

**Molekulare Regulation des  
Steroidstoffwechsels in *Comamonas*  
*testosteroni***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
André Göhler  
Kiel, 2010

Referent: Prof. Dr. Edmund Maser

Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Schulz

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2010

Zum Druck genehmigt: 21. Januar 2011

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Für Elfriede und William Wunsch

## Zusammenfassung

Steroide sind ubiquitäre Substanzen, erfüllen verschiedene Funktionen und sind in den Domänen der Eukaryota und Bacteria zu finden. Hier regulieren sie als Hormone Entwicklungsprozesse und sorgen als integrale Membranbestandteile für Zell-Stabilität. Durch Ausscheidungen oder industrielle Prozesse können Steroide in die Umwelt gelangen und Organismen und Ökosysteme nachhaltig in ihrer Entwicklung beeinflussen.

Einige Bakterien unterschiedlicher Phyla können Steroide als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Das Steroidgerüst wird vor allem durch Isolate der Actinobakterien aber auch von  $\gamma$ - und  $\beta$ -Proteobakterien metabolisiert. Das zu letzteren zählende Bakterium *Comamonas testosteroni* metabolisiert das Steroid Testosteron über den 9,10-Secosteroidweg und wird als Modellorganismus für den bakteriellen Steroidabbau gesehen. Die am Abbauweg beteiligten Enzyme wurden für *C. testosteroni* bereits beschrieben. Bislang wurde jedoch kein umfassender Mechanismus der Steroidregulation in *C. testosteroni* oder anderen Bakterien publiziert. Einzelne Regulationsmechanismen wurden allerdings für unterschiedliche *C. testosteroni* Stämme beschrieben.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf einem kürzlich beschriebenen Faktor, TeiR, des *C. testosteroni* Typstammes ATCC11996. Dieses als Regulator beschriebene Protein kontrolliert mindestens drei Gene im Steroidmetabolismus in ihrer Expression (Pruneda-Paz et al. 2004b). TeiR<sup>-</sup> Mutanten von *C. testosteroni* ATCC11996 waren zudem nicht mehr in der Lage, Testosteron als Kohlenstoffquelle und chemotaktisches Signalmolekül zu nutzen (Gohler et al. 2008; Pruneda-Paz et al. 2004b). Homologe von TeiR konnten auch in anderen Stämmen von *C. testosteroni* identifiziert werden (Horinouchi et al. 2004; Ma et al. 2009; Schleheck et al. 2004). Die Einbettung von TeiR in das Regulationsnetzwerk, dessen Mechanismus und Funktion soll Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen sein.

In Zellen von *C. testosteroni* ATCC11996 wies TeiR eine polare Lokalisation auf, wie sie für Chemotaxisproteine beschrieben wird (Bardy and Maddock 2005; Sourjik and Berg 2000). Auch in *E. coli* Zellen konnte die Membranständigkeit nachgewiesen werden, die durch den N-Terminus von TeiR kodiert wird. Im zentralen Teil des Proteins konnte eine 20 Aminosäuren umfassende, hydrophobe Region beschrieben werden, die für die Bindung von Testosteron verantwortlich ist. An diese schließt sich eine PAS-Domäne an. Es wurde dargelegt, dass dieser Bereich für die Funktionalität essentiell ist. Am C-Terminus von TeiR wurde ein Helix-Turn-Helix Motiv identifiziert (Pruneda-Paz et al. 2004b). Dieses Motiv ist ebenfalls für die Aktivität von TeiR nötig. Weiterhin erfolgte eine Analyse des Mechanismus der Signaltransduktion von TeiR. Es zeigte sich, dass eine GTP-abhängige

Phosphatgruppenübertragung an einem Histidin, wahrscheinlich im C-Terminus von TeiR, an der Signalübertragung beteiligt ist. Weiterhin beeinflusste der Wachstumsstatus der verwendeten Bakterienkultur die TeiR-Aktivität. Auch weitere am Testosteron- und Androsteronabbau beteiligte Enzyme und Regulatoren zeigten sich durch RT-PCR Experimente abhängig von TeiR und/oder Steroid. Die Untersuchung von *teiR*-überexprimierenden Zellen vervollständigte das Bild des „Steroid-Master-Regulators“ TeiR. Erste Untersuchungen an *C. testosteronei* KF-1 zeigten auch hier die Unabdingbarkeit von TeiR in der Metabolisierung von Testosteron. Durch Analyse der Sequenzdaten konnten weiterhin die Gene der Enzyme des 9,10-Secosteroidweges gefunden werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass *C. testosteronei* KF-1 Testosteron über den 9,10-Secosteroidweg verstoffwechselt.

Mit TeiR konnte der Master-Regulator des Steroidstoffwechsels in *C. testosteronei* näher charakterisiert werden. Sowohl der Mechanismus als auch die Effekte von TeiR in unterschiedlichen Ebenen konnten aufgedeckt werden. Somit trägt diese Arbeit maßgeblich zum Verständnis der Regulation des Steroidstoffwechsels in Bakterien bei.

## Abstract

Steroids are ubiquitous substances and could fulfill different functions in nature. They are able to direct developmental processes and stabilize membranes in eukaryotic and bacterial species. But steroid contaminations of the environment could lead to sustainable impact to organisms and ecosystems.

Some bacterial species are able to use steroids as a source for carbon and energy. These isolates are mostly found within the actinobacteria,  $\gamma$ - and  $\beta$ -proteobacteria. *Comamonas testosteroni*, a member of the  $\beta$ -proteobacteria, degrades the steroid testosterone via the 9, 10-secosteroid-pathway. The main enzymes of the degradation pathway of the model-organism were unrevealed in the first decade of the 21<sup>st</sup> century. There is a need of regulation-systems, since these enzymes are only present when a sufficient steroid source is available. But these regulation schemes remain still obscure. Previous investigations lead to the description of a regulation model for the *hsdA* gene. This gene codes for the 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreductase, which is, in turn induced through testosterone and repressed through the activity of two repressors, RepA and RepB (Xiong et al. 2001; Xiong et al. 2003c). In 2004 an additional factor, called TeiR (for **t**estosterone **i**nducible **R**egulator) was postulated (Pruneda-Paz et al. 2004b).

The aim of this thesis is to enlighten the mechanism and effects of the TeiR protein within *C. testosteroni*. Localization studies displayed a membrane association of the protein in *Escherichia coli* and *C. testosteroni*. Whereas in *E. coli* the N-terminal amino acids coded for subcellular distribution, a further factor is needed in *C. testosteroni* to obtain polar clustering of TeiR. 20 amino acids in the centre of the TeiR-Protein are needed to bind testosterone, which is acting as a signaling molecule. The importance of the central TeiR region, following the testosterone-binding region, was shown, as well as the need for the C-terminus. Also this part has to be intact to maintain the functionality of the steroid perception and signaling chain. Furthermore, a GTP dependent phosphorelay with an embedded histidine-residue was discovered and linked to the TeiR-protein. It was also pointed out that the growth phase and/or the nutrition state of the bacterial culture have an effect on TeiR activity. A RT-PCR approach elucidates that genes for steroid degradation and regulators are involved in the TeiR-dependent signaling process. Also without steroid available, *teiR*-overexpressing *C. testosteroni* cells were capable to produce a different protein profile. This intensifies the suggestion that TeiR is the master regulator in testosterone and even steroid signaling-pathways. Besides the type-strain ATCC11996, the *C. testosteroni* strain KF-1 was analyzed. The known genes for the 9, 10 secosteroid-pathway could be identified within the published DNA-sequence. In addition, the ability to lower the testosterone-concentration in liquid culture was linked to the integrity of the *teiR* reading frame.

TeiR as the master regulator of testosterone-degradation was characterized within this thesis. The integration of TeiR-mediated regulation processes and effects into the regulation-network leads to a more complex view of steroid degradation in bacteria.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Abstract.....	iii
Abkürzungen.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Steroide.....	1
1.1.1 Struktur.....	1
1.1.2 Synthese.....	2
1.1.3 Sterole.....	3
1.1.4 Steroidhormone.....	3
1.1.5 Weitere Steroidverbindungen.....	5
1.1.6 Eintrag in die Umwelt.....	6
1.1.7 Wirkung in der Umwelt.....	6
1.2 Phylogenie des Steroidabbaues.....	7
1.2.1 Firmicutes und Bacterioides.....	7
1.2.2 Actinobacteria.....	8
1.2.3 Proteobacteria.....	8
1.2.4 Der Genus <i>Comamonas</i> .....	9
1.2.5 <i>Comamonas testosteroni</i> .....	11
1.3 Bakterieller aerober Abbau von Steroiden.....	12
1.3.1 Steroidmetabolismus in <i>C. testosteroni</i> .....	12
1.3.2 Steroidtransfer in die Zelle.....	12
1.3.2.1 Testosteronabbau.....	14
1.3.3 Regulation des Steroidstoffwechsels in <i>C. testosteroni</i> .....	16
1.3.4 TeiR.....	18
1.4 Ziel der Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Bakterienstämme.....	20
2.2 Primer.....	20
2.3 Plasmide.....	24
2.4 Chemikalien.....	25
2.5 Nährmedien.....	26
2.6 Enzyme und Kits.....	26
2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
2.8 Herstellung der Plasmide.....	27
2.8.1 pBB16teiR.....	27
2.8.2 petB-I, petB-II und petN772.....	27
2.8.3 pKteiRA, pKteiRB, pKteiRC.....	28
2.8.4 pKteiR567, pKteiR627 und pKteiR $\Delta\psi$ .....	28



2.8.5	pKteiR846, pKteiR846:936, pKteiR846:888, pKteiR888, pKteiR888:936 und pKteiR888KL .....	28
2.8.6	pKN5teiR, pKN8teiR und ptacN5-GFP .....	28
2.8.7	pBBtacIII und pBBtacIV .....	29
2.8.8	pJet-150GFP und pK-150GFP .....	29
2.8.9	pBBtacOrf5315 und pBBtacOrf5348.....	29
2.8.10	pMCS1-PD1500CFP .....	29
2.9	Transformation .....	30
2.9.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	30
2.9.2	Transformation von <i>C. testosteroni</i> .....	30
2.10	Plasmidpräparation .....	31
2.10.1	Plasmid-Mini Präparation .....	31
2.10.2	Plasmid-Midi Präparation .....	31
2.11	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	31
2.12	Proteinisolierung .....	32
2.12.1	Cytosolische Proteine.....	32
2.12.2	Isolierung von Membranassoziierten Proteinen .....	32
2.12.3	Überexpression .....	32
2.13	Agarosegelelektrophorese.....	33
2.14	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	33
2.15	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) .....	33
2.16	Testosteronbindeassay .....	34
2.17	Kinaseassay .....	35
2.18	RT-PCR und semiquantitative PCR.....	36
2.19	Solution Based Sandwich Hybridization (SBSH) .....	38
2.20	2D-Gelelektrophorese .....	39
2.21	HPLC .....	40
2.22	Mikroskopie .....	40
2.23	Bioinformatische Analysen .....	40
3	Ergebnisse .....	41
3.1	Untersuchungen des TeiR-Proteins.....	41
3.1.1	Membranlokalisation von TeiR .....	41
3.1.1.1	Verteilung von TeiR in <i>E.coli</i> .....	41
3.1.1.2	TeiR Lokalisation in <i>C. testosteroni</i> ATCC11996.....	44
3.1.2	Testosteronbindung und Bindemotive .....	45
3.1.3	Kinasefunktion von TeiR .....	49
3.2	TeiR-Aktivität.....	51
3.3	Analyse putativer TeiR-abhängiger Transkripte.....	55
3.4	Transkriptionseinheiten von <i>teiR</i> , <i>tesB</i> und <i>hsdA</i> .....	68
3.5	Analyse des Proteoms unter TeiR Einfluss.....	70

3.6	Weitere Faktoren.....	72
3.6.1	Weitere involvierte regulatorische Proteine .....	72
3.6.2	Mögliche weitere Faktoren .....	73
3.7	Untersuchung an <i>C. testosteroni</i> KF-1.....	76
3.7.1	Genomanalyse von <i>C. testosteroni</i> KF-1 .....	76
3.7.2	Biochemische Analyse von <i>C. testosteroni</i> KF-1 .....	79
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	81
4	Diskussion.....	82
4.1	Lokalisation von TeiR .....	82
4.2	Testosteronbindung.....	84
4.3	Kinasefunktion von TeiR .....	85
4.4	Funktion von TeiR .....	86
4.5	TeiR Abhängige Transkripte.....	88
4.6	Analyse des Proteoms unter TeiR Einfluss.....	91
4.7	Weitere Faktoren.....	91
4.8	<i>C. testosteroni</i> KF-1 .....	92
5	Resümee.....	94
6	Referenzen.....	96
7	Publikationen.....	106
	Danksagung .....	107
	Wissenschaftlicher Werdegang .....	108
	Erklärung.....	110

# Abbildungen

Abbildung 1 Struktur der Steroide .....	1
Abbildung 2 Schematische Übersicht der Steroidsynthese .....	2
Abbildung 3 Strukturen ausgewählter Steroide .....	4
Abbildung 4 Schema des Testosteronabbau in <i>C. testosteronei</i> .....	14
Abbildung 5 Schematisches Übersicht des <i>hsdA</i> Regulon .....	17
Abbildung 6 Wasch-Apparatur.....	35
Abbildung 7 TeiR Menge im Cytoplasma von <i>E. coli</i> HB101 .....	43
Abbildung 8 GFP-Fluoreszenz der TeiR-GFP Konstrukte .....	44
Abbildung 9 Fluoreszenzmikroskopie von <i>C. testosteronei</i> pMCS1-PD1500CFP .....	45
Abbildung 10 Phylogenetischer Analyse der hydrophoben Region von TeiR.....	48
Abbildung 11 TeiR als Histidinkinase .....	50
Abbildung 12 Ergebnisse des Aktivitätstests der TeiR-Mutanten .....	52
Abbildung 13 Ergebnisse des Aktivitätstest der TeiR-Mutanten .....	53
Abbildung 14 Analyse der <i>hsdA</i> Induzierbarkeit in <i>C. testosteronei</i> -Mutanten .....	54
Abbildung 15 Anordnung und Orientierung der Gene zur Steroiddegradation und Regulation.....	56
Abbildung 16 Expressionsanalyse von <i>hsdA</i> (3 $\alpha$ HSD/CR).....	57
Abbildung 18 Expressionsanalyse von <i>tesH</i> (3-Ketosteroid- $\Delta$ 1-Dehydrogenase).....	58
Abbildung 19 SBSH <i>tesH</i> mRNA.....	60
Abbildung 19 Expressionsanalyse von <i>tesB</i> (2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-Dioxygenase).....	61
Abbildung 20 Expressionsanalyse von <i>teiR</i> (Testosteron inducible Regulator).....	62
Abbildung 21 Expressionsanalyse von <i>actA</i> (Testosteron abhängiger Aktivator von <i>hsdA</i> ) .....	64
Abbildung 22 Expressionsanalyse von <i>lysR</i> (LysR-Typ-Regulator).....	65
Abbildung 23 Wachstumskurve und Testosterongehalt.....	66
Abbildung 24 Wachstumskurve und 1,4-Androstadien-3,17-dion Gehalt .....	67
Abbildung 26 Analyse der <i>teiR</i> Transkriptionseinheit.....	68
Abbildung 27 Analyse der <i>hsdA</i> Transkriptionseinheit.....	69
Abbildung 28 Analyse der <i>tesB</i> Transkriptionseinheit.....	70
Abbildung 28 2D-Page Fusionsgel der Fusionierten Zustandsgele .....	71
Abbildung 29 Aktivität von Orf5315 und Orf5348 .....	72
Abbildung 30 Testosterondegradation von <i>C. testosteronei</i> ATCC11996 .....	74
Abbildung 31 <i>hsdA</i> Reporter Assay .....	75
Abbildung 32 Schematische Darstellung der Gencluster in <i>C. testosteronei</i> KF-1 .....	78
Abbildung 33 Testosteronkonzentration verschiedener <i>C. testosteronei</i> Stämme. ....	79
Abbildung 34 Vergleich <i>hsdA</i> Expression von <i>C. testosteronei</i> ATCC11996 und <i>C. testosteronei</i> KF-1 .	80

## Tabellen

Tabelle 1 Bakterienstämme des Genus <i>Comamonas</i> .....	10
Tabelle 2 Isolationen von <i>C. testosteroni</i> .....	11
Tabelle 3 Bakterienstämme.....	20
Tabelle 4 Primer und Oligonukleotide .....	21
Tabelle 5 Plasmide .....	24
Tabelle 6 PCR-Characterisika der semiquantitativen PCR.....	37
Tabelle 7 Analyse der TeiR-Lokalisation mittels ELISA .....	41
Tabelle 8 relative <sup>3</sup> H-Testosteron Bindung von TeiR .....	46
Tabelle 9 Auflistung der putativen Steroid-Abbau und Regulationsproteine in <i>C. testosteroni</i> KF-1....	76

## Abkürzungen

aa	„amino-acid“ / Aminosäure
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AK	Antikörper
Amp	Ampicillinresistenz
Ap	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BLAST	„Basic local alignment tool“
BSA	„bovine serum albumine“ / Rinderserumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
<i>C. testosteroni</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>
Ca.	Circa
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat
cm	Zentimeter
D	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	„desoxyribonucleicacid“ / Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“ / Enzym-gekoppelter Immunosorbent Assay
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gravitationsbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
3 $\alpha$ -HSD/CR	3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase
HRP	„Horseradish-Peroxidase“ / Meerrettichperoxidase
HTH	Helix-turn-Helix
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPP	Isopentenylpyrophosphat
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Milliamper
mV	Millivolt

min	Minute
NAD(H)	(reduziertes) Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP(H)	(reduziertes) Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600nm Wellenlänge
Orf	„Open reading Frame“, Leserahmen
nm	Nanometer
PAS	Per-Arnt-Sim
PBS	„phosphate buffered saline“ / Phosphat, NaCl-Puffer
PEP	Phosphoenolpyruvat
PCR	„polymerase-chain-reaction“ / Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkriptase - PCR
rpm	Umdrehungen in der Minute
SBSH	„solution based sandwich hybridization“ / Sandwich-Hybridisierung in Lösung
SLS	„sodium lauryl sarcosinate“ / Natrium-laurylsarkosinat
TAE	Tris/HCl, Acetat, EDTA-Puffer
TCS	„two component system“ / Zweikomponenten System
TE	Tris/HCl, EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit/Einheit
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Steroide

Der Name Steroide leitet sich vom griechischen [στερεό] stereó, dem Festen, Starren oder Soliden ab. Steroide sind isoprenoide Substanzen, welche in den Domänen Bacteria und Eukaryota zu finden sind. Als gemeinsames Strukturmerkmal besitzen sie das Steran (Cyclopentanoperhydrophenanthren) bzw. Gonan (siehe Abbildung 1).

### 1.1.1 Struktur

Die Grundstruktur der Steroide besteht aus vier Kohlenstoffringen, bei denen die Ringe B und C sowie C und D jeweils in *trans* verknüpft sind. Die Ringe A und B können, wie bei den Gallensäuren in *cis* oder in *trans* angeordnet sein. Als Bezugspunkt für die Bezeichnung wird die Methylgruppe verwendet, welche sich am Kohlenstoffatom C-13 befindet. Substituenten, welche sich oberhalb der Ringebene befinden, werden als  $\beta$ -ständig bezeichnet. Je nach Verknüpfung der Ringsysteme kann zwischen der  $5\alpha$ -Reihe (alle Ringe in *trans* Verknüpft) und der  $5\beta$ -Reihe (Ring A und B in *cis*, sowohl B und C als auch C und D in *trans* Verknüpft) unterschieden werden.

