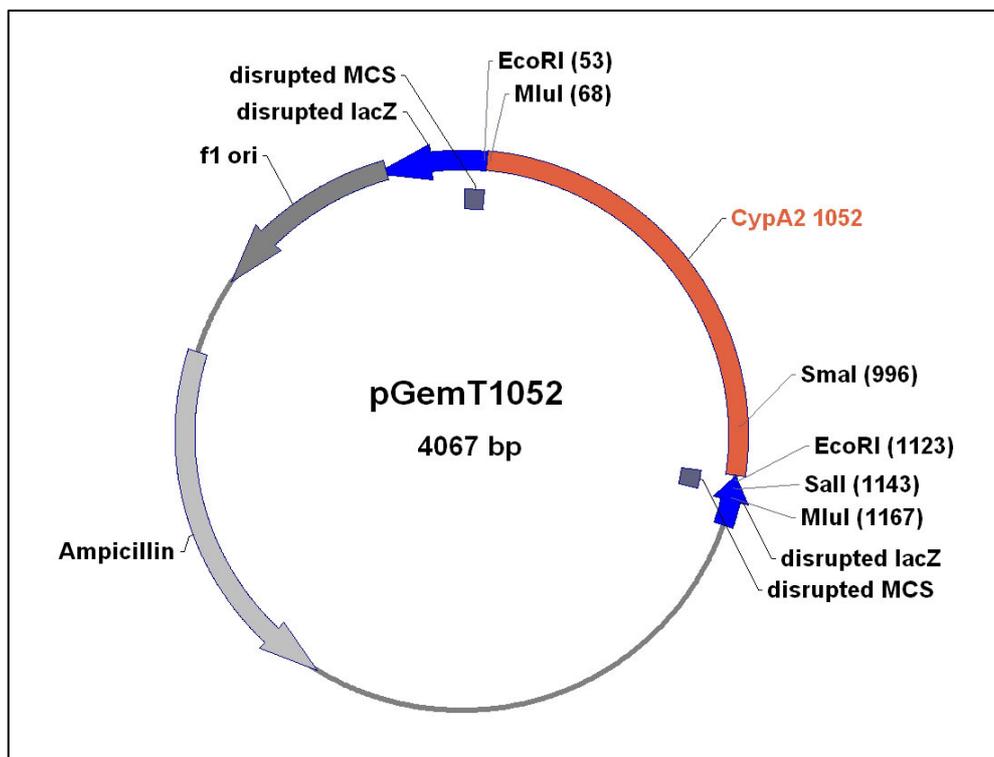
7.1.6.3 pUC $\Delta$ CypA1(III)Abb. 7.10: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA1

## 7.1.7 Plasmide zu CypA2 – Strategie II

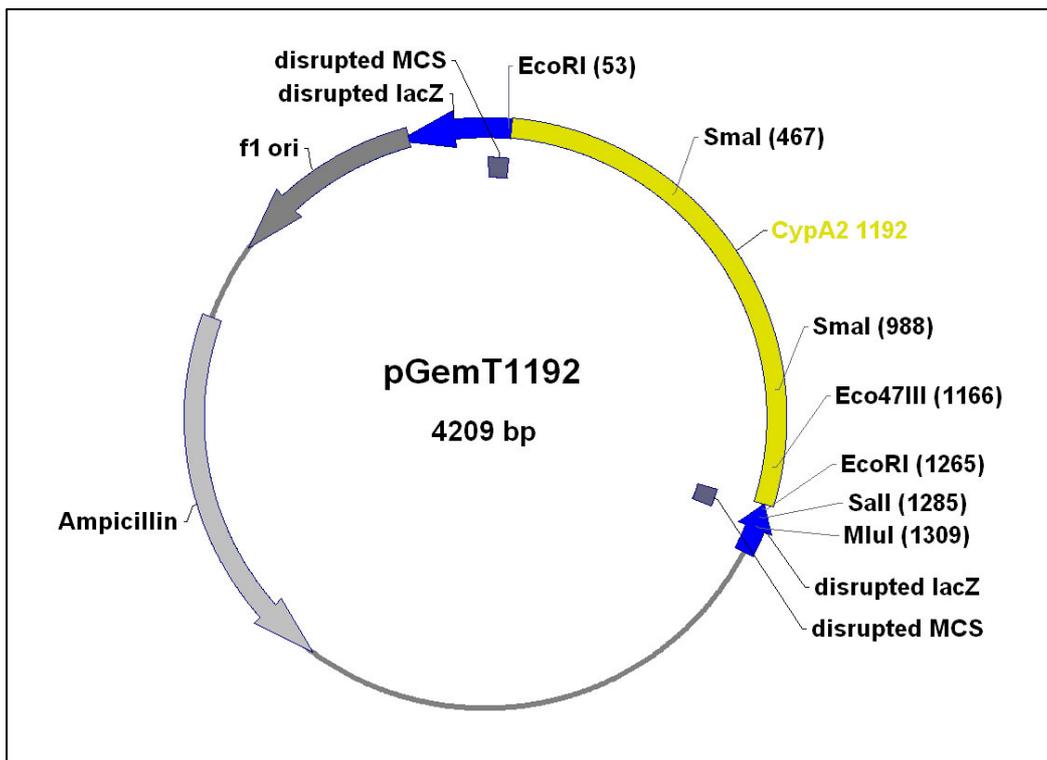
## 7.1.7.1 pGemT442

Abb. 7.11: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA2

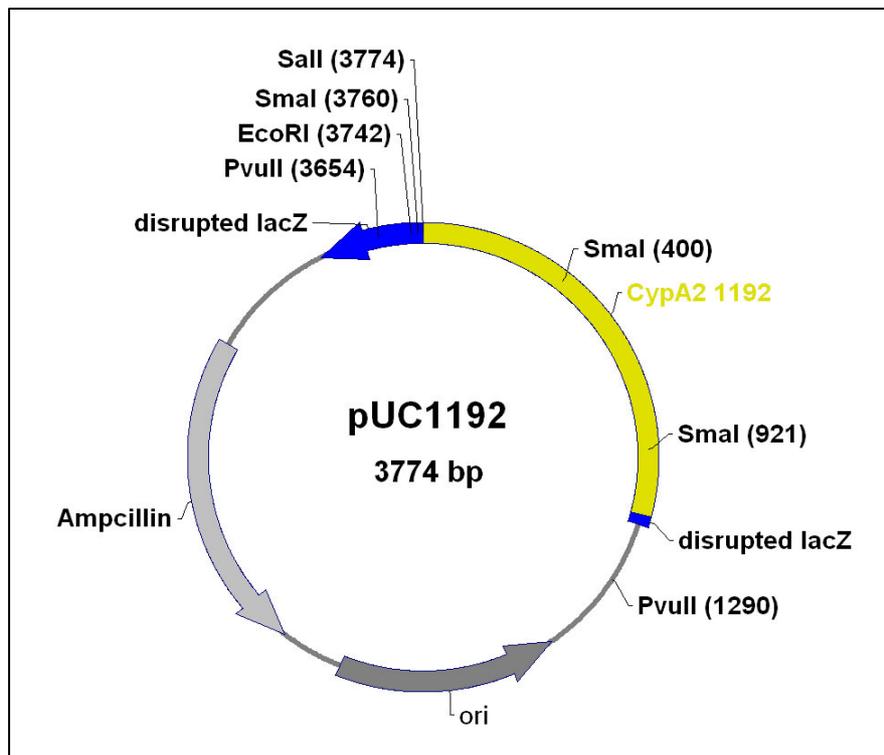