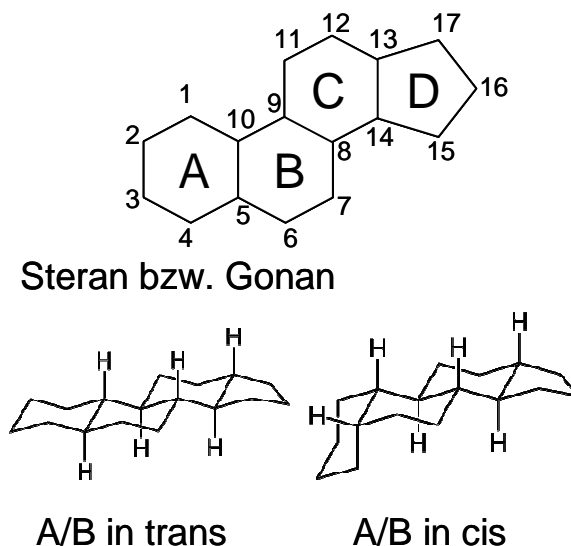


Abbildung 1 Struktur der Steroide; Steran: beliebige Stereochemie, Gonan: Ringe B/C und C/D in *trans*

Weiterhin unterscheiden sich die Steroide sowohl in Position und Anzahl der Doppelbindungen als auch in Anzahl und Art der Substituenten. Doppelbindungen in den Ringen A und B können zu einer planaren Struktur führen. Funktionelle Gruppen am Ringsystem befinden sich vorrangig an Position 3, 10, 13 und 17, wobei am C-10 und C-13

zumeist Methylgruppen anzutreffen sind. Die starre und unpolare Natur verleiht den Steroiden ihre hydrophobe Eigenschaft.

### 1.1.2 Synthese

Biochemisch werden Steroide ausgehend von Isopren bzw. dem Isopentenylpyrophosphat synthetisiert. Allerdings müssen Insekten das Sterangerüst mit der Nahrung aufnehmen, da sie dieses nicht selbst synthetisieren können (Heftmann 1975). Aus sechs Isopreneinheiten entsteht das Squalen mit 30 Kohlenstoffatomen. Bei Zoobiota und Mycota tritt Lanosterin als weiteres Zwischenprodukt auf. Durch Demethylierungen und Hydrierungs-/Dehydrierungsschritte entsteht das Cholesterol, welches als Ausgangspunkt für weitere Steroide gesehen werden kann (Abbildung 2).

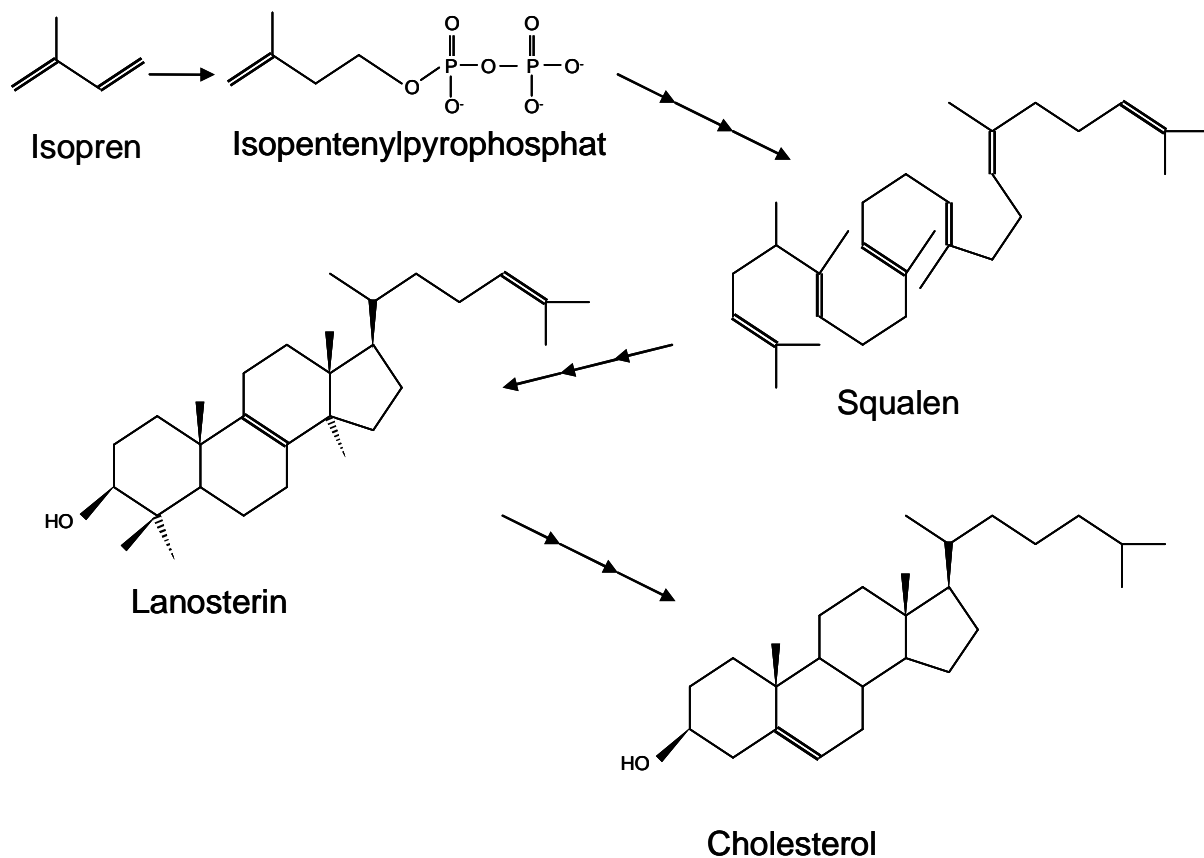


Abbildung 2 Schematische Übersicht der Steroidsynthese

Aufgrund ihrer Funktion können die Steroide in verschiedene Gruppen eingeordnet werden. Hierzu zählen die Sterole, Gallensäuren (Cholate), Steroidhormone als auch die, durch ihren nicht geschlossenen B-Ring gekennzeichneten, Vitamine. Flavonoide werden historisch und funktionell gesehen ebenfalls den Steroiden zugerechnet.



### 1.1.3 Sterole

Das Cholesterol als wohl bekanntestes Sterol gilt als wichtigstes Steroid der Vertebraten. Es wird hauptsächlich in Leber und Darmmukosa, aber auch in Nebennierenrinde und Gonaden gebildet. Cholesterol ist ein Strukturelement von Membranen aber auch Ausgangspunkt für die Synthese von Steroidhormonen, Gallensalzen und Vitamin D<sub>3</sub>. Die Ausscheidung von Cholesterol erfolgt beim Menschen über die Umwandlung zu Gallensäuren im Cytoplasma der Leberzellen. Nach der Konjugation mit Glycin oder Taurin und der Sekretion in den Darm dienen diese Konjugate unter anderem dem Verdau von Nahrungsfetten. Der Hauptteil des Cholesterols unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf und wird im Ileum wieder resorbiert. Der nicht resorbierte Teil der Konjugate wird zumeist von Darmbakterien gespalten. Diese Organismen sind auch für die Umwandlung von Cholesterol in Koprostanol im Darm verantwortlich, das mit dem Faeces ausgeschieden wird.

Neben den Zoosterolen (z.B. Cholesterol) der Tiere übernehmen die Phytosterole bei den Pflanzen analoge Aufgaben. Im Gegensatz zu den C-27 Sterolen der Tiere besitzen die Phytosterole eine oder zwei zusätzliche Methylgruppen und zumeist weitere Doppelbindungen. Verbindungen wie Stigmaterin,  $\beta$ -Sitosterin und Campesterin fungieren wie bei den tierischen Sterol-Analoga als integrale Membranbestandteile.

### 1.1.4 Steroidhormone

Für die Steuerung von Lebensprozessen sind Steroidhormone von zentraler Bedeutung. Cholesterol bildet bei den Vertebraten den Ausgangspunkt für die Synthese. Der größte Unterschied der Steroidhormone zu Cholesterol ist das Fehlen der aliphatischen Seitenkette am Kohlenstoff 17 (C-17). Nach Anzahl der Kohlenstoffatome unterscheidet man Androgene (C-19), Estrogene (C-18) und Gestagene (C-21). Die Hormone Aldosteron, Testosteron, Estradiol, Progesteron und Cortisol erfüllen bei den Säugetieren wichtige Funktionen. Ecdysteroide sind dagegen bei den Arthropoden zu finden, in denen Ecdyson beispielsweise die Häutung kontrolliert. Auch im Reich der Pflanzen konnten Steroide mit Hormoncharakter identifiziert werden. Hierzu zählen die weit verbreiteten Brassinosteroide und Curcubitacine (Li et al. 1996; Russell 1996) (Abbildung 3).

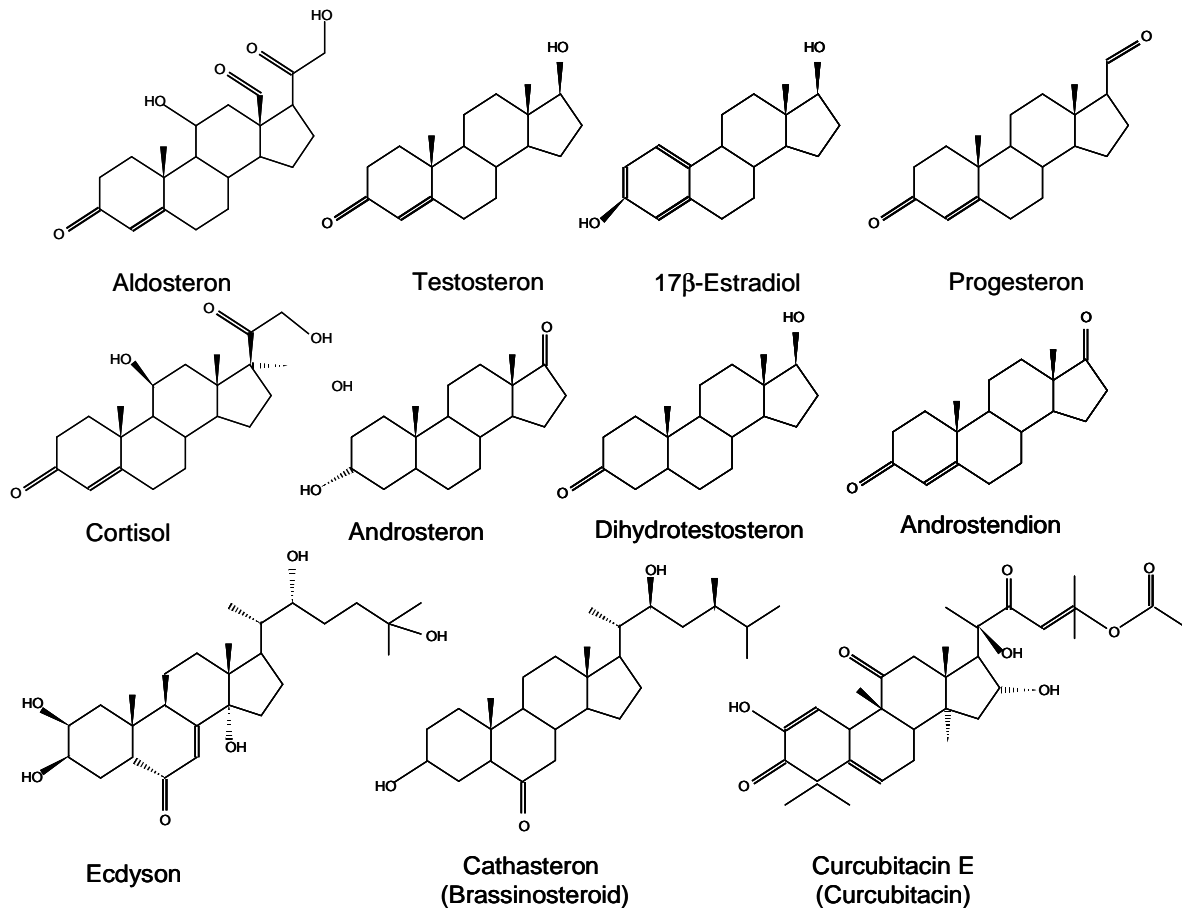


Abbildung 3 Strukturen ausgewählter Steroide

Den Androgenen liegt die Struktur des  $5\alpha$ -Androstans zugrunde. Obwohl sie auch in weiblichen Organismen vorkommen werden sie als männliche Geschlechtshormone bezeichnet, da sie hier in höheren Konzentrationen vorkommen. Zu den wichtigsten Androgenen gehören Testosteron, Androsteron, Dihydrotestosteron und Androstendion. Die erste Isolation des Testosterons erfolgte 1935 (David et al. 1935) aus Stierhoden. Die Produktion erfolgt in den Leydig'schen Zellen des Hodens. Die Ausbildung der Geschlechtsmerkmale als auch die Entwicklung von Muskulatur und Knochenbau wird durch Testosteron gesteuert. Daher wird Testosteron bzw. seine Derivate auch zum Doping eingesetzt. Im Gegensatz zum weiblichen Organismus (ca. 0,3mg/Tag), produziert ein erwachsener Mann ca. 7 mg Testosteron pro Tag. Das wichtigste Abbau- und Ausscheidungsprodukt von Testosteron ist Androsteron. Ein weiteres Abbauprodukt ist Androstendion. Dagegen stellt  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron das aktive Androgen der Prostata dar.

Im Gegensatz zu den Androgenen besitzen die Estrogene phenolische Eigenschaften, welche durch eine Sauerstoff-abhängige Aromatisierung entsteht. Dadurch wird weiterhin die Methylgruppe am Kohlenstoffatom C-10 entfernt, so dass Estrogene nur aus 18

Kohlenstoffatomen bestehen. Estrogene zeigen sich für die Entwicklung weiblicher Geschlechtsorgane und der Regulation der Menstruation verantwortlich. Das wirksamste Estrogen, 17 $\beta$ -Estradiol, wird in den Ovarien und in der Schwangerschaft auch in der Plazenta gebildet. Spurenweise enthalten auch einige Pflanzen Estron und dessen Abbauprodukt Estriol. Auch Nicht-Steroide, vor allem Pestizide, können estrogene Wirkung aufweisen und die Umwelt beeinflussen (siehe 1.1.6 und 1.1.7).

### 1.1.5 Weitere Steroidverbindungen

Neben den Steroidhormonen und den Sterolen treten in der Natur weitere Steroidverbindungen auf.

Steroide können mit Zuckern verknüpft sein, zu diesen Steroidglykosiden zählen die Cardenolide, Saponine und Alkaloide. Sie werden von verschiedenen Organismen mit unterschiedlicher Wirkung synthetisiert. So hemmt das Gift des Seesterns die Blutgerinnung. Andere Vertreter haben insektizide oder antibiotische Wirkungen (Ivanchina et al. 2001; Karlson 1983; Minale et al. 1996; Tschesche and Wulff 1965). Die Fusidinsäure des Deuteromyceten *Fusidium coccineum* wird als Steroid Antibiotikum eingesetzt.

Porifera, die als marine Biokatalysatoren gelten, sind Ursprung von vielen, teilweise sehr ungewöhnlichen, Steroiden. Diese Steroide sind in letzter Zeit, aufgrund ihrer biologischen und pharmazeutischen Wirkung, stärker in den Fokus gerückt.

Herbasterol und 19-Norherbasterol von *Dysidea herbacea* wirken ichthyotoxisch und leicht antimikrobiell, z. B. gegen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* (Capon and Faulkner 1985). Sowohl Xestobergsterol als auch Contignasterol wurden als potente Inhibitoren der Histaminfreigabe bei Anti-IgE induzierten Mastzellen der Ratte beschrieben (Aiello et al. 1999). Halistanol-Disulfat B hat enzyminhibierende Eigenschaften (Patil et al. 1996). Bei vielen weiteren Steroiden aus marinen Schwämmen wurde die *in vitro* Cytotoxizität gegenüber Krebszellen nachgewiesen (Aiello et al. 1999). Bei einigen Secosterolen, den Abbauprodukten der Steroide, konnten inhibierende Eigenschaften auf die Zellteilung gezeigt werden (Lopp et al. 1994). Neben Schwämmen wurden auch aus Hornkorallen/Gorgonien und Weichkorallen Secosteroide isoliert (Sica and Musumeci 2004). Die Vielzahl der identifizierten Substanzen wurde noch nicht weiter auf eine pharmakologische bzw. biotechnologische Anwendbarkeit untersucht.

### 1.1.6 Eintrag in die Umwelt

Steroide können abhängig von ihrer Entstehung und Wirkung auf unterschiedlichen Wegen in die Umwelt gelangen. So gelangen Cholate und konjugierte Steroidhormone in signifikanten Mengen über Faeces (Hylemon and Harder 1998) und Urin in die Umwelt. Große Ansammlungen von Säugetieren in Massentierhaltungen, aber auch in urbanen Ballungsgebieten führen zu einer erhöhten Belastung der Abwässer. So konnten Einträge von Estrogenen (Hanselman et al. 2003; Raman et al. 2004; Ternes et al. 1999) als auch von Testosteron (Lee et al. 2003) beschrieben werden. Auch Betriebe die pflanzliche Rohstoffe verarbeiten, wie etwa Papierfabriken, können zu einer Belastung des Abwassers mit Phytosterolen beitragen (Jacobsen et al. 2005). Weiterhin stellt die Metabolisierung von Steroiden, vor allem Phytosterolen eine Quelle des Eintrages dar (Jenkins et al. 2004).

Bestimmte Steroide gelten als Markersubstanzen für durch Abwasser kontaminierte marine Habitate. Koprostanol wird als ein solcher Indikator für Verunreinigungen verwendet (Readman et al. 2005). Es wird im Darm von höheren Tieren mikrobiell durch die Reduktion von Cholesterol gebildet und korreliert sehr gut mit der Anzahl coliformer Bakterien in der durch Abwasser kontaminierten Umwelt (Isobe et al. 2002). Neben Koprostanol gelten auch Ethylkoprosanol, Cholesterol, 3 $\beta$ -Ethylcholesterol und 3 $\beta$ -Ethylcholestanol als Indikatorsubstanzen für humanen Faeces (Readman et al. 2005). Auch Estron wird als Tracer für die Kontamination des Meeres verwendet (Atkinson et al. 2003; Desbrow et al. 1998). Im marinen Sediment gibt es ein Konzentrationsgefälle von Estron, ausgehend von den Stellen der Abwassereinleitung ins Meer (Atkinson et al. 2003). Estron lagert sich abhängig von der Teilchengröße im Sediment ab (Readman et al. 2005), allerdings können bereits Konzentrationen im picomolaren Bereich Einflüsse auf aquatische Organismen haben (Harries et al. 1997; Routledge et al. 1998; Schoenmakers and Dieleman 1981). Dies lässt vermuten, dass sich der Effekt von Steroiden nicht nur auf das unmittelbare Gebiet der Abwassereinleitung beschränkt.

### 1.1.7 Wirkung in der Umwelt

Steroidkontaminationen der Umwelt wirken sich zuerst auf Organismen aus, die im direkten Weg des Steroids liegen. So sind die aquatischen Habitate der erste Ort des Einflusses. Hier können schon geringe Konzentrationen, im pg/l bis ng/l Bereich, zu Effekten führen (Hanselman et al. 2003; Sumpter and Johnson 2005).

In den marinen Habitaten können die Steroide die verschiedensten Effekte auf Vertebraten und Invertebraten haben. Es wurde gezeigt, dass sich Estrogene wie Estron, 17 $\beta$ -Estradiol und 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol im aquatischen Sedimenten anreichern (Braga et al. 2005). Diese

Tatsache ist auf den nur langsam stattfindenden anaeroben Abbau zurückzuführen (Holthaus et al. 2002; Jurgens et al. 2002; Ying and Kookana 2003).

In den 1990er Jahren wurde der dramatische Einfluss von endokrin wirkenden Substanzen (EDC) auf das Ökosystem dokumentiert (Sumpter 1995). So führen Estrogene im Wasser zu einer Veränderung von männlichen Fischen und zu einer erhöhten Bildung des für weibliche Fische typischen Eidotterproteins Vitellogenin (Fricke 2009; Jobling et al. 1998; Panter et al. 1998). Weiterhin können auch Androgenkontaminationen zu einer Vermännlichung von weiblichen Fischen führen (Howell and Denton 1989; Thomas et al. 2002). Da auch die Interspezieskommunikation in einigen Fällen durch Steroidverbindungen erfolgt (Fox 2004), ist hier auch eine Beeinflussung durch extern applizierte Steroide denkbar.

Der Eintrag verschiedener Steroidverbindungen in die Umwelt stellt für marine Habitate ein Problem dar. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass in verschiedenen Habitaten eine Degradation von Estrogenen und Androgenen stattfindet. So können Steroide unterschiedlicher Herkunft von einigen Bakterien und Pilzarten abgebaut werden (Fahrbach et al. 2008; Fujii et al. 2003; Kieslich 1985; Rosch et al. 2008; Sallam et al. 2008; Yoshimoto et al. 2004).