## 7.1.7.2 pGemT1052

Abb. 7.12: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA2

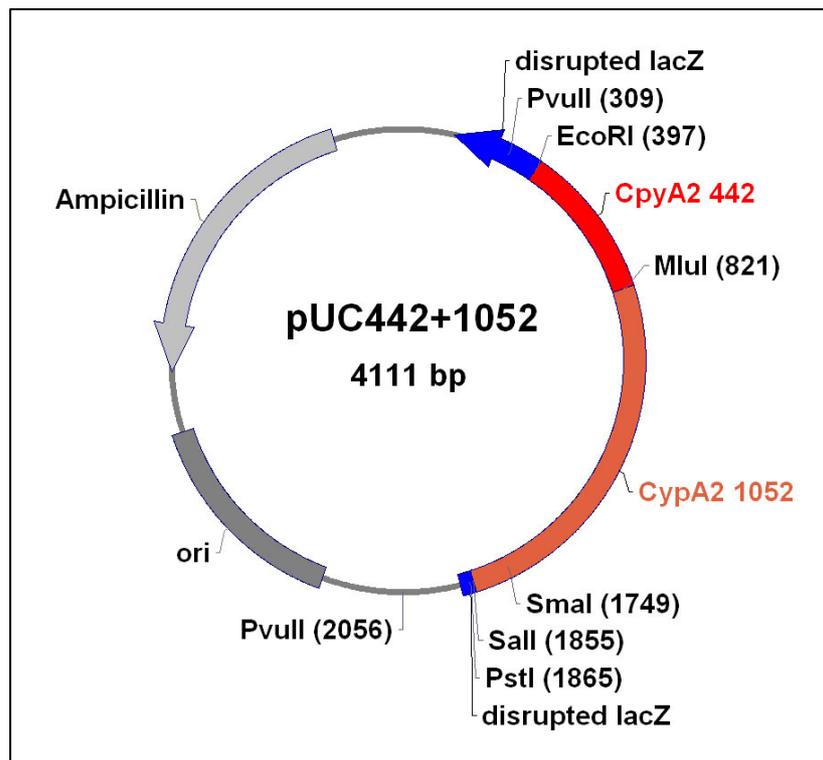
## 7.1.7.3 pGemT1192

Abb. 7.13: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA2

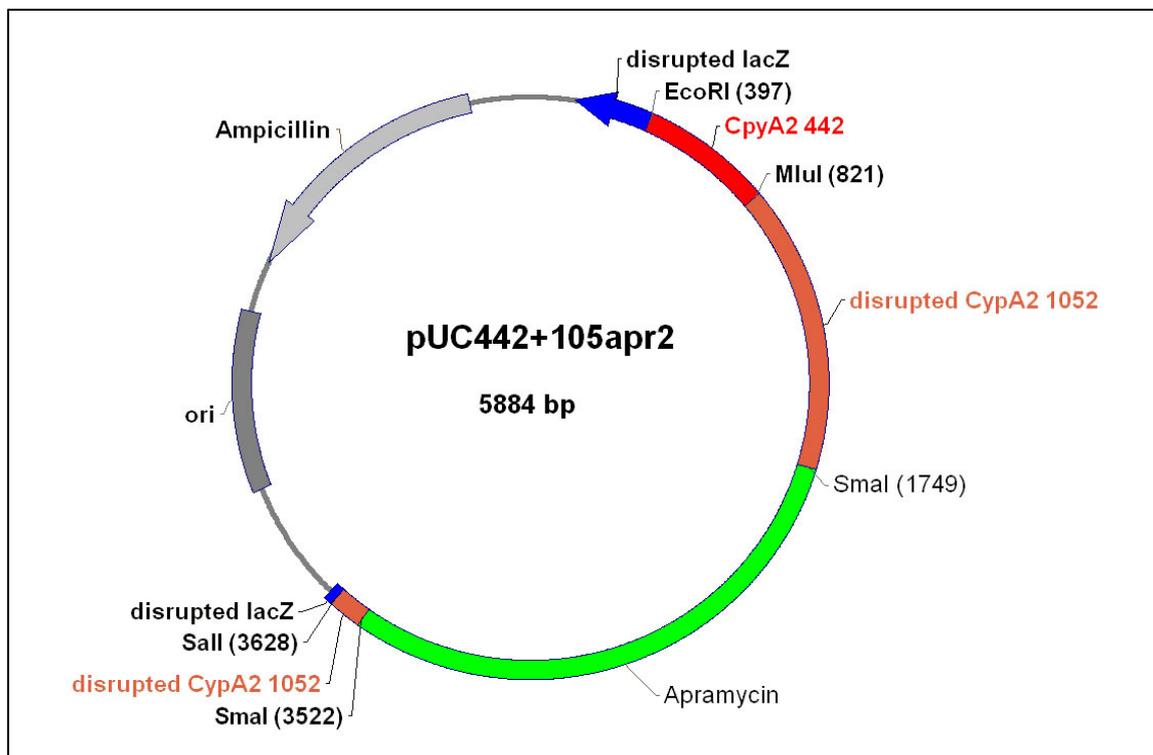
## 7.1.7.4 pUC1192

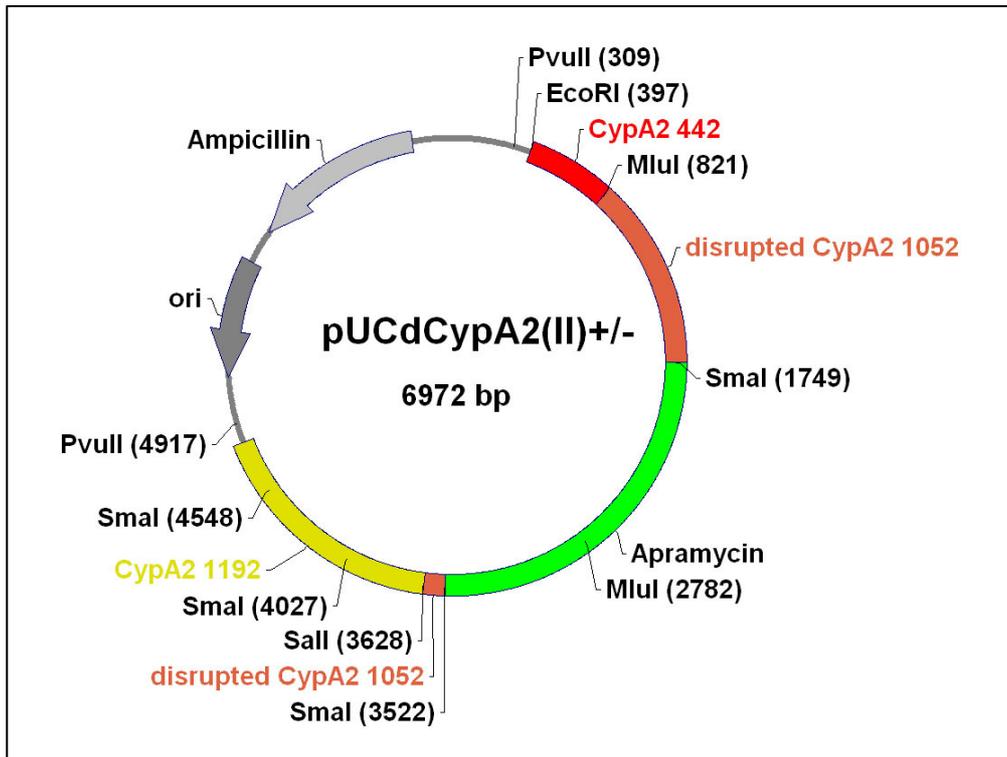
Abb. 7.14: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA2