## 1.2 Phylogenie des Steroidabbaues

Obwohl Steroide als ubiquitär verbreitet gelten, ist die Fähigkeit zum Abbau der Steroidstruktur bei den Bakterien nur in relativ wenigen Isolaten zu finden. Innerhalb der Domäne der Bakterien wurden in vier der derzeit 24 Phyla Organismen beschrieben, welche Steroide metabolisieren können. Zudem kann die Degradationseigenschaft zur erhöhten Resistenz gegen Antibiotika führen (Oppermann et al. 1996).

### 1.2.1 Firmicutes und Bacterioides

Im Phylum *Firmicutes*, welches gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C Gehalt beherbergt, wurden nur drei Steroide metabolisierende Arten beschrieben (Arima et al. 1969; Kim et al. 2003). Die Stämme *Lysinibacillus fusiformis* ATCC7055, *Bacillus roseus* IAM 1257 und *Bacillus subtilis* SFF34 sind alle in der Familie der *Bacillaceae* gruppiert und in der Lage Cholesterin aerob abzubauen.

Mit *Sphingobacterium* sp. JCR5 beherbergt auch das Phylum *Bacteroidetes* (früher *Cytophaga-Flavobacterium-Bacterioides* Gruppe) ein Estrogen abbauendes Bakterium (Ren et al. 2006). Bakterien dieses Phylums sind vor allem durch den Abbau von Biopolymeren wie Chitin und Cellulose bekannt (Kirchman 2002).

### 1.2.2 Actinobacteria

Das Phylum der *Actinobacteria* enthält mit mindestens 28 Bakterienstämmen die meisten zum Steroidabbau befähigten Organismen. Bei den gram-positiven Actinobakterien, welche einen hohen G+C Gehalt und filamentöses, aerobes Wachstum aufweisen, finden sich die Steroidabbauer vorwiegend in der Unterordnung *Corynebacterineae*. Hierzu zählen besonders die Familien *Nocardiaceae* und *Mycobacteriaceae*. In diesen Taxa sind sowohl Estrogen als auch Cholesterol bzw. Cholat-Abbauer vertreten (Arima et al. 1969; de las Heras et al. 2009; Drzyzga et al. 2009; Mathieu et al. 2008; Tak 1942; Yoshimoto et al. 2004).

### 1.2.3 Proteobacteria

Die Proteobakterien gliedern sich in sechs Klassen die mit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  und  $\zeta$  (zeta) bezeichnet werden. 1988 wurden sie von Stackebrandt et al (Stackebrandt et al. 1988) nach dem griechischen Gott Proteus benannt, um ihre morphologische und physiologische Vielfalt zu demonstrieren. Die momentan bekannten 18 Steroide verwertenden Stämme wurden bis heute nur den Klassen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zugeordnet.

Unter den  $\alpha$ -Proteobakterien, bei denen wahrscheinlich die Vorfahren der Endosymbionten einzuordnen sind, befinden sich zwei Steroid abbauende Stämme. *Novosphingobium tardaugens* ATCC BAA531 (Fujii et al. 2003) und *Sphingomonas* sp. JEM-1 (Mathieu et al. 2008) wurden jeweils aus Aktivschlamm in Japan und den USA isoliert. Beide wurden der Familie der *Sphingomonadaceae* zugeordnet und sind in der Lage, Estrogene respektive 7-Ketocholesterol abzubauen.

Innerhalb der  $\gamma$ -Proteobakterien sind es vorwiegend Angehörige der Familie der *Pseudomonadaceae*, welche Steroide, hauptsächlich Cholate respiratorisch abbauen können. Daneben konnten mit *Serratia prymutia* IAM1255 (Arima et al. 1969) und *Enterobacter aerogenes* (Wainfan et al. 1954) auch Mitglieder der fakultativ aeroben *Enterobacteriaceae* als Cholesterolverwerter beschrieben werden. Erstaunlicherweise wurde 2008 mit *Steroidobacter denitrificans* FS1 ein Bakterium beschrieben, welches sowohl Estrogene als auch C-19 Steroide, wie Testosteron, abbauen kann (Fahrbach et al. 2008). Taxonomisch wird dieser Organismus den *Sinobacteriaceae* und somit der Ordnung *Xanthomonadales* zugeordnet.

Nach den  $\gamma$ -Proteobakterien enthalten die  $\beta$ -Proteobakterien die meisten Steroide abbauenden Stämme der Proteobakterien. Die Familie der *Rhodocyclaceae* (Ordnung *Rhodocyclales*) beinhaltet sowohl die zwei Estrogen-abbauenden Stämme *Sterolibacterium denitrificans* Chol-S1 und *Denitratisoma oestradiolicum* AcBE2-1 als auch den Cholesterol abbauenden Stamm 72Chol (Fahrbach et al. 2006). Diese Familie umfasst vorwiegend

aerobe Bakterien, obwohl hier auch strikt anaerobe Mikroorganismen anzutreffen sind. Auch bakterielle Konsortien sind in der Lage Steroide zu metabolisieren. Ein Vertreter ist *Nitrosomonas europaea* NCIMB11850 (Shi et al. 2004). Der Einsatz dieses Bakteriums aus der Ordnung der *Nitrosomonadales*, zusammen mit Aktivschlamm, führte zu einem signifikanten Abbau von Estrogenen (Shi et al. 2004).

Die Familie der *Comamonadaceae*, aus der Ordnung der *Burkholderiales*, beinhaltet ebenfalls Steroid-abbauende Bakterienstämme. Innerhalb dieser Ordnung sind die Familien *Alcaligenaceae*, *Comamonadaceae*, *Burkholderiaceae* sowie die Familie *Oxalobacteriaceae* vertreten. Sie beherbergen obligat aerobe bis fakultativ anaerobe Bakterien, die sowohl einen chemoorganotrophen als auch chemolithotrophen Stoffwechsel haben können. Verschiedene Arten der Gattungen *Burkholderia* und *Bordetella* enthalten pathogene Arten. Alle Steroid-abbauenden Bakterien dieser Familie gehören dem Genus *Comamonas* an.

#### 1.2.4 Der Genus *Comamonas*

Die Gattung *Comamonas* besteht aus aeroben, gram-negativen Stäbchen, welche mindestens an einem der beiden Zellpole Flagellen aufweisen. Ihr Stoffwechsel ist chemoorganotroph. Andere phylogenetisch nahe Genera, wie etwa *Delftia*, *Polaromonas*, *Hydrogenophaga* und *Brachymonas* zeigen 92-94% Identität in ihrer 16SrDNA zu *Comamonas*. Die Mitglieder des letzteren Genus gelten als ubiquitär-vorkommend und wurden bereits aus verschiedenen Habitaten isoliert. Hierzu zählen vor allem diverse Sedimente (Schlamm) und auch aquatische Habitate. Auch mit Schadstoffen kontaminierte Bereiche gehören zu den Lebensbereichen von *Comamonas*. Allerdings wurden bereits Vertreter des Genus in klinischen Proben nachgewiesen (Bentovim et al. 1974; Devos et al. 1985; Gilardi 1971; Gul et al. 2007; Horowitz et al. 1990; Reddy et al. 2009; Willems et al. 1991). Die phylogenetische Einordnung von *Comamonas* und der beinhalteten Arten war lange Zeit unklar (Willems and Vos 2006). Der Name *Comamonas* ersetzte 1962 die taxonomische Bezeichnung *Lophomonas*, welche ein Taxon der Protozoen benennt (Davis and Park 1962). Nach mehreren weiteren Umbenennungen wurde der Gattungsname *Comamonas* 1985 wiederbelebt (Devos et al. 1985). Momentan enthält das Genus 14 Arten. Seit 1999 wird *Comamonas acidovorans* jedoch aufgrund seiner phylogenetischen und physiologischen Eigenschaften als *Delftia acidovorans* benannt (Wen et al. 1999). Die *Comamonas*-Zellen sind 0,5 bis 2 µm breit und können eine Länge von 1 bis 6 µm erreichen (Willems and Vos 2006). Die Vertreter dieser Gattung haben einen G+C Gehalt von über 60%, wie beispielsweise *C. terrigena* (G+C 64-66%), *C. testosteroni* (G+C 62,4-64,5%) und *C. denitrificans* (G+C 60,4-60,8%) zeigen (Willems and Vos 2006). Weiterhin haben die meisten Comamonaden die Fähigkeit Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, wobei nur *C. nitrativorans* und *C. denitrificans* Nitrat vollständig zu molekularem Stickstoff reduzieren können. Zu den

derzeitig 14 bzw. 15 Arten (siehe Tabelle 1) kommen noch weitere Isolate, welche jedoch nicht näher eingeordnet sind und nur als *Comamonas* species gelistet werden.

Tabelle 1 Bakterienstämme (Auswahl) des Genus *Comamonas*

Name	Synonym(e) <sup>1</sup>	Stämme (ca.)	Herkunft <sup>2</sup>	Quelle(n)
<b><i>C. aquatica</i></b>	<i>Aquaspirillum aquaticum</i> ; <i>Spirillum serpens</i>	68	Frischwasser	(Wauters et al. 2003)
<b><i>C. badia</i></b>	<i>Pseudomonas</i> sp. #12	1	Aktivschlamm	(Tago and Yokota 2004)
<b><i>C. baltica</i></b>		1	Ostsee	(Koivula and Hantula 1997)
<b><i>C. composti</i></b>		1	Nahrungsabfall /Kompost	(Young et al. 2008)
<b><i>C. denitrificans</i></b>		12	Aktivschlamm	(Gumaelius et al. 2001)
<b><i>C. granuli</i></b>	<i>C. sp.</i> KCTC12199	1	Kläranlage	(Kim et al. 2008)
<b><i>C. kerstii</i></b>	<i>C. terrigena</i> DNA group 3	4	Humane Probe	(Wauters et al. 2003)
<b><i>C. koreensis</i></b>		2	Feuchtgebiet	(Chang et al. 2002)
<b><i>C. margaretae</i></b>		1	Margarete	Unpubl.
<b><i>C. nitrativorans</i></b>	<i>C. sp.</i> 23310	2	Abfall- Bioreaktor	(Etchebehere et al. 2001)
<b><i>C. odontotermidis</i></b>	<i>C. sp.</i> Dant 3-8	1	Termitendarm	(Chou et al. 2007)
<b><i>C. terrigena</i></b>	<i>Lophomonas alcaligenes</i> ; <i>Vibrio percolans</i> ; <i>Vibrio</i> <i>neocistes</i>	14	Heuaufguss- filtrat	(Hugh 1962; Wauters et al. 2003)
<b><i>C. testosteroni</i></b>	<i>Pseudomonas</i> <i>testosteroni</i> ; <i>C. sp.</i> W30E1a; <i>Alcaligenes</i> sp. BR60; <i>Pseudomonas</i> <i>dacunhae</i> IAM 1152	>200	Boden	(Marcus and Talalay 1956; Willems et al. 1991)
<b><i>C. thiooxidans</i></b>		1	Schwefelquelle	(Narayan et al. 2009)
<b><i>C. zonglianii</i></b>	<i>C. sp.</i> 22523	1	Kontaminierter Boden	(Yu et al. 2010)

1) Namen anderer Stämme, die auch der jeweiligen Art zugeordnet werden

2) Herkunft der Typstämme

Anhand der 16SrDNA-Analyse steht der einzige beschriebene Stamm der Art *C. baltica* sehr nahe der Species *C. testosteroni*. Im Genus *Comamonas* ist bis dato ausschließlich dieser Organismus zum Steroidabbau befähigt.



### 1.2.5 *Comamonas testosteroni*

Die Art *C. testosteroni* ist ebenso ubiquitär vertreten wie der Genus *Comamonas*. Diese Bakterien zeichnen sich durch enorme Biodegradationseigenschaften aus. Dadurch sind sie vorwiegend in Habitaten zu finden, die mit organischen Substanzen kontaminiert sind (Willems and Vos 2006) (Tabelle 2). Darüber hinaus konnte *C. testosteroni* auch aus Cadmium-verseuchtem Boden isoliert werden (Kanazawa and Mori 1996).

Tabelle 2 Isolationen von *C. testosteroni* nach (Willems and Vos 2006)

Isolation auf <sup>1</sup>	Quelle
Testosteron	(Talalay et al. 1952)
<i>p</i> -Cresol	(Dagley and Patel 1957)
Imidazolyl-propionat/-lactat	(Coote and Hassall 1973)
Anthranilat, Kynurenat and Poly-3-Hydroxybutyrat	(Stanier et al. 1966)
Naphthalen	(Garciavaldes et al. 1988)
Phenanthren	(Goyal and Zylstra 1996)
Chlormethylphenol	(Hollender et al. 1997)
Polychlorierte Biphenyle (PCB)	(Joshi and Walia 1995)
Nitrophenol, Nitrobenzen	(Zhao and Ward 1999)
3-Chloroaniline	(Boon et al. 2000)
Alkylbenzensulfonat	(Schleheck et al. 2004)
Taurocholol	(Rosch et al. 2008)

1) Zur Anreicherung verwendetes Substrat

Die Genomgröße bei *C. testosteroni* wurde auf ca. 5,37 Mbp bei Stamm CNB-2 (Ma et al. 2009) und ca. 6,02 Mbp bei Stamm KF-1 ((Schleheck et al. 2004); Veröffentlicht 2006) bestimmt. Im Gegensatz zum Typstamm ATCC11996 tragen einige Stämme Plasmide, welche auf besondere Abbauleistungen hinweisen können. So enthält der Stamm T-2 das 85 kbp große, konjugative Plasmid pTSA, das für verschiedene Abbau-Enzyme von *p*-Toluenesulfonat kodiert (Junker and Cook 1997). Das Plasmid pNB2 wird im Stamm I2 für den Abbau von Anilin und Chloranilin benötigt (Boon et al. 2000). Dagegen ist ein zentraler Abbauweg für zyklische Kohlenwasserstoffe, der *meta*-Cleavage Weg für Protocatechuat, zumindest bei *C. testosteroni* T-2 und *C. testosteroni* PSB-4 auf dem Chromosom kodiert (Junker and Cook 1997). Bis 2006 (Willems and Vos 2006) wurde *C. testosteroni* als gelegentlich opportunistisches Pathogen geführt und sowohl die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) als auch die American Type Culture Collection (ATCC) gibt bis August 2010 den Typstamm unter der Sicherheitseinstufung S1 an. Allerdings wurde im Dezember 2008 von der Zentralen Kommission für die Biologische

Sicherheit, aufgrund zweier Publikationen, eine Anhebung der Sicherheitsstufe auf S2 beschlossen (Arda et al. 2003; Gul et al. 2007).

Die Fähigkeit von *C. testosteroni* auf Steroiden wie Testosteron, Progesteron und Cholsäure als Kohlenstoff und Energiequelle zu wachsen (Horinouchi et al. 2010), stellt diese Art innerhalb der Gattung als auch der *Comamonadaceae* heraus. Die intensive Beforschung des Steroidstoffwechsels macht *C. testosteroni* somit zum Modellorganismus.

### 1.3 Bakterieller aerober Abbau von Steroiden

Um die Struktur der Steroide aufbrechen zu können, sind sowohl im aeroben als auch im anaeroben Abbau viele unterschiedliche Enzyme und deren Regulatoren beteiligt. Der aerobe Weg wurde schon früh untersucht und seine Reaktionsfolge aufgestellt (Coulter and Talalay 1968; Levy and Talalay 1959). Der Stoffwechselweg ist nach einem zentralen Intermediat, 9,10-Seco(steroid)-Weg benannt. Über diesen Weg werden scheinbar alle C-19 Steroide abgebaut. Hierzu zählt Testosteron genauso wie Cholesterol, wobei bei letzterem zuerst eine  $\beta$ -Oxidation der aliphatischen Seitenkette am Kohlenstoff 17 erfolgt. Das Fehlen des Kohlenstoff 19 bei Estrogenen (z.B. 17 $\beta$ -Estradiol) führt dazu, dass keine Hydroxylation am Kohlenstoff 9 und damit die Bildung des 9,10-Secosteroides nicht stattfinden kann (Coulter and Talalay 1968; Fahrbach 2006). Der aerobe Abbau von C-19 Steroiden wurde vor allem in *C. testosteroni* untersucht (Coulter and Talalay 1968; Horinouchi et al. 2005; Horinouchi et al. 2003a; Horinouchi et al. 2003b; Horinouchi et al. 2004; Horinouchi et al. 2001).

#### 1.3.1 Steroidmetabolismus in *C. testosteroni*

*C. testosteroni* ist in der Lage, verschiedene Steroide abzubauen. Als Leitsubstanz für den Abbau wird allerdings Testosteron gesehen.

Um Testosteron abzubauen zu können, müssen die Zellen Zugang zum Substrat erlangen. Es muss vom umliegenden Medium ins Cytoplasma gelangen. Dabei muss das Substratmolekül zuerst die äußere Membran, dann das Periplasma und die Zellmembran passieren, bevor es im Cytosol vollständig metabolisiert werden kann. Allerdings können auch im Periplasma einige Reaktionen erfolgen solange keine energiereichen Phosphate beteiligt sind.

#### 1.3.2 Steroidtransfer in die Zelle

Die äußere Membran stellt die erste Barriere für Substratmoleküle dar. Sie ist asymmetrisch aufgebaut und besitzt auf der äußeren Seite Lipopolysaccharide (LPS), an der inneren dagegen Glycerophospholipide und ist mit Porinen durchsetzt. Es konnte gezeigt werden, dass Steroide, wie Testosteron, Androstandiol, 4-Androsten-3,17-dion aber auch 19-Nortestosteron durch Diffusion in das Periplasma gelangen (Plesiat et al. 1991). Es wird

vermutet, dass hydrophobe Substanzen, wie Steroide durch die Lipid-Bestandteile der Membranen diffundieren können. Das LPS mit seinen, ins Medium ragenden Zuckerresten, hemmt durch den hydrophilen Charakter die Diffusion der planaren und hydrophilen Steroide, wie Testosteron und Androstandiol (Plesiat et al. 1991). Eine Energetisierung der äußeren Membran scheint dabei keine oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Plesiat et al. 1991). Die Arbeitsgruppe um Nikaido konnte die Permeabilitäts-Koeffizienten für mehrere Bakterien und Steroide ermitteln (Plesiat et al. 1991). Für *C. testosteroni* ATCC17410 wurde ein Koeffizient von  $2,5 \times 10^{-5} \text{cm/s}$  für Androstandiol bestimmt. Damit zählt *C. testosteroni* zu den Bakterien mit der höchsten Steroid-Permeabilität der äußeren Membran (Plesiat et al. 1991).

Weiterhin muss das Steroid durch das Periplasma und über die Zellmembran gelangen. In *Pseudomonas aeruginosa* wurde eine konstitutive Bindeaktivität für C-18 Steroide sowohl im Cytoplasma als auch im Periplasma der Zelle nachgewiesen (Rowland et al. 1992). Dagegen ist bei *C. testosteroni* eine Induktion mit Steroiden nötig um Bindeaktivitäten nachweisen zu können (Thomas et al. 1989). Durch osmotischen Schock konnten verschiedene Bindeaktivitäten im Periplasma nachgewiesen werden (Watanabe and Watanabe 1974). Neben Aktivitäten der Enzyme  $3\beta/17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase,  $3\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, 5en-3-Ketosteroidisomerase und 1en-Dehydrogenase (Watanabe et al. 1979; Watanabe and Watanabe 1974) konnten auch Bindeproteine nachgewiesen werden. So konnte ein ca. 50 kDa großes Protein aus dem Überstand einer Membranvesikelpräparation von *C. testosteroni* isoliert werden (Thomas et al. 1989). Dieses Protein scheint periplasmatisch lokalisiert und in der Lage 0,2 bis 0,3 mol Testosteron pro mol Protein, mit einer Bindungskonstante  $K_d$  von 16,7-33,3 nM, spezifisch zu binden (Thomas et al. 1989). Zudem wurde aus Vesikeln von *C. testosteroni* ein 34 kDa großes Protein extrahiert, welches über einen  $K_d$ -Wert von 39 nM verfügt (Francis and Watanabe 1981).

Zur Überwindung der Zellmembran wurden verschiedene Transportprozesse und Ereignisse postuliert. Francis et al beschrieb ein Testosterontransportsystem, welches vom Membranpotential abhängig ist und dem mindestens zwei Proteine (56 und 45 kDa) angehören (Francis et al. 1985). Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sowohl eine funktionierende Elektronentransportkette in der Membran (Lefebvre et al. 1976a; b) als auch die Anwesenheit von Sauerstoff (Culos and Watanabe 1982) und die  $\text{NAD}^+$ -Verfügbarkeit (Watanabe and Po 1976) für die Testosteronaufnahme von entscheidender Bedeutung sind.

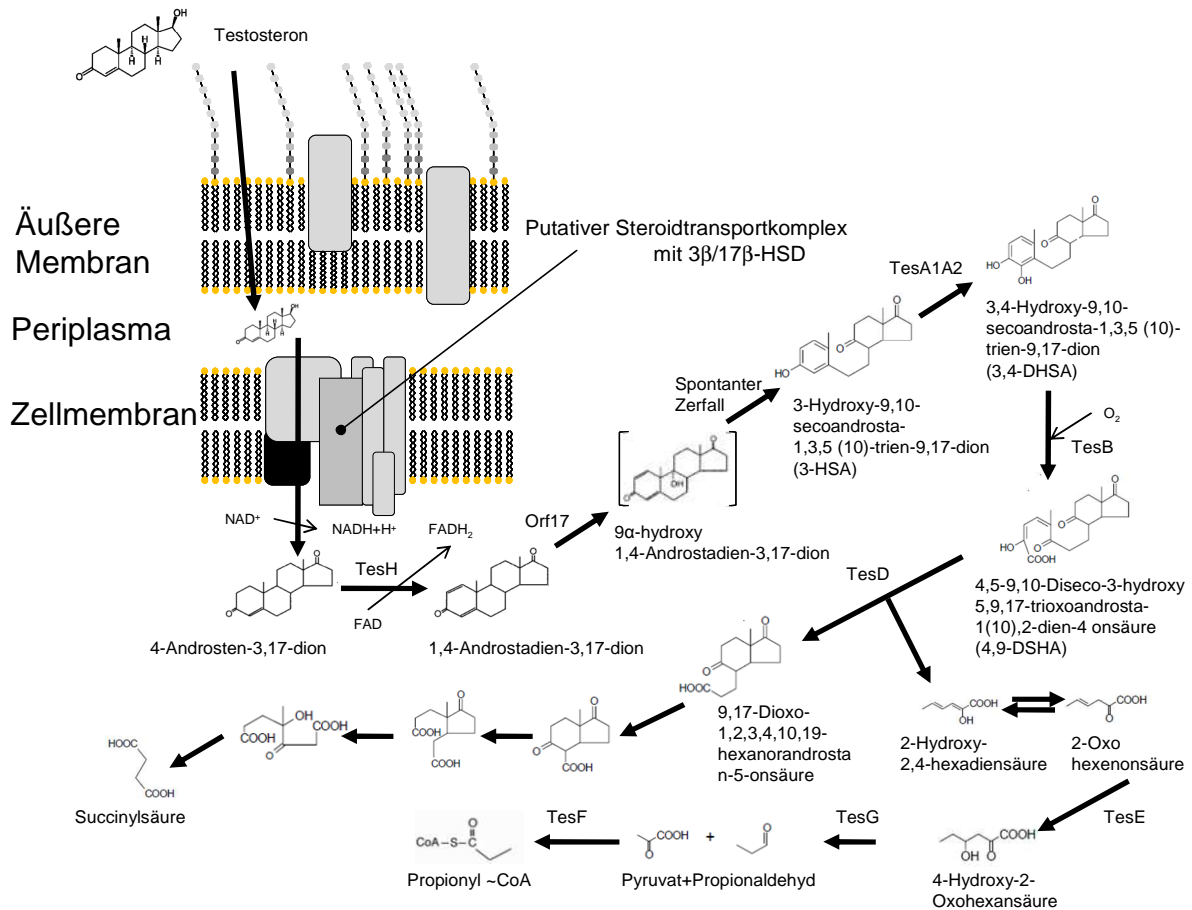


Abbildung 4 Schema des Testosteronabbaus in *C. testosteroni* (modifiziert nach (Fahrbach 2006; Horinouchi et al. 2003a; Horinouchi et al. 2003b; Horinouchi et al. 2001))

### 1.3.2.1 Testosteronabbau

Schon während der Passage durch die Zellmembran wird Testosteron zu Androstandion umgewandelt (Watanabe and Po 1976). Für die erste Reaktion ist die 3 $\beta$ /17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase verantwortlich, welche die Hydroxylgruppe am Kohlenstoff 17 NAD<sup>+</sup>-abhängig reduziert (Gentiraimondi et al. 1991; Watanabe and Po 1976). Dieses Enzym ist wahrscheinlich Teil einer Steroid-Transportmaschinerie innerhalb der Zellmembran, da es durch extrazelluläre Antikörper gehemmt werden kann (Lefebvre et al. 1979; Watanabe et al. 1980). Das entsprechende Gen liegt in einem Steroid induzierbaren Operon mit *sip48*, welchem noch keine Funktion zugewiesen werden konnte (Pruneda-Paz et al. 2004a). Nach der Umwandlung von Testosteron zu 4-Androsten-3,17-dion wird letzteres zu 1,4-Androstadien-3,17-dion umgesetzt. Die für den Umsatz benötigte  $\Delta^1$ -Dehydrogenase ist in vielen Bakterienspezies zu finden (Kieslich 1985; Schubert et al. 1970; Smith 1984; Wagner et al. 1992). Das Gen *tesH* kodiert in *Comamonas testosteroni* TA441 für die  $\Delta^1$ -Dehydrogenase (Horinouchi et al. 2003a). Homologe Sequenzen wurden aber auch in den *C. testosteroni* Stämmen identifiziert, bei denen Sequenzinformationen vorlagen. Sie führt, laut Datenbankeintrag, FAD<sup>+</sup>-abhängig, eine Doppelbindung an Position 1 des

Steroidgerüsts ein. Bei anderen Bakterien konnte die  $\Delta^1$ -Dehydrogenase an der Innenseite der Zellmembran nachgewiesen werden (Lestrovaia 1981; Sih and Bennett 1962; Wagner et al. 1992). Bei *Mycobacterium fortium* konnte die Aktivität sowohl an der Zellmembran als auch im periplasmatischem Raum nachgewiesen werden (Wovcha et al. 1979). Daher ist davon auszugehen, dass TesH bei *C. testosteroni* auch an der Innenseite der Membran lokalisiert ist. In den *C. testosteroni* Stämmen TA441 und KF-1 liegt strangabwärts von *tesH* das Gen *tesI*. Diese 3-keto- $\Delta^4$ -Dehydrogenase führt eine Doppelbindung an die 4-Position ein und ist laut Datenbankeintrag ebenfalls FAD<sup>+</sup>-abhängig. TesI ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im Testosteronabbau beteiligt, allerdings wird ihm eine Funktion im Androsteronabbau zugeschrieben (Horinouchi et al. 2003a). Eine enzymatische 9 $\alpha$ -Hydroxylierung des Kohlenstoffs 9 ermöglicht einen nicht-enzymatischen Schritt, bei dem 9 $\alpha$ -Hydroxy-1,4-Androstadien-3,17-dion in 3-Hydroxy-9,10-Secoandrosta-1,3,5(10)-trien (3-HSA) umgewandelt wird. Für den eigentlichen enzymatischen Schritt wird eine FAD-abhängige Oxidoreduktase Orf17 in *C. testosteroni* TA441 postuliert (Horinouchi et al. 2003b). Das Gen *orf17* konnte in den Stämmen KF-1 und TA441 strangabwärts von *tesH* und *tesI* lokalisiert werden. Der phenolische A-Ring von 3-Hydroxy-9,10-Secoandrosta-1,3,5(10)-trien (3-HSA) wird nun von TesA1A2 am Kohlenstoff 4 hydroxyliert (Horinouchi et al. 2005; Horinouchi et al. 2003a) und durch die Biphenyl-2,3-diol-1,2-dioxygenase in *meta*-Stellung gespalten (Horinouchi et al. 2001; Skowasch et al. 2002). Das Gen *tesB* liegt am Beginn eines, durch Steroide induzierbaren Genclusters, welcher mindestens 18 Gene in verschiedenen Transkriptionseinheiten enthält (Horinouchi et al. 2005). Durch die Spaltung des A-Ringes entsteht 4,5-9,10-Diseco-3-hydroxy-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-dien-4-onsäure (4,9-DSHA) welche wiederum als Substrat für die Epoxid-Hydrolase TesD dient. 4,9-DHSA wurde als Intermediat bei Abbau verschiedener Steroide nachgewiesen (Horinouchi et al. 2010). Das zu TesD korrespondierende Gen, *tesD*, liegt mit den Genen *tesEFG* in einem putativen Operon (Horinouchi et al. 2005). TesD spaltet 4,9-DSHA in 9,10-Dioxo-1,2,3,4,10,19-Hexanorandrostan-5-onsäure und 2-Hydroxyhexa-2,3-diensäure, die in mehreren Tautomeren vorliegen kann (Horinouchi et al. 2003a). TesE wird für die Reaktion von 2-Hydroxyhexa-2,3-diensäure bzw. dessen Tautomers 2-Oxo-4-Hexenonsäure zu 4-Hydroxy-2-oxo-Hexanonsäure verantwortlich gemacht (Horinouchi et al. 2003a), diese wird anschließend durch die Dehydrogenase TesG in Pyruvat und Propionaldehyd umgesetzt. TesF katalysiert anschließend die Reaktion von Propionaldehyd zu Propionyl-CoA (Horinouchi et al. 2003a). Als zweites Produkt der 4,9-DSHA Spaltung durch TesD entsteht 9,10-Dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-onsäure, welche durch mehrere Reaktionen bis zur Succinylsäure weiter umgesetzt wird (Gibson et al. 1966). Die an dieser Reaktionsfolge beteiligten Enzyme wurden bisher noch nicht identifiziert. Pyruvat,

Propionyl-CoA und Succinylsäure werden folgend in zentrale anabole und katabole Stoffwechselwege eingespeist.

### 1.3.3 Regulation des Steroidstoffwechsels in *C. testosteroni*

Schon lange ist die Induzierbarkeit des Testosteronabbaus in *C. testosteroni* bekannt (Talalay and Wang 1955; Wacker et al. 1965). Allerdings lagen die Mechanismen lange Zeit im Dunkeln.

Die Effekte von Steroiden auf die Expression verschiedener Gene wurden bereits von einigen Arbeitsgruppen untersucht. So zeigte das Gen der  $3\beta/17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, *βhsd*, eine Expressionssteigerung bei Inkubation der Zellen mit Testosteron, Androstendion,  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron,  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron und Progesteron um Faktor 3 bis 3,9 im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay (Pruneda-Paz et al. 2004a). Im selben Assay wurde bei Cholesterol eine Expressionssteigerung von Faktor 6 und bei Estrogenen von ca. 1 gemessen. Weiterhin konnte mittels Northernblot-Analysen nachgewiesen werden, wie unter Testosteroneinfluss die mRNA-Menge von *βhsd* nach 12 und 24 Stunden Inkubation gegenüber der Kontrolle anstieg. Dagegen stieg der mRNA-Gehalt von *sip48*, das sich im selben Operon befindet, nach einer Induktion von 12 Stunden, sank jedoch innerhalb von 24 Stunden wieder deutlich ab (Pruneda-Paz et al. 2004a). Damit scheint neben der Induktion der Genexpression auch die Stabilität der mRNA ein Regulationsmechanismus im Steroid-Stoffwechsel zu sein. Die Expression der Gene *orf11/tesA2*, *tesH* und *orf18*, welche alle in einem Gencluster liegen, zeigten sich nach Zugabe von Testosteron oder 1,4-Androstadien-3,17-dion, wie mittels Northernblot detektiert wurde, deutlich erhöht (Horinouchi et al. 2005; Horinouchi et al. 2003a). Auch Cholsäure war in der Lage die Menge der mRNA von *orf11/tesA2*, *tesA1/orf12* als auch von *tesB* zu erhöhen. Weiterhin konnte mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Assay eine Steigerung der Expression von *tesB* durch Zugabe von Testosteron und 1,4-Androstadien-3,17-dion gezeigt werden (Horinouchi et al. 2001). Strangaufwärts von *tesB* konnte eine Region im Gencluster identifiziert werden, die für die Umsetzung von Cholaten in *C. testosteroni* TA441 nötig (Horinouchi et al. 2008). Dieser Cluster besteht aus fünf Genen, wobei die Expression des letzten Leserahmens, *orf6*, durch Cholsäure und nur leicht durch Testosteron induziert werden kann (Horinouchi et al 2008).

Auch das Level der  $3\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase ( $3\alpha$ HSD/CR; HsdA) ist durch Steroide zu beeinflussen (Marcus and Talalay 1956). HsdA ist in der Lage, sowohl die Reduktion von Carbonylgruppen als auch die Oxidation von Hydroxylgruppen am Kohlenstoff 3 bei einer Reihe von Steroid-Substraten zu katalysieren (Maser et al. 2000; Oppermann and Maser 1996). Dabei scheint der bevorzugte Mechanismus die Oxidation an

der 3 $\alpha$ -Position zu sein (Maser et al. 2000). HsdA gehört, im Gegensatz zu seinem eukaryotischen Pendant zur Superfamilie der „short-chain-dehydrogenases/reductases“ (SDR)(Hoffmann and Maser 2007; Jez et al. 1997). Das Gen der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase konnte aus genomischer DNA des *C. testosteronei* Typ-Stammes ATCC11996 kloniert und in einer Plasmidbibliothek identifiziert werden (Mobus and Maser 1998). Die Expression des *hsdA* Gens ist durch Testosteron in *C. testosteronei* ATCC11996 induzierbar, obwohl Testosteron nicht zu den HsdA-Substraten gehört (Maser et al. 2000). Mehrere Regulationsmechanismen wurden seither für die als Reportersystem eingesetzte *hsdA* beschrieben. Zunächst wurden zwei reprimierende Faktoren für *C. testosteronei* ATCC11996 publiziert (Maser et al. 2001; Xiong et al. 2001; Xiong et al. 2003b). Diese beiden, als Repressor A (*repA*) und Repressor B (*repB*) bezeichnet, liegen auf dem Gegenstrang zum *hsdA*-Gen, wobei *repB* downstream lokalisiert ist und *repA* den Leserahmen von *hsdA* überlappt (Abbildung 5). Bioinformatisch wurden Homologe auch in *C. testosteronei* TA441 beschrieben, wobei der *repB*-Leserahmen hier mit einem stromabwärts liegenden Leserahmen (*orf64*) fusioniert ist (Horinouchi et al. 2010).

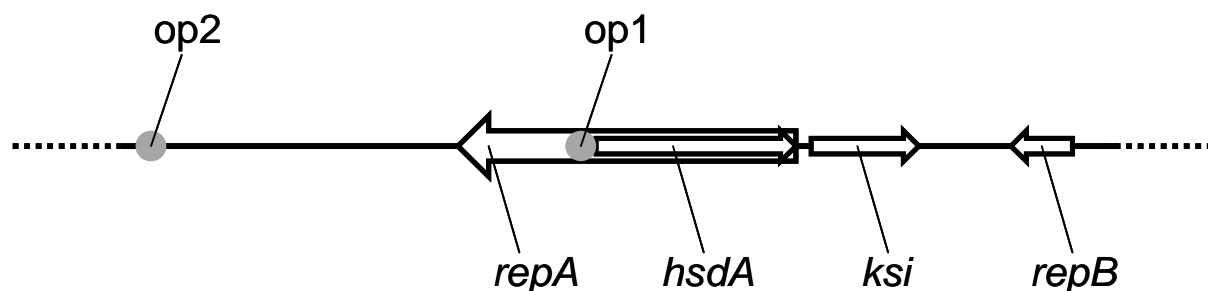


Abbildung 5 Schematisches Übersicht des *hsdA* Regulon in *C. testosteronei* ATCC11996; *hsdA* Gen der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase (3 $\alpha$ HSD/CR; HsdA); *ksi* Gen einer Ketosteroidisomerase; *repA* Gen des Repressor A; *repB* Gen des Repressor B; op1/op2 Operatoren 1 und 2

Der Leserahmen von Repressor A liegt auf dem Gegenstrang des Leserrasters von *hsdA*, dadurch hemmt eine Transkription von *repA* die mRNA-Synthese von *hsdA*, da sich die Transkriptionskomplexe sterisch behindern würden. Weiterhin ist das RepA-Protein in der Lage zwei 10 bp lange Operatoren zu binden, die sich strangaufwärts von *hsdA* befinden (op1 und op2). Die dadurch stabilisierte Loop-Struktur der DNA, in der sich auch der *hsdA* Promoter befindet, verhindert eine Initiation der Transkription von *hsdA* (Xiong et al. 2001). Weiterhin wurde gezeigt, das Testosteron an RepA bindet, was wiederum die Bindung an die beiden Operatoren verhindert und den *hsdA* Promoter frei gibt (Xiong et al. 2001). Die Menge an HsdA wird weiterhin durch RepB kontrolliert. RepB, mit einer Masse von 8,8 kDa, ist in der Lage das *hsdA*-mRNA-Molekül zu binden (Xiong et al. 2003c). Mit dieser Bindung wird die vollständige Transkription der *hsdA*-mRNA sterisch verhindert. Wie bereits RepA ist

auch die reprimierende Eigenschaft von RepB durch die Bindung von Testosteron inhibierbar (Xiong et al. 2003c). Daher ist die Expression von *hsdA* durch zwei bzw. drei reprimierende Faktoren gehemmt. Darüber hinaus wird ein weiterer Faktor upstream von *hsdA* vermutet und ist derzeit Fokus wissenschaftlichen Interesses (Xiong et al unpubl.).

#### 1.3.4 TeiR

Von einer argentinischen Arbeitsgruppe wurde 2004 ein Regulator in *C. testosteroni* ATCC11996 beschrieben, welcher sowohl die Expression von *hsdA* als auch von  $\beta$ *hsd* beeinflusst (Pruneda-Paz et al. 2004b). Dieser Regulator wurde als Testosteron induzierbar beschrieben und demnach mit TeiR (**t**estosterone **i**nducible **r**egulator) benannt. Das *teiR* Gen besteht aus 1176 bp und kodiert für einen LuxR-Typ Regulator von 391 Aminosäuren Länge. Ein Homolog von *teiR*, welches mit *tesR* bezeichnet wurde, konnte in *C. testosteroni* TA441 identifiziert werden (Horinouchi et al. 2004). Der Leserahmen von *tesR* ist in der 5'Region länger als *teiR* und schließt sich an einen Steroidabbaucuster an, dessen Anfang *tesB* bildet (Horinouchi et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass ein nicht-funktionales TeiR zu einem Verlust der Testosteronverwertbarkeit führt (Pruneda-Paz et al. 2004b). Anhand von Northernblot-Analysen wurde gezeigt, dass eine *teiR* Mutante von *C. testosteroni* ATCC11996 keine Expression von *sip48- $\beta$ hsd*, der  $\Delta^1$ - und  $\Delta^4$ -Dehydrogenase (vermutlich *tesH* und *tesI*) und von *hsdA* unter Testosteroneinfluss aufweist (Horinouchi et al. 2004; Pruneda-Paz et al. 2004b). Bioinformatische Analysen zeigten zwei putative Motive bzw. Domänen innerhalb des TeiR-Proteins. Im zentralen Teil wurde eine PAS-Domäne identifiziert. PAS Domänen sind in der Natur weit verbreitet, sie wurden in Proteinen aus Prokaryoten und Eukaryoten nachgewiesen. In ihrer Funktion in der Signaltransduktion zählen zu den häufigsten Proteindomänen (Taylor and Zhulin 1999). Im C-Terminus von TeiR wurde ein Helix-turn-Helix Motiv bioinformatisch identifiziert (Pruneda-Paz et al. 2004b). Lokalisationsstudien zeigten, dass TeiR in *C. testosteroni* eine polare Lokalisation aufweist (Gohler et al. 2008). Aus den Arbeiten zu *teiR* und *tesR* folgte eine zentrale, wenn nicht sogar globale Rolle in der Regulation des Steroidstoffwechsels.