## 7.1.7.5 pUC442+1052

Abb. 7.15: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA2

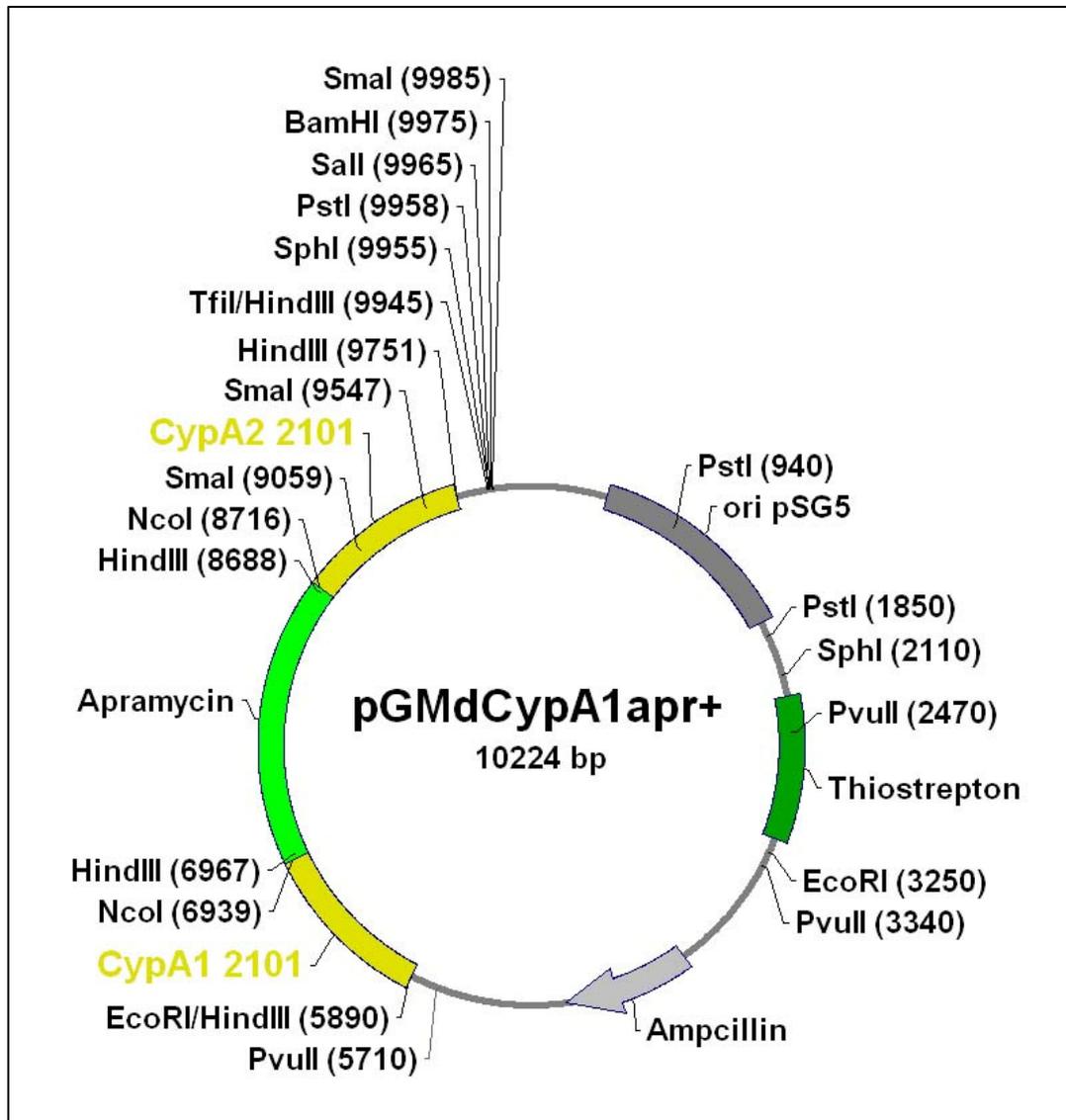
## 7.1.7.6 pUC442+105apr2

Abb. 7.16: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA2

7.1.7.7 pUC $\Delta$ CypA2(II)Abb. 7.17: Plasmid zur Klonierung der Knockout-Mutante  $\Delta$ CypA2