## 1.4 Ziel der Arbeit

Da die Regulation des Steroidmetabolismus in *C. testosteroni* und in anderen Bakterien im Allgemeinen nicht ausreichend untersucht ist, soll diese Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung liefern. Der Fokus liegt dabei auf dem kürzlich beschriebenen Faktor TeiR und dessen Gen *teiR* aus *C. testosteroni* ATCC11996. Sowohl das Gen als auch das Protein sollen charakterisiert und funktionell untersucht werden. Weiterhin soll der Mechanismus der TeiR Funktion aufgeklärt und in das vorhandene Bild der Steroidregulation eingebunden werden. Während dieser Arbeit wurde das Genom von *C. testosteroni* KF-1 publiziert. Dieses soll bioinformatisch auf Gene der Steroiddegradation und deren Regulation geprüft werden. Zusammenfassend soll mit dieser Arbeit eine Gesamtübersicht der Steroidregulation von *C. testosteroni* erstellt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden verschiedene Bakterienstämme verwendet und erzeugt. Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Bakterienstämme

Name	Eigenschaften	Referenz
<b><i>E. coli</i> HB101</b>	F <sup>-</sup> mcrB mrr hsdS20(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm <sup>R</sup> ) glnV44 λ <sup>-</sup>	Promega (Mannheim, Deutschland)
<b><i>E. coli</i> DH5α</b>	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ <sup>-</sup>	Promega (Mannheim, Deutschland)
<b><i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS</b>	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3) pLysS(cm <sup>R</sup> )	Promega (Mannheim, Deutschland)
<b><i>C. testosteroni</i> ATCC11996</b>	Stamm ATCC11996	ATCC <sup>2</sup> /DSMZ <sup>1</sup>
<b><i>C. testosteroni</i> KF-1</b>	Stamm KF-1	DSMZ <sup>1</sup>
<b><i>C. testosteroni</i> Kol</b>	<i>C. testosteroni</i> ATCC11996 <i>teiR</i> ::pKPCR	Göhler et al 2008
<b><i>C. testosteroni</i> Koll</b>	<i>C. testosteroni</i> ATCC11996 <i>teiR</i> ::pKteiR5	Göhler et al 2008
<b><i>C. testosteroni</i> intGFP</b>	<i>C. testosteroni</i> KF-1 <i>teiR</i> ::pK-150GFP	Diese Arbeit

1) DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; 2) ATCC American Type Culture Collection

Mitglieder des Genus *Escherichia* wurden bei 37°C und Comamonaden bei 27°C aerob inkubiert.

### 2.2 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer und Oligonukleotide wurden von MWG-Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4 Primer und Oligonukleotide

Name	Gen	Organismus	Sequenz	Schnittstelle(n) / Modifikation	Verwendung /Quelle
<b>act1b</b>	<i>actA</i>	<i>C. testosteroni</i>	AGCC <u>CATATGGT</u> GCGCGCAGTG CACTTCC	NdeI	RT-PCR/Xiong et al unpubl.
<b>act2</b>	<i>actA</i>	<i>C. testosteroni</i>	GCCGGATCCTCAATGCTGCAG CCGGGCC	BamHI	RT-PCR/Xiong et al unpubl.
<b>pkSiL</b>	<i>Ksi</i>	<i>C. testosteroni</i>	ATGAATACCCCAGAACA		Xiong et al unpubl.
<b>pkSiR</b>	<i>Ksi</i>	<i>C. testosteroni</i>	TCAGGCGCCAGCGTGAA		Xiong et al unpubl.
<b>lysR_fwP3</b>	<i>orf5360</i> <i>/lysR</i>	<i>C. testosteroni</i>	<u>CATATGAGCGGGCTGCGAGGC</u> A	NdeI	RT-PCR <sup>1</sup>
<b>lysR_revP5</b>	<i>orf5360</i> <i>/lysR</i>	<i>C. testosteroni</i>	<u>GGATCCACACCAGGGCGCAGT</u> GC	BamHI	RT-PCR <sup>1</sup>
<b>orf31-3-fw</b>	<i>3'-orf31</i>	<i>C. testosteroni</i>	<u>CCCGGGTCTAGACTCGCAGAG</u> GGCCTG	XbaI; XmaI	Promoter/Transkript-Analyse
<b>orf33-3-fw</b>	<i>3'-orf33</i>	<i>C. testosteroni</i>	<u>CCCGGGTCTAGAGGCTGTTT</u> GAGCTG	XbaI; XmaI	Promoter/Transkript-Analyse
<b>orf32-5-rev</b>	<i>5'-orf32</i>	<i>C. testosteroni</i>	GTTCTTCTCCTTT <u>GCTAGCTGC</u> CTGCACCGAGGCTGC	NheI	Promoter/Transkript-Analyse; GFP-Fusion
<b>pC846r</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	GGGA <u>AAGCTT</u> CCAGTTGAGCTG ACC	HindIII	Funktion C-Terminus
<b>pC888r</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	GGGA <u>AAGCTT</u> TTTCGGTCCACTCG	HindIII	Funktion C-Terminus
<b>pN939f</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	CCCA <u>AAGCTT</u> GCTGACCCACCC	HindIII	Funktion C-Terminus
<b>pN888f</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	CCCA <u>AAGCTT</u> GGCAAGCAGCGC	HindIII	Funktion C-Terminus
<b>pIIbL</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	TCCC <u>CCCGGG</u> ATGACCGAAGG CATG	XmaI	Klonierung; Funktionsanalyse
<b>pIIb/IIIR</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	CCCA <u>AAGCTT</u> TTCACTTGTTCCCC A	HindIII	Klonierung; Funktionsanalyse
<b>pIIIL</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	TCCC <u>CCCGGG</u> ATGTGCCCATAT TTCGAC	XmaI	Klonierung
<b>pIIIM</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	ATCTGTGGTGAAC CGTCTGTCGATGAC		Funktion

Tabelle 4 (Fortsetzung) Primer und Oligonukleotide

Name	Gen	Organismus	Sequenz	Schnittstelle(n) / Modifikation	Verwendung / Quelle
<b>pN-5</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	TCCCCCGGGATGCCTACCGA CCGTATCG	XmaI	Funktion N-Terminus
<b>pN-8</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	TCCCCCGGGATGATGCTGCC GCACATC	XmaI	Funktion N-Terminus
<b>pOrf5315-fw</b>	<i>orf5315</i>	<i>C. testosteroni</i>	TCGCGAATTCGGATGCAAATCG ATCG	EcoRI	Klonierung <i>orf5315</i>
<b>pOrf5315-rev</b>	<i>orf5315</i>	<i>C. testosteroni</i>	GGGAAGCTTCGGCGACCGG	HindIII	Klonierung <i>orf5315</i>
<b>pOrf5348-fw</b>	<i>orf5348</i>	<i>C. testosteroni</i>	TCGCGAATTCAAACCGTATGTC AATG	EcoRI	Klonierung <i>orf5348</i>
<b>pOrf5348-rev</b>	<i>orf5348</i>	<i>C. testosteroni</i>	GGGAAGCTTGTTCAGCATGTC G	HindIII	Klonierung <i>orf5348</i>
<b>pteirR-981</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	CCC <u>AAGCTT</u> CAGCTGGAACAAC TGC	HindIII	Funktion C-Terminus
<b>pteirR-1031</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	CCC <u>AAGCTT</u> AGCGACAGGCCG TTGG	HindIII	Funktion C-Terminus
<b>pteirR-1092</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	CCC <u>AAGCTT</u> GGAGCGCAGATG CGC	HindIII	Funktion C-Terminus
<b>CFP-fw</b>	<i>cfp</i>	pLau53	TTG <u>GATATC</u> GCTAGC ATGCAGCTGGGCTCAGG	EcoRV	Klonierung <i>cfp</i>
<b>CFP-rev</b>	<i>cfp</i>	pLau53	TTGAAGCTTATCTAATCTAGACA CCATGG	HindIII	Klonierung <i>cfp</i>
<b>FliG-fw</b>	<i>orfPD4</i> <i>636/fliG</i>	<i>C. testosteroni</i>	TTG <u>CCCCGGG</u> ATGGACGATAGAGGTC	XmaI	Klonierung <i>fliG</i>
<b>FliG-rev</b>	<i>orfPD4</i> <i>636/fliG</i>	<i>C. testosteroni</i>	TTG <u>AAGCTT</u> AGACATAGCTGTCTCTCC	HindIII	Klonierung <i>fliG</i>
<b>PD1500-fw</b>	<i>orfPD1</i> <i>500</i>	<i>C. testosteroni</i>	TTG <u>CCCCGGG</u> ATGCGAGTCAAT GCACC	XmaI	Klonierung <i>orfPD1500</i>
<b>PD1500-rev</b>	<i>orfPD1</i> <i>500</i>	<i>C. testosteroni</i>	TTGAAGCTTCTACCGGAACACG CCAATC	HindIII	Klonierung <i>orfPD1500</i>
<b>pC627r</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	CCC <u>AAGCTT</u> TCAATCGAGGATG ACCAC	HindIII	Funktion hydrophobe Domäne
<b>pC567r</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	CATTGCCGTTCTGAAGCTTCTG ACGATCCTGG	HindIII	Funktion hydrophobe Domäne

Tabelle 4 (Fortsetzung) Primer und Oligonukleotide

Name	Gen	Organismus	Sequenz	Schnittstelle(n) / Modifikation	Verwendung / Quelle
<b>pN627f</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	GGATCGTCAGAAAGCTTCAGAAC GGCAATGTG	HindIII	Funktion hydrophobe Domäne
<b>pIL</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	GGAATTC <u>CATATG</u> TGCCCATAT TTCGAC	NdeI	Klonierung <i>teiR</i>
<b>pIR</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	CGGGATCCGCTTGTGAAAGC C	BamHI	Klonierung <i>teiR</i>
<b>pIIaL</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	GGAATTC <u>CATATG</u> ACCGAAGGC ATGTC	NdeI	Klonierung <i>teiR</i>
<b>pIIaR</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	CGGGATCCCTCACTTGTCCCC	BamHI	Klonierung <i>teiR</i>
<b>pPteiR-150fw</b>	5' <i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	TCCCTCTAGA CGGCGGCATGGGCG	XbaI	Analyse 5' <i>teiR</i>
<b>pPteiR-29fw</b>	5' <i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	TCCCTCTAGA GAGCTCCATCGCTTG	XbaI	Analyse 5' <i>teiR</i>
<b>pteIR378G FP-R</b>	<i>teiR</i>	<i>C. testosteroni</i>	GTTCTTCTCCTTTGCTAGCGGT CACGATACGGTCG	NheI	Fusion <i>teiR</i> mit <i>gfp</i>
<b>pGFPfw</b>	<i>gfp</i>	pcDNA™3.1/C T-GFP-TOPO	TGACCGCTAGCAAAGGAGAAG AAC	NheI	Klonierung <i>gfp</i>
<b>pGFPprev</b>	<i>gfp</i>	pcDNA™3.1/C T-GFP-TOPO	GCCGGATATCGGCTGATCA GCGGG	EcoRV	Klonierung <i>gfp</i>
<b>hsdA-fw</b>	<i>hsdA</i>	<i>C. testosteroni</i>	TTCGGTCAATTATTTTGGCG		RT-PCR <sup>1</sup>
<b>hsdA-rev</b>	<i>hsdA</i>	<i>C. testosteroni</i>	ACGAACTTGGCAATGGATTC		RT-PCR <sup>1</sup>
<b>rpoZ3 T7 KF-1</b>	<i>rpoZ</i>	<i>C. testosteroni</i>	GAAATTAATACGACTCACTATA GGGGCACGCATTACTGTTGAA GATAGCCTG	T7-RNAP	SBSH <sup>2</sup>
<b>rpoZ214rev KF-1</b>	<i>rpoZ</i>	<i>C. testosteroni</i>	ATGCAACAGCTTAACCCGGCAC		SBSH <sup>2</sup> , RT- PCR <sup>1</sup>
<b>rpoZ h1-22</b>	<i>rpoZ</i>	<i>C. testosteroni</i>	GATAGCCTGGAGCAGATCCCC		SBSH <sup>2</sup> , RT- PCR <sup>1</sup>
<b>rpoZ BIO- 45</b>	<i>rpoZ</i>	<i>C. testosteroni</i>	ACCGCTTCCAGCTCGTTTTGG	3' Biotinyliert	SBSH <sup>2</sup>
<b>rpoZ DIG- 66</b>	<i>rpoZ</i>	<i>C. testosteroni</i>	CGCGACTTACCGCGCCC		SBSH <sup>2</sup>
<b>rpoZ h2-84</b>	<i>rpoZ</i>	<i>C. testosteroni</i>	CATGCTCAATCAAGGCCACACC		SBSH <sup>2</sup>
<b>tesH569_T 7-KF-1</b>	<i>tesH</i>	<i>C. testosteroni</i>	CTAATACGACTCACTATAGGGG GTATTTCTGGACTACCCCTGG	T7-RNAP	SBSH <sup>2</sup>

Tabelle 4 (Fortsetzung) Primer und Oligonukleotide

Name	Gen	Organismus	Sequenz	Schnittstelle(n) / Modifikation	Verwendung /Quelle
<b>tesHrev108</b> <b>2_KF-1</b>	<i>tesH</i>	<i>C. testosteroni</i>	CCGGATTCATTCAAAAAGCGCT GC		SBSH <sup>2</sup> , RT-PCR <sup>1</sup>
<b>TesH770</b> <b>h1</b>	<i>tesH</i>	<i>C. testosteroni</i>	CACAAGTCAAGGCCAGGCGTG GCGTG		SBSH <sup>2</sup> , RT-PCR <sup>1</sup>
<b>tesH797</b> <b>BIO</b>	<i>tesH</i>	<i>C. testosteroni</i>	TGCTGGGCGCCGGTGGCTTTG AGCG	3' Biotinyliert	SBSH <sup>2</sup>
<b>tesH822</b> <b>DIG</b>	<i>tesH</i>	<i>C. testosteroni</i>	CAACCAGGAAATGCGCGACCA G		SBSH <sup>2</sup>
<b>tesH844</b> h2	<i>tesH</i>	<i>C. testosteroni</i>	ATCTGAACAAGCCCTCCAGGG C		SBSH <sup>2</sup>
<b>tesB747</b> h1	<i>tesB</i>	<i>C. testosteroni</i>	GATCTCGTTTCTACATGAAGACGCC T		RT-PCR <sup>1</sup>
<b>tesB931re</b> <b>v</b>	<i>tesB</i>	<i>C. testosteroni</i>	CAGTTGTTTTTCAGGGCGGCC		RT-PCR <sup>1</sup>
<b>porf1-</b> <b>79rev</b>	<i>orf1/3't</i> <i>esB</i>	<i>C. testosteroni</i>	CCCAGCCACCAATTCCGATC		RT-PCR <sup>1</sup>
<b>tesD514</b> <b>h1</b>	<i>tesD</i>	<i>C. testosteroni</i>	GTCATGAGCATGCAGGTGGTGGACC AG		RT-PCR <sup>1</sup>
<b>tesDrev81</b> <b>5_KF-1</b>	<i>tesD</i>	<i>C. testosteroni</i>	CAGGTGCGGTTGAACATCTCG		RT-PCR <sup>1</sup>

1) semiquantitative RT-PCR; 2) solution based sandwich hybridization (SBSH)

## 2.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit erstellten und verwendeten Plasmide sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5 Plasmide

Name	Größe (bp)	Resistenz	Ursprungs-Plasmid	Insert	Referenz
<b>pCR2.1TOPO</b>	3931	Kan, Amp			Invitrogen
<b>pCRCDNA3.1</b> <b>GFP-CT</b>	6157	Amp			Invitrogen
<b>pCRCDNA3.1</b> <b>teiRGFP</b>	7327	Amp	pCRCDNA3.1 GFP-CT	<i>teiR</i>	Paulsen 2006
<b>pet15B</b>	5708	Amp			Novagen
<b>petteiR1</b>	6884	Amp	pet15B	<i>teiR</i>	Göhler et al 2008
<b>pet15B-I</b>	5957	Amp	pet15B	<i>teiR</i> (1-484)	Diese Arbeit
<b>pet15B-II</b>	6078	Amp	pet15B	<i>teiR</i> (789-1176)	Diese Arbeit
<b>petN772</b>	6472	Amp	pet15B	<i>teiR</i> (1-772)	Diese Arbeit
<b>pGemT-easy</b>	3016	Amp			Promega
<b>pJet2.1</b>	2974	Amp	pJet2.1		Fermentas
<b>pJet-150GFP</b>	4262	Amp	pJet2.1	<i>teiR</i> (-150-378)- <i>gfp</i>	Diese Arbeit

Tabelle 5 (Fortsetzung) Plasmide

Name	Größe (bp)	Resistenz	Ursprungs- Plasmid	Insert	Referenz
<b>pKteiR10</b>	4047	Kan	pK18	<i>teiR</i>	Göhler et al 2008
<b>pKteiRA</b>	3043	Kan	pKteiR10	<i>teiR</i> (1-384)	Göhler et al 2008
<b>pKteiRB</b>	3406	Kan	pKteiR10	<i>teiR</i> (1-750)	Göhler et al 2008
<b>pKteiRC</b>	3684	Kan	pKteiR10	<i>teiR</i> ( $\Delta$ 385-749)	Göhler et al 2008
<b>pKteiR567</b>	3189	Kan	pK18	<i>teiR</i> (1-567)	Göhler et al 2008
<b>pKteiR627</b>	3262	Kan	pK18	<i>teiR</i> (1-627)	Göhler et al 2008
<b>pKteiR<math>\Delta</math><math>\Psi</math></b>	3744	Kan	pKteiR567	<i>teiR</i> ( $\Delta$ 568-626)	Göhler et al 2008
<b>pKteiR846</b>	3478	Kan	pK18	<i>teiR</i> (1-846)	Diese Arbeit
<b>pKteiR888</b>	3520	Kan	pK18	<i>teiR</i> (1-888)	Diese Arbeit
<b>pKteiR846-888</b>	3772	Kan	pK18	<i>teiR</i> ( $\Delta$ 847-887)	Diese Arbeit
<b>pKteiR846-936</b>	3721	Kan	pK18	<i>teiR</i> ( $\Delta$ 847-935)	Diese Arbeit
<b>pKteiR888KL</b>	3814	Kan	pK18	<i>teiR</i> (888AAGCTT)	Diese Arbeit
<b>pKteiR888-936</b>	3763	Kan	pK18	<i>teiR</i> ( $\Delta$ 889-935)	Diese Arbeit
<b>pKN5<i>teiR</i></b>	3517	Kan	pK18	<i>teiR</i> (294-1176)	Göhler et al 2008
<b>pKN8<i>teiR</i></b>	3304	Kan	pK18	<i>teiR</i> (504-1176)	Göhler et al 2008
<b>pKPCR</b>	3633	Kan	pCR2.1TOPO	<i>teiR</i> (249-907)	Göhler et al 2008
<b>pKteiR5</b>		Kan	pK18	<i>teiR</i> (385-750)	Göhler et al 2008
<b>pK-150GFP</b>	3908	Kan	pJet-150GFP	<i>teiR</i> (-150-378)	Diese Arbeit
<b>p6</b>	7912	Kan	pK18		Xiong et al 2001
<b>pBBtac14</b>	5406	Kan	pBBR1-MCS2	<i>tac</i> -Promoter	Instituts- Sammlung
<b>pBBtac16</b>	5406	Kan	pBBR1-MCS2	Tac-Promoter	Instituts- Sammlung
<b>pBB16<i>teiR</i></b>	6801	Kan	pBBtac- <i>teiR</i> - GFP1	<i>teiR</i>	Diese Arbeit
<b>pBBtacIII</b>	5772	Kan	pBBtac14	<i>teiR</i> (789-1176)	Diese Arbeit
<b>pBBtacIV</b>	6325	Kan	pBBtac14	<i>teiR</i> ( $\Delta$ 556-788)	Diese Arbeit
<b>pBBtacOrf5315</b>	6412	Kan	pBBtac14	<i>orf5315</i>	Diese Arbeit
<b>pBBtacOrf5348</b>	6376	Kan	pBBtac14	<i>orf5348</i>	Diese Arbeit
<b>pBBtacN5-GFP</b>	6988	Kan	pBBtac14	<i>teiR</i> (294-1176)- <i>gfp</i>	Diese Arbeit
<b>pBBR1-MCS1</b>	4707	Cm			Kovach et al 1995
<b>pGemT-easy</b>	3016	Amp			Roche, (Mannheim, Deutschland)
<b>pGemPD1500f w-CFP</b>	5147	Amp	pGemT-easy	<i>orfPD1500-cfp</i>	Diese Arbeit
<b>pMCS1- PD1500CFP</b>	6819	Cm	pBBR1-MCS1	<i>orfPD1500-cfp</i>	Diese Arbeit
<b>pLau53</b>	7674	Amp		<i>cfp</i> / <i>yfp</i>	Lau et al 2003

## 2.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merk (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

## 2.5 Nährmedien

In dieser Arbeit wurden als Vollmedien Standard I Nährmedium von Merck (Darmstadt, Deutschland) und LB-Medium (Sambrock and Russel 2001) eingesetzt. Als Minimalmedium diente M9 (Sambrock and Russel 2001).

Standard I Nährmedium:	Pepton 15,0 g/l; Hefeextrakt 3,0 g/l; NaCl 6,0 g/l; (+) Glucose 1,0 g/l;
LB-Medium:	Trypton 10,0 g/l; Hefeextrakt 5,0 g/l; NaCl 10,0 g/l
M9-Minimal Medium:	200 ml 5x M9-Salzlösung; 2mM MgSO <sub>4</sub> , 0,1mM CaCl <sub>2</sub> 0,4% (w/v) Kohlenstoff und Energiequelle
5x M9 Salzlösung	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 64 g/l; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 15 g/l; NaCl 2,5 g/l; NH <sub>4</sub> Cl 5 g/l

Für Nährboden wurden der Nährlösung jeweils 1,5% (w/v) Agar-Agar zugesetzt. Die verwendeten Nährlösungen und -böden wurden bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Wenn nötig wurden die Wachstumsmedien mit den Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (25 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) versetzt. Die eingesetzten Steroide wurden, wenn nicht anders angegeben, in Konzentration von 1 mM (gelöst in absolutem Ethanol) den Flüssigmedien zugesetzt.

## 2.6 Enzyme und Kits

Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von New England Biolabs (Frankfurt a. M., Deutschland) und Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland). Die Taq-Polymerase und die T4-Ligase wurde ebenso wie das RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland) bezogen. Weiterhin wurde die Phire-Polymerase wurde von Biozymes/Finzymes (Hessisch Oldendorf, Deutschland) verwendet. Zur Klonierung einzelner PCR-Fragmente wurden mehrere Kits benutzt, hierzu zählten das TOPO TA Cloning® Kit von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), das pGEM®-T Easy Vector System I von Promega (Mannheim, Deutschland) und das CloneJET™ PCR Cloning Kit von Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland). Zur Plasmidreinigung wurde das Plasmid Plus Midi



Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Zur Gelextraktion von DNA-Fragmenten wurde das QIAEX II Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) genutzt.

## 2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standardmäßig wurde die rekombinante Taq-Polymerase (1 u/μl) von Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland) mit dem zugehörigen Puffer (10xPuffer: 750 mM Tris-HCl, pH 8,8, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) Tween 20) verwendet. Weiterhin wurden 1 μl dNTP-Mix (je 25 mM) und 1 μl Primer in der Konzentration 100 pmol/μl für einen 50 μl Ansatz verwendet. Als Template wurden, wenn nicht anders angegeben, aufgereinigte chromosomale DNA von *C. testosteroni* ATCC11996 verwendet. Die genomische DNA wurde mittels Standardmethoden zur Isolierung von DNA gewonnen (Sambrock and Russel 2001). Das Standard-PCR-Programm lautete wie folgt: 94°C 5 Minuten; 27 Zyklen: 94°C 45 Sekunden; 45°C 45 Sekunden; 72°C 45 Sekunden; 72°C 5 Minuten. Weiterhin wurden, wenn nötig, die PCR-Bedingungen über einen Temperaturgradienten oder durch die Verwendung der Phire-Polymerase (Biozymes/Finzymes; Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit den dazugehörigen Puffern angepasst.

## 2.8 Herstellung der Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Vektoren hergestellt. Die Klonierung mittels des TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Mannheim, Deutschland) oder CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) erfolgten nach Herstellerangaben.

### 2.8.1 pBB16teiR

Der Vektor pBB16teiR wurde durch HindIII Restriktionsverdau von pBBtac-teiR-GFP1 und anschließender Re-Ligation hergestellt. Hierzu wurde der Vektor pBBtac-teiR-GFP1, welcher unter Kontrolle des *tac*-Promoter eine *teiR-gfp* Fusion enthält, mit HindIII verdaut. Das Restriktionsenzym wurde durch Hitze (20 Minuten bei 65°C) und Phenol/Chloroform-Behandlung inaktiviert. Der resultierende Ansatz wurde mit T4-Ligase (5 u/μl) versetzt um die Fragmente wieder zu religieren. Nach Transformation der religierten Vektoren in *E. coli* HB101 konnte pBB16teiR selektiert werden.

### 2.8.2 petB-I, petB-II und petN772

Es wurden zwei Fragmente mit den Primerpaaren pIL/pIR und pIIaL/pIIaR amplifiziert. Diese Fragmente wurden erst in pCR2.1TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und anschließend in pet15B kloniert. Hierzu wurden die Restriktionsenzyme NdeI und HindIII für petB-I sowie NdeI und BamHI für petB-II verwendet. Zur Herstellung von petN772 wurde der bereits vorhandene Vektor petteiR1 mit dem Restriktionsenzym NsiI verdaut und religiert.

### 2.8.3 pKteiRA, pKteiRB, pKteiRC

Ausgehend von Plasmid pKteiR10 wurden die Plasmide pKteiRA, pKteiRB und pKteiRC hergestellt. Durch einen partiellen Restriktionsverdau von pKteiR10 mit PstI mit anschließender Ligation der Fragmente konnten verschiedene Versionen des *teiR* Gens erstellt werden, welche nur die 5´ Region des Leserahmens (pKteiRA und pKteiRB) enthalten oder im zentralen Teil deletiert sind (pKteiRC) (siehe Abschnitt 3.2 & Abbildung 7, Abbildung 12).

### 2.8.4 pKteiR567, pKteiR627 und pKteiRΔΨ

Durch Amplifikation mit dem Primer pIII und den reversen Primern pC567r und pC627r wurden jeweils die Fragmente *teiR567* und *teiR627* hergestellt und in pK18 über die Restriktionsschnittstellen XmaI und HindIII kloniert. So konnten die entsprechenden Vektoren pKteiR567 und pKteiR627 generiert werden. Mit den Primern pN627f und pIIb/IIIR wurde ein Fragment der 3´-Region amplifiziert und ebenso wie pKteiR567 mit HindIII restringiert, um nach der Ligation aus Fragment und verdauten Vektor das Plasmidkonstrukt pKteiRΔΨ zu erhalten. Der korrekte Einbau der Fragmente wurde mittels PCR kontrolliert (siehe Abschnitt 3.2 & Abbildung 12).

### 2.8.5 pKteiR846, pKteiR846:936, pKteiR846:888, pKteiR888, pKteiR888:936 und pKteiR888KL

Es wurden mehrere Mutanten von *teiR* hergestellt, welche in der Region zwischen der putativen PAS Domäne und dem Helix-turn-Helix Motiv (HTH) deletiert sind. Durch PCR konnten Fragmente hergestellt werden, die von Nukleotidposition +1 bis 846 bzw. +1 bis 888 reichen. Diese wurden jeweils in pK18 kloniert, die resultierenden Plasmide wurden mit pKteiR846 (Position +1 bis 846) und pKteiR888 (Position +1 bis 888) bezeichnet. Anschließend wurden Regionen (Position 888 bis 1176 und 936 bis 1176), welche das HTH-Motiv umfassen, durch PCR amplifiziert. Die resultierenden Fragmente wurden jeweils mittels der, über die PCR-Primer eingebrachte HindIII Schnittstelle, in die Plasmide pKteiR846 und pKteiR888 kloniert. Die so erhaltenen Plasmide (siehe Abschnitt 3.2&Abbildung 13) pKteiR846, pKteiR846:936, pKteiR846:888, pKteiR888, pKteiR888:936 und pKteiR888KL wurden weiter verwendet. Das Plasmid pKteiR888KL wurde so konstruiert, dass zwei zusätzliche Aminosäuren in der Primärstruktur des TeiR Proteins vorhanden waren. Damit wurde der Abstand zwischen der PAS-Domäne und dem HTH-Motiv um zwei Aminosäuren verlängert.

### 2.8.6 pKN5teiR, pKN8teiR und ptacN5-GFP

Mit den Primern pN5, pN8 und pIIb/IIIR wurden die Fragmente *N5teiR* und *N8teiR* amplifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen XmaI und HindIII in den

Vektor pK18 eingebaut. Aus pBBtac-teiR-GFP1 wurde mit den Primern pN5 und pGFPrev ein Fragment amplifiziert, welches für ein in der 5'-Region deletiertes *teiR-gfp* Fusionsgen kodiert. Anschließend wurde dieses Fragment in pBBtac14 kloniert (siehe Abschnitt 3.1.1.1 & Abbildung 7).

### 2.8.7 pBBtacIII und pBBtacIV

Zur Herstellung von pBBtacIII wurde ein Fragment mit den Primern pIIBL und pIIb/IIIR amplifiziert und in pCR2.1TOPO kloniert. Über die Restriktionsschnittstellen XmaI und HindIII wurde das Fragment in pBBtac14 subkloniert um pBBtacIII zu erhalten. Mit den Primern pIIIL und pIIIM wurde eine DNA-Sequenz aus *C. testosteroni* ATCC11996 amplifiziert, welche sowohl die 5'-Region des *teiR* Leserahmens als auch eine kurze homologe Sequenz der 3'-Region des Leserahmens enthält. Anschließend wurde mit dem erhaltenen Fragment, dem Primer pIIb/IIIR und pKteiR10 als Template das Fragment *teiR/IV* erstellt, welches im zentralen Teil des Leserahmens deletiert ist. Dieses Fragment wurde zuerst in pCR2.1TOPO und anschließend über die Restriktionsschnittstellen XmaI und HindIII in pBBtac14 kloniert um pBBtacIV zu erhalten (siehe Abschnitt 3.1.1, 3.2 & Abbildung 12).

### 2.8.8 pJet-150GFP und pK-150GFP

Zuerst wurde die Region von 528 bp (Position -150 bis 378), welche 150 Nukleotide upstream des ersten ATG und die kurze *gfp* Sequenz enthält, mittels der Primern pPteiR-150fw und pPteiR-150r amplifiziert. Anschließend wurde dieses DNA-Stück als Primer eingesetzt um eine PCR-basierte Fusion zwischen der *teiR* Upstream-Region und *gfp*, welches mittels der Primer pGFP-fw und pGFP-rv zuvor amplifiziert wurde, zu erstellen. Die entstandene Fusion wurde anschließend in das Plasmid pJet1.2 (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) kloniert und konnte als Reporterkonstrukt verwendet werden. Über die Schnittstellen EcoRI wurde das Fusionsgen aus pJet-150GFP und in pK18 kloniert um pK-150GFP herzustellen.

### 2.8.9 pBBtacOrf5315 und pBBtacOrf5348

Aus genomischer DNA von *C. testosteroni* KF-1 wurden mit den Primerpaaren pOrf5315-fw/pOrf5315-rv und pOrf5348-fw/pOrf5348-rv zwei putative Leserahmen amplifiziert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen XmaI und HindIII in den Vektor pBBtac14 kloniert und die Plasmide pBBtacOrf5315 und pBBtacOrf5348 erhalten.

### 2.8.10 pMCS1-PD1500CFP

Um die Lokalisation eines Chemotaxisproteins darzustellen, wurde *orfPD1500* aus *C. testosteroni* ATCC11996 kloniert, dessen Sequenz aus *C. testosteroni* KF-1 abgeleitet wurde. Nach der PCR wurde das *orfPD1500*-Fragment mittels pGemT-easy Kit (Roche,

Mannheim, Deutschland) in den Vektor pGemT-easy kloniert. Anschließend wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRV und HindIII ein *cfp*-Fragment (amplifiziert aus pLau53) in Frame in den Leserahmen von *orfPD1500* kloniert. Aus dem so entstandenen Plasmid pGemPD1500fw-*cfp* wurde das Fusionsgen *orfPD1500-cfp* durch Restriktionsverdau mit XmaI und XbaI hinter den *lac*-Promoter von pBBR1-MCS1 kloniert um das Plasmid pMCS1-PD1500CFP zu erhalten.

## 2.9 Transformation

### 2.9.1 Transformation von *E. coli*

Um *E. coli* (HB101, DH5 $\alpha$  und BL21 (DE3) pLysS) Zellen zu transformieren mussten diese vorher kompetent gemacht werden. Hierzu wurde frisches SIN-Medium oder LB-Medium aus einer Übernachtskultur 1% (v/v) inokuliert und bei 37°C unter schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wurden die Zellen geerntet, in ca. 1/3 Volumen 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 30 Minuten weiter auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Pelletieren der Zellen und Resuspendieren in 1/2 Volumen 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Nach weiteren 30 Minuten auf Eis konnten diese Zellen weiter verwendet werden.

Zu 100  $\mu$ l kompetenten Zellen wurden nun 1-2  $\mu$ l jeweilige Plasmidlösung oder Ligationsansatz gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein 90 Sekunden andauernder Hitzeschock bei 42°C und weitere 5 Minuten auf Eis. Nach der Zugabe von 400  $\mu$ l SIN Medium wurde unter leichtem Schütteln (110 rpm) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf SIN-Agar-Platten oder in SIN-Medium mit entsprechendem Antibiotikum gegeben.

Die Transformation mittels des TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 2.9.2 Transformation von *C. testosteroni*

Um kompetente *C. testosteroni* Zellen herzustellen wurde frisches SIN-Medium aus einer Übernachtskultur 1% (v/v) angeimpft und bei 27°C unter schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wurden die Zellen geerntet, anschließend in 1/3 Volumen sterilem 10% (v/v) Glycerol resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Ernten der Zellen wurden diese wiederum in 1/2 Volumen 10% (v/v) Glycerol aufgenommen und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Parallel zu den Zellen wurde auch die zu transformierende DNA (2-3  $\mu$ g) vorbereitet. Dazu wurde diese mit zwei Volumen absoluten Ethanol gefällt und danach mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Zum DNA-Pellet wurden 100  $\mu$ l kompetente Zellen gegeben und diese fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Elektroporation bei 1,8 kV (MicroPulser

Electroporator, Biorad, München, Deutschland). Der Transformationsansatz wurde direkt mit 400 µl SIN-Medium versetzt und einer Stunde bei 27°C unter leichtem schütteln inkubiert. Zur Herstellung von Integrationsmutanten wurde die Inkubationsdauer auf drei Stunden erhöht. Anschließend wurden die Transformationsansätze auf SIN-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 27°C bebrütet. Die Kontrolle erfolgte über Selektion der Antibiotikaresistenz, Plasmidpräparation und/oder Test-PCR.

## 2.10 Plasmidpräparation

### 2.10.1 Plasmid-Mini Präparation

Zur schnellen Analyse der Plasmid-DNA wurde folgende Methode verwendet (Birnboim and Doly, 1979): Die Zellen wurden aus 0,5 bis 3 ml entsprechender Bakterienkultur geerntet und in 100 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl Lysepuffer (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) zugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100µl Neutralisierungspuffer (3M Na-Acetat, pH 5,5) wurde eine Minute bei 12.000 x g zentrifugiert und der klare Überstand anschließend mit zwei Volumen absolutem Ethanol in einem neuen Reaktionsgefäß überführt. Nach siebenminütiger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet leicht getrocknet und anschließend in 10 µl TE Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) oder Wasser<sub>bidest</sub> aufgenommen.

### 2.10.2 Plasmid-Midi Präparation

Zur Herstellung größerer Mengen eines Plasmids wurden 30 bis 50 ml SIN Medium mit *E. coli* HB101 oder DH5α mit jeweiligem Plasmid beimpft und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Zellernte, wurde zur Isolierung und Reinigung das Plasmid Plus Midi Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

## 2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um den Proteingehalt einer Probe bestimmen zu können, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Hierzu wurde in 20 µl Volumen eine Verdünnungsreihe mit BSA in Wasser im Bereich 0,25 bis 1 mg/ml erstellt. Die Proben wurden ebenfalls in einem Volumen von 20 µl im Verhältnis 1:10 oder 1:5 mit Wasser verdünnt oder, wie im Falle der isolierten Membranproteine, unverdünnt eingesetzt. Zu diesen Proben wurden 980 µl 1:5 verdünnter Bradford-Lösung (Biorad, München, Deutschland) gegeben und im Anschluss für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Proben wurde bei 595 nm im Photometer (Kontron Instruments, Düsseldorf, Deutschland) gemessen. Anhand der BSA-Standardreihe konnte die Proteinkonzentration in den Proben berechnet werden.

## 2.12 Proteinisolierung

Zur Analyse wurden Proteine sowohl aus dem Cytoplasma als auch aus Membranfraktionen isoliert.

### 2.12.1 Cytosolische Proteine

Um die löslichen, hauptsächlich cytosolischen Proteinbestandteile aus *E. coli* und *C. testosteroni* zu isolieren, wurde die Zellintegrität mittels Einfrieren und Auftauen zerstört. Die Zellen der entsprechenden Kulturen wurden zentrifugiert und das Pellet in ca. 10% des ursprünglichen Volumens Puffer B (100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, pH 8,0) aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension mindestens dreimal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut. Die löslichen Proteinbestandteile wurden durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 14.000 x g von der unlöslichen Fraktion getrennt. Das Pellet enthielt nun Zellbruchstücke und vor allem Membranen mit daran assoziierten bzw. integrierten Proteinen, die falls nötig, weiter verwendet wurden. Der Überstand mit den cytosolischen Proteinen wurde separiert und dessen Proteingehalt bestimmt.

### 2.12.2 Isolierung von Membranassoziierten Proteinen

Die Membranfraktion mit den assoziierten und integrierten Proteinen wurde analog zum Protokoll für die cytosolischen Proteine gewonnen (siehe oben, 2.12.1). Die Zellen wurden geerntet und in B-Puffer resuspendiert. Durch Einfrieren und Auftauen wurde auch hier die Zellintegrität zerstört. Lösliche Bestandteile wurden durch anschließende Zentrifugation von den Membranbruchstücken und Zellfragmenten getrennt. Das entstandene Pellet wurde zunächst mit 100 µl Wasser<sub>bidest</sub> gewaschen und dann mit Extraktionslösung (Puffer B + 1% (w/v) SLS) für 30 Minuten unter starkem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (20 Minuten, 14.000 x g), der Überstand separiert und dessen Proteingehalt bestimmt.

### 2.12.3 Überexpression

Um größere Mengen bestimmter Proteine zu erhalten wurden deren jeweilige Gene heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS überexprimiert. Hierzu wurde ein entsprechender Vector (pET15b und Derivate) in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert. Ausgehend von einer Übernachtskultur wurden drei oder 30ml SIN-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) 1% (v/v) angeimpft und bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,8 wurden 1 mM IPTG (Endkonzentration) als Induktor zugegeben und die Kultur mindestens vier Stunden weiter inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und aufgeschlossen. Hierzu wurde das Pellet in 200 µl Puffer B (100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, pH 8,0) resuspendiert und durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren aufgeschlossen. Die Suspension wurde für 20 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Aus dem Überstand konnten mittels Nickel-Affinitäts

Chromatographie die gewünschten Proteine später isoliert werden. Dazu wurden die Ni-NTA Spin Columns (Qiagen; Hilden, Deutschland) mit den dazugehörigen Lösungen und Puffer des Herstellers verwendet. Zur Reinigung von TeiR wurde als Modifikation den Puffern C und E 1% (w/v) Natrium-Lauryl-Sarkosinat (SLS) zugesetzt. Nach der Elution der gewünschten Proteine wurde mittels Bradford-Assay die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proben wurden über SDS-Page analysiert und bei -20°C gelagert.

### **2.13 Agarosegelelektrophorese**

Für die Agarosegelelektrophorese wurden je nach Fragmentgröße ein 0,8 oder 1,5 % (w/v) Agarosegel nach Standardmethoden (Sambrock and Russel 2001) verwendet. Die aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden mit entsprechendem Volumen Ladepuffer (Sambrock and Russel 2001) versetzt und 30 bis 60 Minuten bei einer Spannung von fünf bis 10 Volt pro cm aufgetrennt. Das Agarosegel fünf bis 20 Minuten in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und fünf bis 20 Minuten in Wasser entfärbt. Anschließend erfolgte die Visualisierung.