## 7.1.8 Knockout-Konstrukt in pGM160

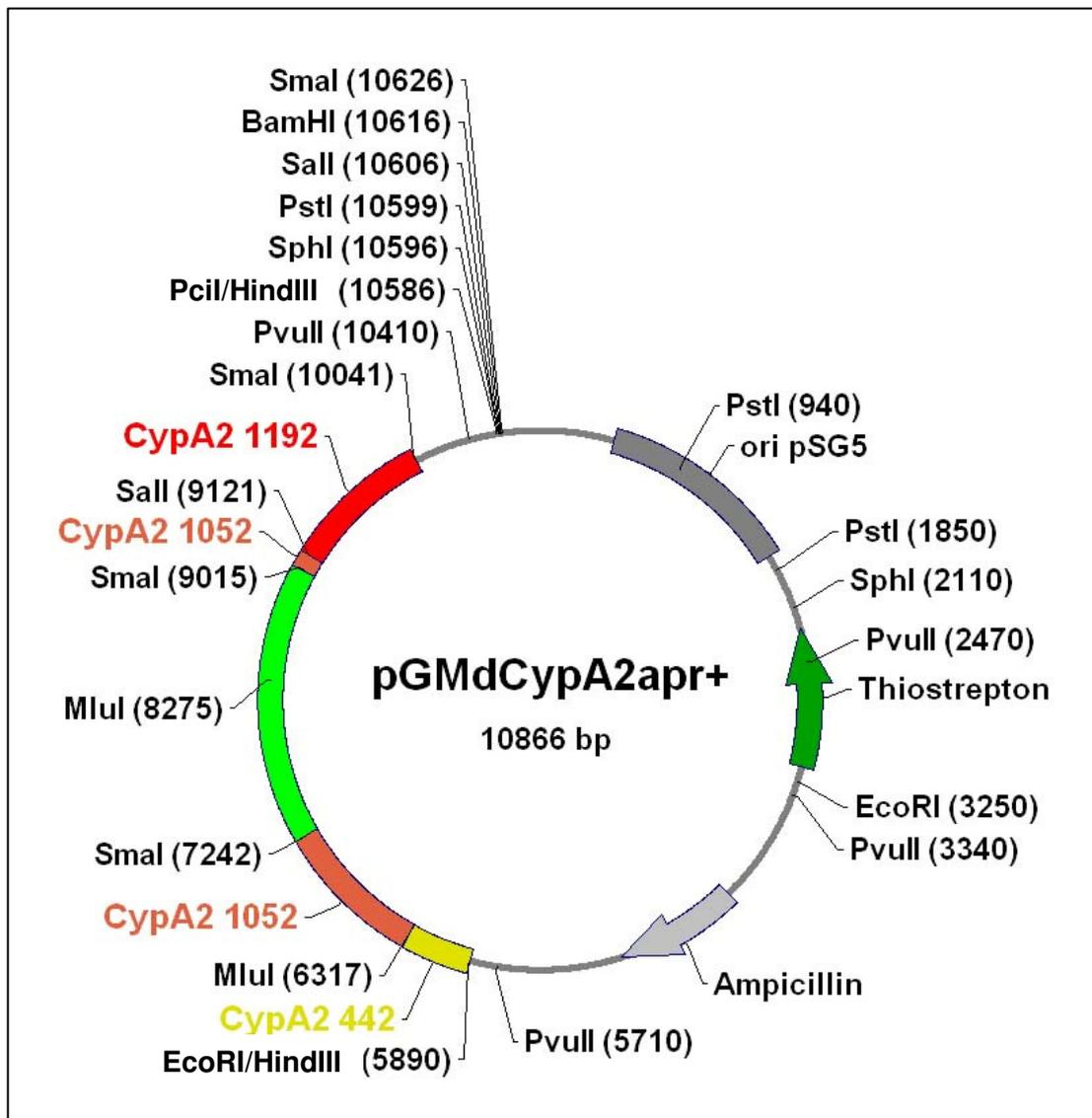
## 7.1.8.1 pGMΔCypA1



**Abb. 7.18: Shuttle-Vektor pGMΔCypA1apr+ zur Transformation in *Streptomyces lividans* und zur homologen Rekombination**

Die Klonierungsstellen Tfi/HindIII bzw. EcoRI/HindIII sind zur Orientierung in die Karte eingetragen. Das ΔCypA1-Fragmente wurde mit TfiI und EcoRI geschnitten. Die Schnittstellen wurden mittels blunt ending zu stumpfen Enden manipuliert und in der Ligation mit dem HindIII geschnittenen pGM160-Vektor ligiert. Hier waren ebenfalls die HindIII-Schnittstellen einem blunt-ending unterzogen.

## 7.1.8.2 pGMΔCypA2



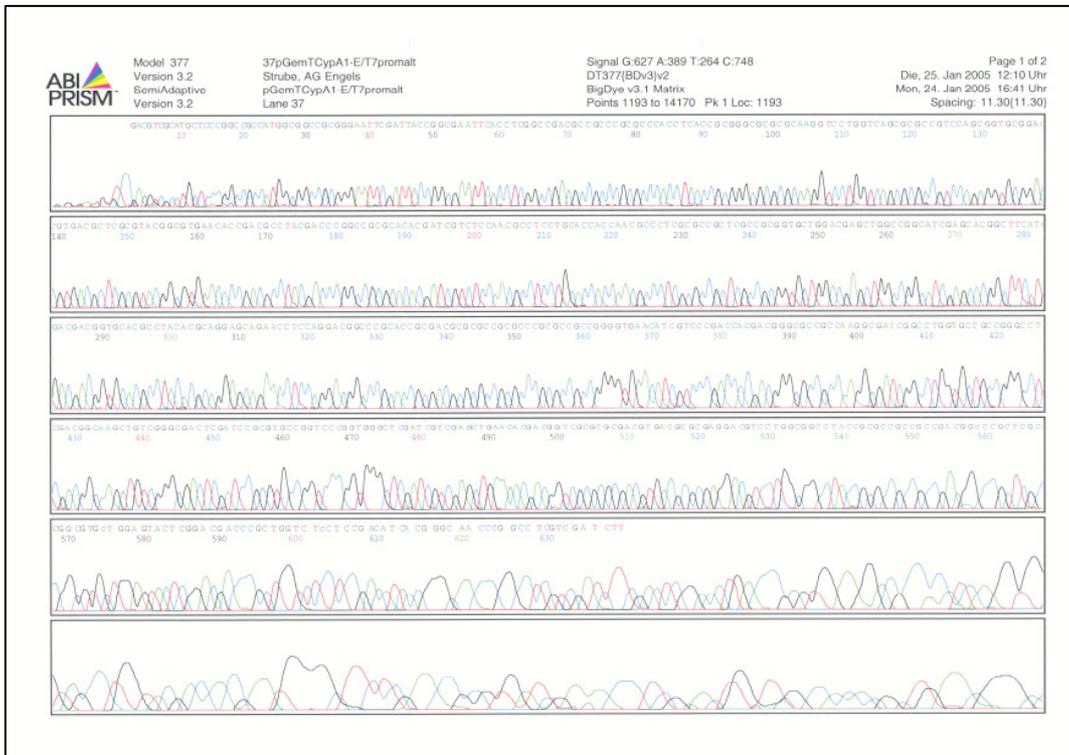
**Abb. 7.19: Shuttle-Vektor pGMΔCypA2apr+ zur Transformation in *Streptomyces lividans* und zur homologen Rekombination**

Die Klonierungsstellen EcoRI/HindIII bzw. PciI/HindIII sind zur Orientierung in die Karte eingetragen. Das ΔCypA2-Fragmente wurde mit EcoRI und PciI geschnitten. Die Schnittstellen wurden mittels blunt ending zu stumpfen Enden manipuliert und in der Ligation mit dem HindIII geschnittenen pGM160-Vektor ligiert. Hier waren ebenfalls die HindIII-Schnittstellen einem blunt-ending unterzogen.