### **2.14 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Zur Proteinanalyse wurden diese über die Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt. Hier wurden Standardmethoden (Sambrock and Russel 2001) verwendet. Die Analyse der entsprechenden Proben erfolgte über ein 4% ((w/v) Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1) Sammelgel und 12% ((w/v) Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1) Trenngel. Die eingesetzten Proteine wurden bei 15 bis 20 mA aufgetrennt. Anschließend wurde das Trenngel mindestens 30 Minuten mit Coomassie gefärbt. Zur Entfärbung wurde 10 % (v/v) Essigsäure verwendet.

### **2.15 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**

Der Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) wurde im 96-Mikrotiterplatten-Format durchgeführt. Dazu wurden 10 µl vorher isoliertes Protein (1 mg/ml) in 1 ml Coating Puffer ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  8 g/l,  $\text{NaHCO}_3$  2,93 g/l,  $\text{NaN}_3$  0,2 g/l, pH 9,6) verdünnt und in vier Replika zu jeweils 200µl pro Well eingesetzt. Außerdem wurde eine Standardreihe mit gereinigtem HsdA oder TeiR 200 ng/ml bis 6,25 ng/ml in Coating Puffer erstellt und in jeweils 2 Replika vermessen. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer (10 x Wasch-Puffer; NaCl 80 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  2 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_3(12\text{H}_2\text{O})$  29 g/l, KCl 2 g/l, Tween 20 5 ml/l pH 7,4) gewaschen und gegen primäre Antikörperlösung (1:1000 Prim.AK in Waschpuffer; 200 µl/Well) ausgetauscht. Der primäre Antikörper, sowohl für HsdA, als auch für TeiR, stammt aus Kaninchen und wurde zuvor in der Arbeitsgruppe hergestellt. Nach weiteren 30 Minuten bei 37°C wurde die Platte erneut gewaschen und 200 µl pro Well der sekundären Antikörper-Lösung (1:1000 Sek. AK-HRP Konjugat in

Waschpuffer) zugegeben. Der mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelte sekundäre Antikörper aus Schwein wurde von Daco (Glostrup, Dänemark) bezogen. An die 30 minütige Inkubation bei 37°C schloss sich ein dreimaliges Waschen der Platte an. Anschließend wurde das HRP-Substrat ABTS (Roche; Mannheim, Deutschland) zugegeben (100 µl/Well) und für mindestens 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Mikrotiterplatte im Lesegerät vermessen (iMark Mikrotiterplaterreader, Biorad; 405 nm; Referenz 495 nm). Danach konnten die Werte für die Proben mit denen des Standards verrechnet werden.

## 2.16 Testosteronbindeassay

Zur Determination der Testosteron-Bindungsregion von TeiR wurde ein Ansatz mit Tritium markiertem Testosteron ([1,2,6,7-<sup>3</sup>H] Testosteron (1 mCi / ml) (Amersham/GE Healthcare; München, Deutschland) gewählt.

In vorangegangenen Arbeiten (Paulsen 2006) wurde gezeigt, dass das TeiR-Protein allein nur geringe bzw. keine Bindungsaktivität gegenüber Tritium markiertem Testosteron aufweist.

Daher wurde die Bindungsaktivität von TeiR bzw. verschiedenen Deletionsmutanten anhand von isolierten Membranfragmenten aus vorher transformierten *E. coli* HB101 nachgewiesen. 3 ml frisches SIN-Medium, wenn nötig mit entsprechendem Antibiotikum, wurden mit 1% (v/v) aus einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> von 1 wurden 400 µl Kultur entnommen und die Zellen wurden (14.000 x g, 1 Minute) geerntet. Der Kulturüberstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 100 µl Wasser mit 1 µl 0,1 mg/ml Lysozym resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen wurde die Probe dreimal abwechselnd für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und bei -20°C eingefroren. Um nun die löslichen Zellbestandteile abzutrennen wurde die Probe 20 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde erneut in 100 µl Wasser aufgenommen und mindestens 60 Sekunden gevortext. Jeweils 5 µl dieser Suspension wurden für einen Assay verwendet. Dazu wurden 0,1 µl [1,2,6,7-<sup>3</sup>H] Testosteron (1mCi/ml) (Amersham/GE Healthcare; München, Deutschland) mit 5 µl 0,4x TEN Puffer (10xTEN-Puffer: 1 M NaCl, 0,01 M EDTA, 0,1 M Tris-HCl, pH 8.0) gemixt und der Zellmembransuspension zugegeben. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben auf 1 cm<sup>2</sup> große Stücke Whatman-Filterpapier aufgetragen. Die Papierstücke wurden anschließend auf die Waschapparatur (siehe Abbildung 6) gelegt.



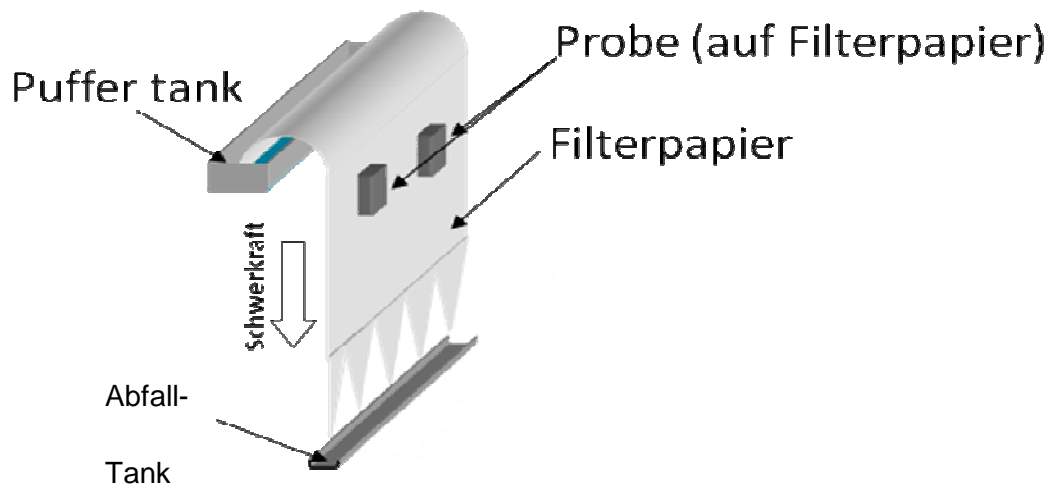


Abbildung 6 Wasch-Apparatur

Die Proben auf dem Whatman-Filterpapier wurden so für mindestens zwei Stunden mit Waschpuffer (0,4x TEN-Puffer) gewaschen.

Danach wurden die Filterpapierstücke in Scintillationsgefäße und jeweils mit 3 ml Scintillationsreagenz (NOCS104, Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) überführt und mindestens zweimal 15 Sekunden gevortext. Anschließend wurden die Proben im Wallac 1409 Counter vermessen.

Als Kontrollen wurden ein Leerplasmid (pK18) und ein Plasmid (pKteiR10) mit komplettem *teiR* Gen mitgeführt. Aufgrund schwankender Werte der Einzelerperimente untereinander, wurden die erhaltenen Werte der Deletionsmutanten in Verhältnis zum Wildtyp gesetzt. Darum spiegelt ein relativer Wert das Maß der Testosteronbindung der einzelnen Deletionsmutanten wieder.

## 2.17 Kinaseassay

Der Kinaseassay wurde nach Gohler et al (Gohler et al. 2008) wie folgt durchgeführt. In 10  $\mu$ l Reaktionsmischung wurden je nach Reaktionsbedingung 4  $\mu$ g cytoplasmatisches Protein und/oder 1  $\mu$ M gereinigtes TeiR Protein mit 0,01  $\mu$ l [ $\gamma^{32}$ P]-ATP (10 mCi/ml) oder 0,01  $\mu$ l [ $\gamma^{32}$ P]-GTP (10 mCi/ml) (Amersham Biosciences (Freiburg, Germany)/Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim, Deutschland) in 5 mM Tris-HCl oder 0,5 x Kinasepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,55, 5% (v/v) Glycerol, 50 mM NaCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,125 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT; (Weber and Jung 2006)) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Effektoren der Kinasefunktion wurden in verschiedenen Konzentrationen cGMP und cAMP zugesetzt. Die Effektoren wurden zu den einzelnen Ansätzen gegeben und ebenfalls 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für Stabilitäts-Untersuchungen wurden weiterhin 5  $\mu$ l 2 M HCl oder 5  $\mu$ l 2 M NaOH zugegeben und wiederum 30 Minuten inkubiert. Die Proben wurden

anschließend auf ein 1 cm<sup>2</sup> großes Stück 3MM Whatmann-Filterpapier getropft und gewaschen (Vergleich zu 2.16 und Abbildung 6). Die Radioaktivität wurde nach drei Stunden im Wallac 1409 Counter vermessen.

## 2.18 RT-PCR und semiquantitative PCR

Zur Analyse der Transkriptionslevel wurde die RNA aus *C. testosteroni* ATCC11996 isoliert. Hierfür wurden die Zellen in unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, wie z.B. in Anwesenheit von Testosteron oder 1,4-Androstadien-3,17-dion, kultiviert. Um die Abhängigkeit in der Regulation nachzuweisen wurde zudem die *teiR* defiziente Mutante *C. testosteroni* kol verwendet. Die Zellen wurden bei 27°C schütteln d inkubiert. Als Medium wurde SIN verwendet, dem je nach Versuch 1,1 mM Testosteron oder 1,1 mM 1,4-Androstadien-3,17-dion zugesetzt waren. Nach 6, 9, 12 und 24 Stunden wurden jeweils 1,5 ml Proben für die RNA Isolierung entnommen, pelletiert, bei -80°C eingefroren oder sofort weiter verwendet. Zudem wurde der Gehalt an Testosteron bzw. 1,4-Androstadien-3,17-dion im Medium per HPLC (siehe 2.21) bestimmt. Hierfür wurden 0,5 ml Kultur entnommen.

Das Zellpellet wurde in 1 ml TRIzol (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach 2 bis 3 Minuten wurde bei 12.000 x g für 15 Minuten und bei 4°C zentrifugiert und die entstandene Epiphase zu 500 µl Isopropanol gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (12.000 x g; 10 Minuten; 4°C) wurde das RNA-Pellet zweimal mit 75% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl Wasser (DEPC-behandelt) resuspendiert und konnte in einer 1:30 Verdünnung quantifiziert und darauf folgend bei -80°C eingefroren werden. Um mögliche Kontaminationen durch DNA zu verringern, wurden 2 µg der isolierten RNA mit 45 Minuten bei 37°C mit Dnase RQ1 (Promega) verdaut. Der 20µl Ansatz wurde mit 2 µl Stop Solution (Promega) versetzt und die DNase 10 Minuten bei 65°C inaktiviert. Mit Hilfe de s RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland) wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde dem DNase Verdau jeweils 12,4 µl Mastermix zugegeben. Der Mastermix enthielt:

1 µl Random Hexamer Primer (Promega)	6,9 µl 5x Reaction Puffer <sup>1</sup>
0,5 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (20 U/µl) <sup>1</sup>	3 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM) <sup>1</sup>
1 µl RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl) <sup>1</sup>	

1) Inhalt des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Fermentas

Der Ansatz wurde nun 5 Minuten bei Raumtemperatur und 60 Minuten bei 42°C inkubiert, bevor die Reverse Transkriptase bei 70°C und 5-minütiger Inkubation inaktiviert wurde. Als Negativkontrolle wurden zudem 2 µg isolierte RNA mit Dnase RQ1 verdaut (so.) und anschließend mit RNase I (10 u/µl) (Fermentas) analog zur Reversen Transkription behandelt. Es wurden verschiedene Gene zur Analyse der Zusammenhänge in der Steroid-abhängigen Regulation gewählt. Zum Nachweis wurden eine PCR gewählt, wobei jeweils 2 µl cDNA-Bank für 50 µl PCR Ansatz eingesetzt wurden. Tabelle 6 zeigt die jeweiligen Gene und die entsprechenden PCR-Bedingungen der jeweiligen Reaktionen.

Tabelle 6 PCR-Charakteristika der semiquantitativen PCR

Gen	Funktion	Primer (Größe des PCR- Produktes)	Polymerase	Zyklus- zahl	PCR-Programm
<b>rpoZ</b>	Ω-Untereinheit der RNA-Polymerase / House-Keeping Gen	rpoZ-H1-22 / rpoZ214-revKF-1 (193 bp)	Taq <sup>2</sup>	25	95°C 5 min; [95°C 30sec; 61°C 45sec; 72°C 45sec] x25; 72°C 5 min
<b>hsdA</b>	HsdA / 3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Carbonylreduktase	hsdA-fw/hsdA-rev (381bp)	Taq <sup>2</sup>	35	95°C 5min; [95°C 30sec; 61°C 45sec; 72°C 45sec] x35; 72°C 5 min
<b>tesH</b>	TesH/ Δ <sup>1</sup> Dehydrogenase	tesH770_H1 /tesHrev1082_KF-1 (313bp)	Phire <sup>2</sup>	35	98°C 30 sec[98°C 10sec; 47,5°C 20 sec; 72°C 15 sec]x35 72°C 30sec
<b>tesB</b>	TesB/2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase	tesB747 h1/ tesB931rev (155 bp)	Taq <sup>2</sup>	35	95°C 5min; [95°C 30sec; 53°C 35sec; 72°C 30sec]x35; 72°C 5 min
<b>tesD</b>	TesD/Hydrolase	TesH770/ h1tesHrev10 (302 bp)	Phire <sup>2</sup>	35	98°C 30 sec[98°C 10sec; 47,5°C 20 sec; 72°C 15 sec]x35 72°C 30sec
<b>actA</b>	ActA/ Testosteron-abhängiger Regulator	act1b / act2 (585bp)	Phire <sup>2</sup>	30	98°C 30 sec[98°C 10sec; 47,5°C 20 sec; 72°C 15 sec]x35 72°C 30sec
<b>teiR</b>	TeiR/ Testosterone inducible Regulator	pN2/pIR (394 bp)	Taq <sup>1</sup>	35	95°C 5min; [95°C 30sec; 61°C 45sec; 72°C 45sec]x35; 72°C 5 min

<b>lysR</b>	LysR-Typ	lysR_fwP3 /	Phire <sup>2</sup>	35	98°C 30 sec[98°C 10sec; 53°C 20 sec; 72°C 15 sec]x35 72°C 30sec
	Regulator	lysR_revP5 (460 bp)			
<b>orfPD</b> <b>1500</b>	Putativer Aerotaxis Sensor	PD1500-fw/ PD1500-rev (1545 bp)	Phire <sup>2</sup>	35	98°C 30 sec[98°C 10sec; 53°C 20 sec; 72°C 15 sec]x35 72°C 30sec
<b>fliG</b>	Komponente der Flagellenmotors	FliG-fw / FliG-rev (996 bp)	Phire <sup>2</sup>	35	98°C 30 sec[98°C 10sec; 53°C 20 sec; 72°C 15 sec]x35 72°C 30sec

1) Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland) 2) Biozymes/Finzymes (Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Nach der PCR wurden die Proben, je 7,5 µl pro PCR-Ansatz, durch Gelelektrophorese (0,8% (w/v) Agarosegel mit 1:10000 GelRed, Biotium, Hayward, USA) aufgetrennt und analysiert. Hierzu wurde die Intensität der jeweiligen Banden mit dem Programm LabImage 1D von Kapelan (Leipzig, Deutschland) analysiert und quantifiziert. Die Bandenintensität wurde anhand eines quantifizierten Standards (Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland) bestimmt und auf die jeweiligen gemessenen Werte von *rpoZ* bezogen. Anhand des Wertes von *rpoZ* von *C. testosteroni* ATCC11996 nach neun Stunden wurden die gemessenen Werte normalisiert. Anschließend wurde der DNA-Gehalt in eine pmol umgerechnet.

## 2.19 Solution Based Sandwich Hybridization (SBSH)

Die Methode der „Solution based Sandwich Hybridization“ (SBSH) wurde verwendet um die spezifische Anzahl von mRNA bestimmen zu können. Hierzu wurden Zellen von *C. testosteroni* ATCC11996 und die *teiR* überexprimierende Mutante *C. testosteroni* pBB16*teiR* verwendet. Die jeweiligen Zellen wurden mit/ohne 0,5 mM Steroid in SIN Medium bei 27°C kultiviert. In Zeitintervallen wurden jeweils 1 ml Kultur entnommen, mit 10% (v/v) Stop Solution versetzt (-20°C; 5% (v/v) Phenol; 95% (v/v) Ethanol) und anschließend die Zellen geerntet. Die Zellpellets wurden bis zu ihrem Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die Methode nach Thieme et al (Thieme et al 2008) wurde hierzu für *C. testosteroni* ATCC11996 und *C. testosteroni* KF-1 optimiert. Die Keim-Bildenden Einheiten (KBE) wurden jeweils vor und nach Ultraschallbehandlung zu den jeweiligen Wachstumsphasen bestimmt. Anhand der gewonnenen Daten konnte der Ultraschallaufschluss für *C. testosteroni* angepasst werden. Das Zellpellet wurde in 135 µl Wasser (DEPC-behandelt) und 15 µl Stop Solution resuspendiert und auf Eis gehalten. Die Zellen wurden durch drei Ultraschallimpulse zu je 5 Sekunden aufgeschlossen. Das Lysat

wurde nun bei 4°C 5 Minuten zentrifugiert (20.800 x g) und der Überstand zu je 20 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die weitere Behandlung erfolgte nach dem Protokoll von Thieme et al (Thieme et al. 2008) Die Fluoreszenz wurde im Tecan M200 (Tecan, Österreich) bei 485 nm Anregungswellenlänge bei 530 nm gemessen. Die SBSH Versuche wurden im Labor von Prof. Dr. G. Grass an der Universität Nebraska-Lincoln durchgeführt.

## 2.202D-Gelelektrophorese

250 µg cytosolisches Protein wurden zuerst mit Rehydratisierungspuffer (8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 32,5 mM CHAPS, 28,38 mM DTT, 2% (v/v) IPG Puffer) auf 350 µl aufgefüllt und anschließend in die IPG-Streifen (pH Bereich 4-7) über Nacht einquellen gelassen. Dabei wurden die Streifen von 1-2 ml DryStrip Cover Fluid (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bedeckt. Nach dem Einquellen wurden die Streifen mit ultrapure H<sub>2</sub>O gereinigt.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte anschließend in der Elektrophoresekammer Multiphor II (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) unter Kühlung auf 20°C. Die IPG-Streifen wurden in die Kammer gelegt, wobei das Ende mit dem niedrigeren pH-Wert zur Anode zeigt. Die Enden wurden jeweils mit in Wasser getränkten IEF-Streifen abgedeckt. Zudem wurde ein weiterer Streifen in 1 mM DTT getränkt und an der Kathode auf die IPG-Streifen gelegt. Abschließend wurden die Streifen mit 70-80 ml DryStrip Cover Fluid (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bedeckt und das IEF-Protokoll gestartet.

IEF-Protokoll:

Stufe	Spannung (V)	Stromstärke	Leistung	Voltstunden
1	0 → 500	max 1mA	max 5 W	1000Vh
2	500	max 1mA	max 5 W	2000Vh
3	500 → 3500	max 1mA	max 5 W	10000Vh
4	3500	max 1mA	max 5 W	35000Vh

Nach der Fokussierung wurden die IPG-Streifen gereinigt und bei -80°C eingefroren oder sofort weiter verwendet.

Die IPG Streifen wurden in ca. 5 ml Äquilibriumspuffer A (50 mM 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerol, 4% (w/v) SDS, 64,85 mM DTT) überschichtet und für 15 Minuten darin geschwenkt. Anschließend wurde der Puffer gegen Äquilibriumspuffer B (50 mM 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerol, 4% (w/v) SDS, 135,16 mM Iodacetamid) ausgetauscht und ebenfalls 15 Minuten inkubiert. Danach wurden die IPG-Streifen mit Wasser gespült und auf, schon vorher präparierte, SDS-Gele (11% (w/v)

Acrylamid) gesetzt. Nachdem die IPG-Streifen auf das Gel gesetzt wurden, konnte das Gel mit 1% (w/v) Agarose versiegelt und in der Gelkammer verankert werden. Es wurde eine Leistung von 1,5 Watt pro Gel angelegt und die Elektrophorese für ca. 23 Stunden durchgeführt. Die Gelfärbung erfolgte mit jeweils 400 ml Färbelösung (1 Tablette Phas Gel® Blue R Coomassie R 350 stain) und für mindestens drei Stunden, danach wurden die Gele für zwei Stunden mit Entfärbelösung (30% (v/v) Methanol / 10% (v/v) Essigsäure / Wasser) entfärbt. Anschließend wurde die Entfärbelösung ausgetauscht und die Gele wurden über Nacht in der Lösung inkubiert. Vor der Analyse der Gele wurden die Entfärbelösung gegen Wasser (ultrapure) ausgetauscht. Anschließend konnten die Gele eingescannt und bei 4°C weiter gelagert werden.