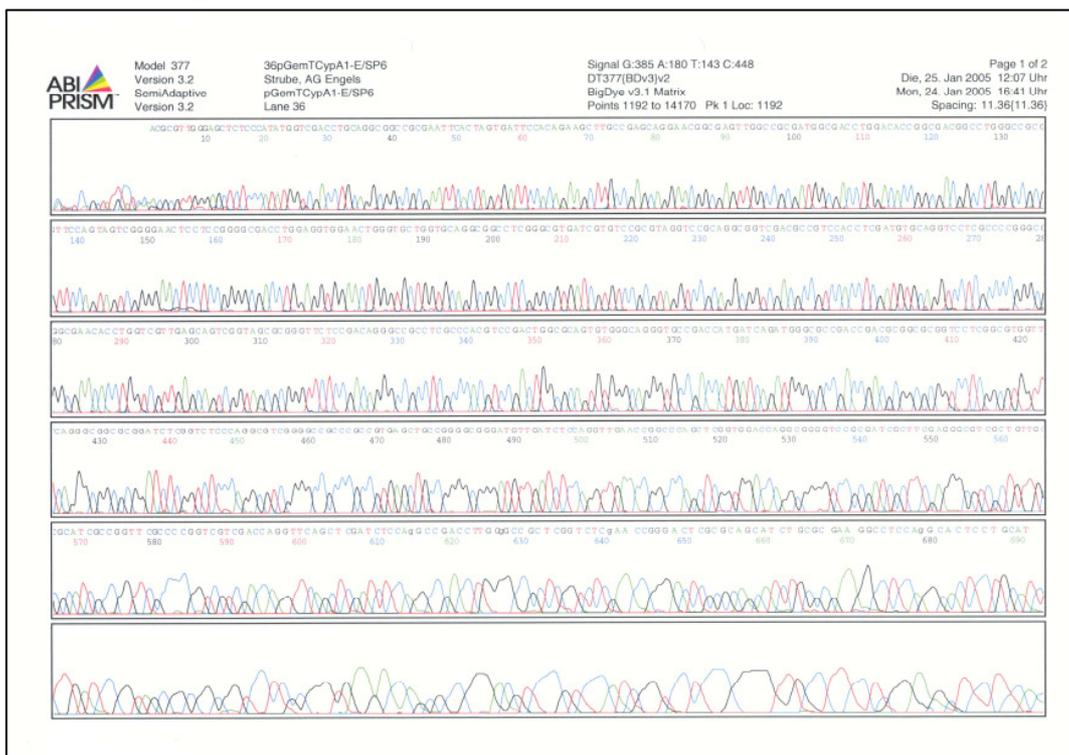
## 7.2 ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNG

### 7.2.1 CYP1A1

#### 7.2.1.1 pGemTCypA1 forward



#### 7.2.1.2 pGemTCypA1 reverse









## VIII. ABKÜRZUNGEN

aa	Aminosäure ( <i>aminoacid</i> )
A. dem.	Demineralisiertes Wasser
A. dest.	Destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
amp	Ampicillin
apr	Apramycin
APS	Amoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
°C	Grad Celsius
Cyp	Cyclophilin
d	Tag(e)
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddATP	2'-3'-Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	2'-3'-Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	2'-3'-Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	2'-3'-Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyriobnukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure

---

ESI	<i>electrospray ionisation</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high pressure liquid chromatography</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktosid
k	kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
KOAc	Kaliumacetat
<i>lacZ</i>	$\beta$ -Galaktosidasegen
LB	Laura-Bertani-Medium
M	molar
min	Minute(n)
mM	millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. chrysomallus</i>	<i>Streptomyces chrysomallus</i>
<i>S.coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>

<i>S. lividans</i>	<i>Streptomyces lividans</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	Sekunde(n)
ssDNA	single-stranded DNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TES	2-(Tris-(hydroxymethyl)-methylamino))-ethansulfonsäure
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
tsr	Thiostrepton
U	Unit = Enzymeinheit
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
YEME	Yeast Extract Malt Extract

## Lebenslauf

Katharina Strube, geb. Aumüller  
geboren am 29.05.1976 in Frankfurt/M.  
verheiratet, einen Sohn

### Universitäre Ausbildung

- Seit Okt. 2005 Vorklinisches Studium der Medizin an der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main
- Seit Nov. 2001 Promotion am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. W. Engels mit dem Thema: »Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen in *Streptomyces lividans* Herstellung von Knockout-Mutanten der Cyclophiline A1 und A2 durch homologe Rekombination«
- Mai 2001 Studienabschluss Biochemie
- Okt. 2000 – Mai 2001 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. W. Engels mit dem Thema: »Darstellung von Fluorbenzol- und Fluorbenzimidazol-5'-triphosphaten und Versuche zu deren enzymatischen Einbau in Oligonukleotide«
- Okt. 1998 – Sept. 2000 Hauptstudium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main
- Okt. 1998 Vordiplom Biochemie
- Okt. 1996 – Sept. 1998 Grundstudium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main

### Schulische Ausbildung

- 1987 – 1996 St. Angela Schule, Königstein mit Abschluss Abitur
- 1983 – 1987 Grundschule in den Sindlinger Wiesen, Kelkheim

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Glashütten, den 10. Oktober 2007

.....  
(Katharina Strube)