Die Analyse der Gele erfolgte mit dem Programm DELTA 2D 3.4 (Decodon, Greifswald, Deutschland). Mit Hilfe dieses Programms wurden Laufunterschiede zwischen den Gelen entfernt und zudem virtuelles Fusionsgel erstellt. Anhand dieses Fusionsgels wurden einzelne Proteinspots markiert, auf die Ursprungsgel übertragen und anschließend über die optische Dichte quantifiziert.

## **2.21 HPLC**

Um die Steroide nachzuweisen, wurden die Proben zweimal mit 2 Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt und anschließend mit Ethylacetat in einer Vakuumzentrifuge evaporiert. Das entstandene Pellet wurde in 10% des ursprünglichen Probenvolumens mit Laufpuffer (50% (v/v) Acetonitril in Wasser) resuspendiert. Jeweils 1 µl wurde auf eine C-18 Säule (5 µm Porendurchmesser; 1 ml/min Flussrate) gegeben und mittels HPLC analysiert. Der Nachweis der Steroide erfolgte mittels Absorptionsmessung bei 254 nm. Die Steuerung der HPLC als auch die Auswertung wurde mit dem Programm EZChrome Elite (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt.

## **2.22 Mikroskopie**

Die mikroskopische Betrachtung der GFP bzw. CFP-Konstrukte erfolgte durch ein Olympus FV500 Upright (Olympus BX60) Mikroskop im Mikroskopiezentrum des Beadle Center der University of Nebraska-Lincoln.

## **2.23 Bioinformatische Analysen**

Für die Analysen der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden die Programme BLASTN 2.2.22+ (NCBI;(Zhang et al. 2000)), BLASTP 2.2.23+ (NCBI; (Altschul et al. 2005)) ClustalW2 (EMBL-EBI; (Larkin et al. 2007)) und iTol (EMBL-Heidelberg; (Letunic and Bork 2007)) verwendet.

### 3 Ergebnisse

Zur Untersuchung und Charakterisierung von TeiR wurden verschiedene Herangehensweisen gewählt. Es wurden biochemische Analysen an TeiR als auch Untersuchungen in den Modellorganismen *E. coli* und *C. testosteronei* durchgeführt. Die Wirkung von TeiR konnte somit auf ausgewählte Transkripte, auf Teilbereiche des Proteoms und auf den Steroidstoffwechsel untersucht werden. Zudem wurden erste Untersuchungen zum Steroidstoffwechsel an *C. testosteronei* KF-1 und an zwei putativen LysR-Typ Regulatoren aus *C. testosteronei* KF-1 durchgeführt.

#### 3.1 Untersuchungen des TeiR-Proteins

##### 3.1.1 Membranlokalisierung von TeiR

Vorangegangene Experimente, in denen die Lokalisation eines TeiR-GFP Fusionsproteins in *E. coli* und *C. testosteronei* ATCC11996 untersucht wurden, zeigten eine polare Lokalisation in *C. testosteronei* ATCC11996 (Siehe 1.3.4 (Gohler et al. 2008)). Um die Determinanten für diese Lokalisation zu bestimmen, wurden weitergehende Untersuchungen durchgeführt.

##### 3.1.1.1 Verteilung von TeiR in *E. coli*

Da vorangegangene Experimente keine polare Lokalisation von TeiR in *E. coli* HB101 zeigten, wurde zunächst die Membranassoziation bzw. die Membranbindung untersucht. Es konnte mittels Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) festgestellt werden, dass sich eine höhere Menge TeiR Protein in der Membranfraktion der Zellen befindet. Hierzu wurden verschiedene Detergenzien zum Separieren von TeiR und Membranbestandteilen verwendet. Natrium Lauroyl Sarkosinat (SLS) zeigte dabei die besten Resultate (Gohler et al. 2008). Anschließend konnte die Menge an TeiR innerhalb der aus der Membranfraktion isolierten Proteine sowohl für transformierte *E. coli* HB101 als auch für *C. testosteronei* ATCC11996 bestimmt werden (Tabelle 7).

Tabelle 7 Analyse der TeiR-Lokalisation mittels ELISA

Probe	Cytolisches TeiR [µg/mg cytosol. Protein]	Membranassoziiertes <sup>1</sup> TeiR [µg/mg membran. Protein]
<i>E. coli</i> pBBtac16teiR	3,69 (±0,08)	12,46 (±0,15)
<i>C. testosteronei</i> ATCC11996	0,106 (±0,01)	2,97 (±0,08)
<i>C. testosteronei</i> ATCC11996 (1 mM Testosteron) <sup>2</sup>	0,098 (±0,02)	0,56 (±0,1)

Inkubation 16 Stunden bei 37°C bzw. 27°C in SIN Medium; 1) mit SLS ausgewaschenes Protein; 2) Inkubation mit 1mM Testosteron (Startkonzentration)

Aus den gewonnenen Daten lässt sich erkennen, dass jeweils eine höhere Menge TeiR in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnte. Selbst in transformierten *E. coli* HB101 konnte TeiR in der Membranfraktion als auch im Cytoplasma nachgewiesen werden, wobei hier ein Verhältnis von rund 3:1 zwischen Membran und Cytoplasma bestand. Weiterhin zeigten *C. testosteronei* Zellen nach der Inkubation mit Testosteron geringere Mengen an TeiR in der Membranfraktion. Das Verhältnis zwischen Membran und Cytosol betrug hier ca. 5,6:1. Dagegen war in *C. testosteronei* Zellen ohne Testosterongabe ein wesentlich höheres Verhältnis von ca. 30:1, also mehr membranassoziiertes TeiR-Protein, nachweisbar.

Es wurden Varianten von TeiR hergestellt, in denen ein Teil des N-Terminus deletiert war. Diese *teiR*-Derivate wurden in *E. coli* unter Kontrolle des *lac*-Promoters (Plasmid pK18) exprimiert. Die Menge an TeiR wurde anschließend mittels ELISA im Cytoplasma bestimmt.



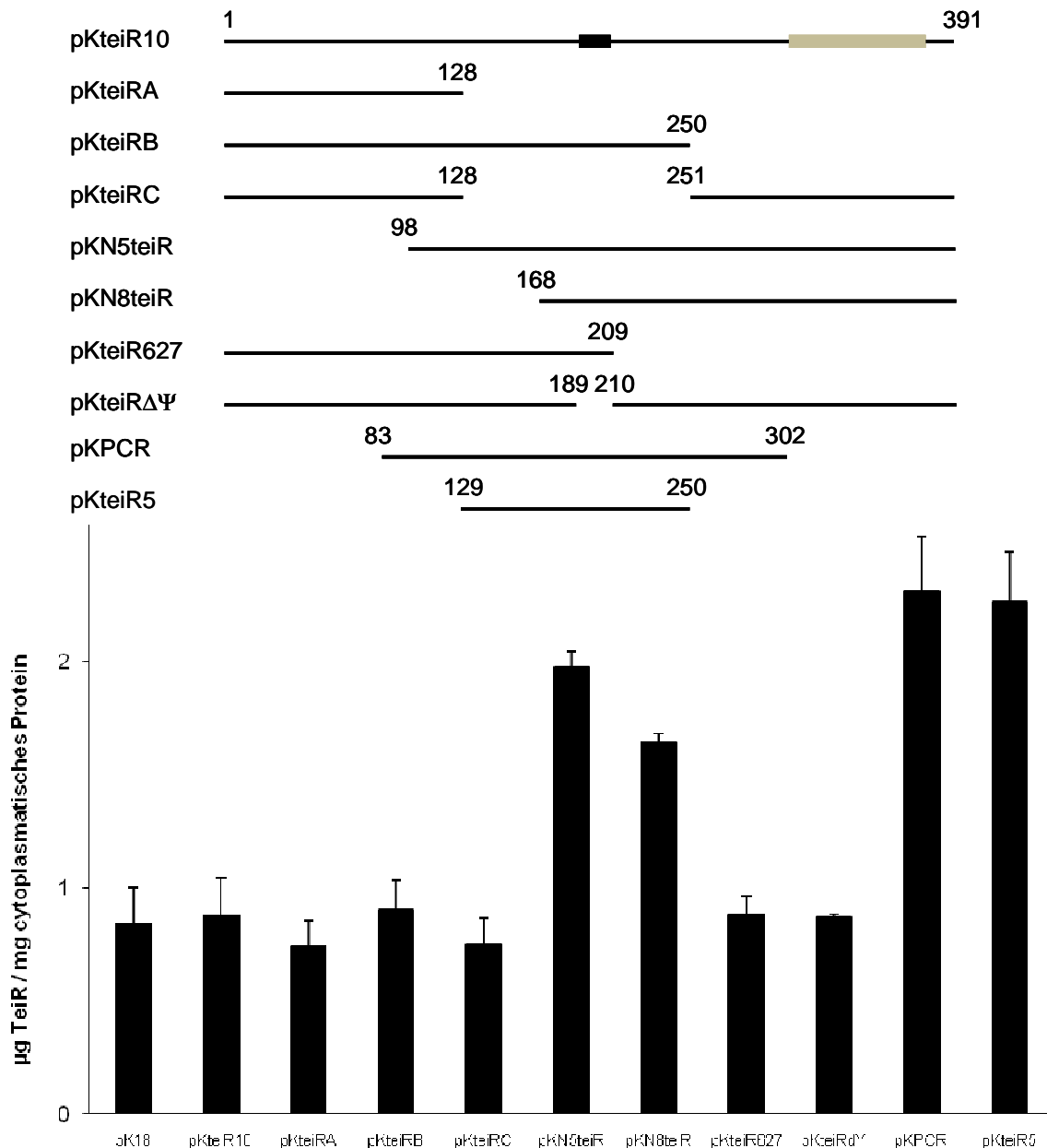


Abbildung 7 TeiR Menge im Cytoplasma von *E. coli* HB101; angegeben sind die Vektoren mit den ersten und/ oder letzten Aminosäure-Positionen der jeweiligen Inserts und die entsprechende Menge TeiR im Cytoplasma; Schwarze Box hydrophobe Region; Graue Box Helix-turn-Helix Motiv

Es konnte festgestellt werden, dass Deletionen im N-Terminus von TeiR eine Erhöhung des cytoplasmatischen TeiR-Gehalts zur Folge haben. Dies zeigt sich vor allem bei den Vektoren pKN5teiR und pKN8teiR im Vergleich zu pKteiR10 und dem Fehlen der N-terminalen Sequenz bei den entsprechenden Proteinen. Demzufolge bedingt in *E. coli* eine Sequenz des N-Terminus eine Lokalisation an der bakteriellen Membran. Die Deletion dieser Sequenz, die sich innerhalb der ersten 294 bp bzw. 98 Aminosäuren verbirgt, führt zu einem Verbleib des Proteins im Cytoplasma der Zelle.

### 3.1.1.2 TeiR Lokalisation in *C. testosteroni* ATCC11996

Es konnte bereits mittels einer TeiR-GFP-Fusion gezeigt werden, dass TeiR eine polare Lokalisation in *C. testosteroni* ATCC11996 hat. Für weiterführende Untersuchungen wurde die im 5'Ende deletierte *teiR*-Version N5teiR ebenfalls mit *gfp* fusioniert, um eine im N-Terminus deletierte TeiR-GFP-Fusion zu erhalten. Dieses Fusionsprotein wurde in *C. testosteroni* ATCC11996 unter Kontrolle des *tac*-Promoters exprimiert und die Lokalisation des Fluoreszenzsignals untersucht. Abbildung 8 zeigt fluoreszenzmikroskopische Bilder von *E. coli*- und *C. testosteroni*-Transformanten.

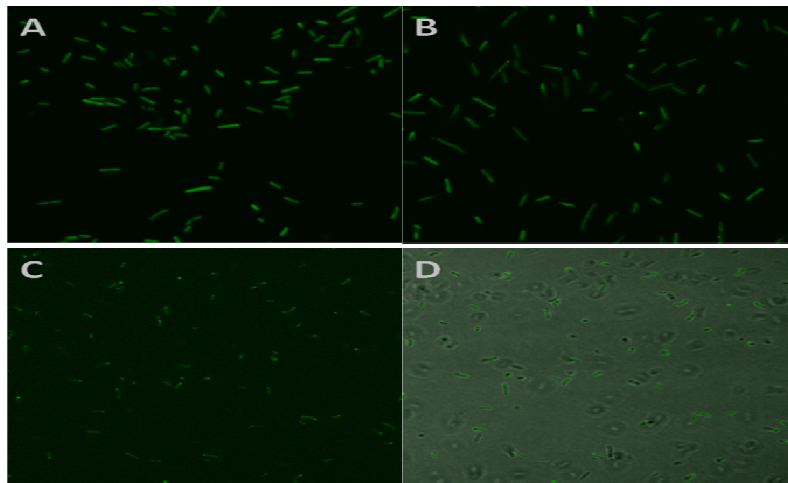


Abbildung 8 GFP-Fluoreszenz der TeiR-GFP Konstrukte; (A) *E. coli* ptacN5teiRGFP (B) *E. coli* pBB16teiRGFP (C) und (D) *C. testosteroni* ptacN5teiRGFP; (A-C) GFP-Fluoreszenz (D) GFP-Fluoreszenz/Lichtmikroskopie

Aus Abbildung 8 ist zu erkennen, dass das N-terminal deletierte Fusionsprotein N5-TeiR-GFP sowohl in *E. coli* als auch in *C. testosteroni* fluoresziert. Bei *E. coli* konnte weder bei der Referenz (Abbildung 8 B; *E. coli* pBB16teiRGFP) als auch bei der N-terminalen Deletionsmutante (Abbildung 8 A; *E. coli* ptacN5teiRGFP) eine polare Lokalisierung nachgewiesen werden. Damit konnten vorausgegangene Ergebnisse, in denen für TeiR in *E. coli* bisher keine polare Lokalisation gefunden wurde, bestätigt werden (Gohler et al. 2008). Allerdings konnte in mit ptacN5teiRGFP transformierten *C. testosteroni* (Abbildung 8 C& D) gezeigt werden, dass auch die im N-Terminus deletierte Variante des TeiR-Proteins polar lokalisiert ist. Jedoch konnte eine schwache Fluoreszenz auch im Cytoplasma beobachtet werden. Wie auch bei TeiR-GFP (Gohler et al. 2008) ist die Fluoreszenz von N5-TeiRGFP an einem Zellpol konzentriert. Da in *E. coli* allerdings das vergleichbare Protein N5TeiR (ohne fusioniertes GFP) im Gegensatz zu TeiR im Cytoplasma nachgewiesen werden konnte (Gohler et al. 2008), deutet dies auf einen möglichen weiteren Faktor für die membranständige bzw. polare Lokalisation hin.

Als Vergleich der Lokalisation von TeiR wurde auch die Lokalisation des Proteins PD1500 (Gen: *orfPD1500*) untersucht. Laut Sequenzanalyse kodiert *orfPD1500* für einen Aerotaxis-Sensor und gehört in die Gruppe der meist polar-lokalisierten Methyl-akzeptierenden Chemotaxis-Proteine (MCP). Aus der Genomsequenz von *C. testosteroni* KF-1 wurden Primer abgeleitet und die entsprechende Sequenz kloniert. Das *orfPD1500*-DNA-Fragment wurde in den Vektor pBBR1MCS1 (Kovach et al 1995) ligiert und mit *cfp* (Cyan Fluoreszierendes Protein) fusioniert. Anschließend wurde *C. testosteroni* ATCC11996 mit dem Vektor pMCS1-PD1500CFP und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

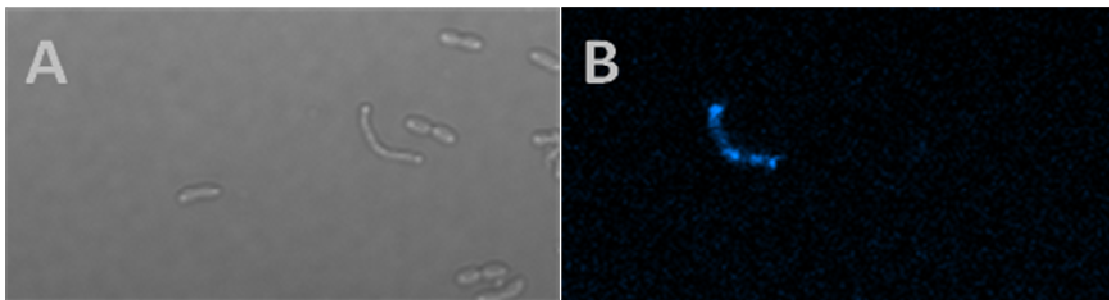


Abbildung 9 Fluoreszenzmikroskopie von *C. testosteroni* pMCS1-PD1500CFP; (A) Lichtmikroskopie (B) Fluoreszenzmikroskopie

Anhand der Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass PD1500 eine polare Lokalisation aufweist. Allerdings konnte eine Aggregation der Cyan-Fluoreszenz an beiden Zellpolen beobachtet werden, wobei die Transformationseffizienz von *C. testosteroni* als relativ gering anzusehen war. Insgesamt ist die Lokalisation von PD1500 mit der von TeiR zu vergleichen.



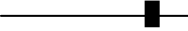

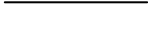
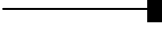
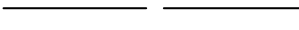
### 3.1.2 Testosteronbindung und Bindemotive

Durch das Testen verschiedener Deletionsmutanten des TeiR-Proteins konnte die Region identifiziert werden, welche sich für die Bindung von  $^3\text{H}$ -Testosteron verantwortlich zeigt. Da die Bindung von Testosteron Membranbestandteile benötigt, wurden alle Messungen mit isolierten Membranen von *E. coli*-Kulturen durchgeführt. Die mit verschiedenen Plasmiden transformierten Zellen wurden, nach Erreichen einer Optischen Dichte von 1, aufgeschlossen und die Membranfraktion isoliert. Als Kontrollen wurden ein Leerplasmid (pK18) und das Plasmid pKteiR10 mitgeführt, welches das komplette *teiR*-Gen enthielt.

Bedingt durch schwankende Werte in den Einzelexperimenten wurde ein relativer Wert als Maß für die Testosteronbindung verwendet. Dieser Wert gibt die Bindung von Testosteron an die Deletionsmutante im Verhältnis zur Bindung an die Positivkontrolle (pKteiR10) an. Demnach weist die Positivkontrolle (pKteiR10) einen Wert von „1“ und die Negativkontrolle

(pK18) einen Wert von „0“ auf. Tabelle 8 stellt die ermittelten Werte den jeweiligen Deletionsmutanten gegenüber.

Tabelle 8 relative  $^3\text{H}$ -Testosteron Bindung von TeiR

Name	Übersicht über die Primärstruktur	Relative Bindung von $^3\text{H}$ -Testosteron
pK18		0
pKteiR10		1
pKteiRA		0.19 $\pm$ 0.1 (4)
pKteiRB		<b>1.4 <math>\pm</math> 0.1</b> (3)
pKteiRC		0.34 $\pm$ 0.05 (3)
pKteiR567		0.21 $\pm$ 0.05 (3)
pKteiR627		<b>2.7 <math>\pm</math> 0.1</b> (3)
pKteiR $\Delta\Psi$		0.19 $\pm$ 0.05 (3)

$\pm$  Mittelwert der relativen Standardabweichungen der Einzelexperimente;

(n) Anzahl der Einzelexperimente;

■ Hydrophobe Region zwischen den Resten 189 und 209

In Tabelle 8 ist zu erkennen, dass nur bestimmte Teile des TeiR-Proteins in der Lage sind Testosteron in zu binden.

Ausgehend von den Ergebnissen der Testosteronbindung von *E. coli* pKteiRA, pKteiRB und pKteiRC konnten weitere Deletionen erstellt werden. Die Membranfraktion von *E. coli* pKteiRB war im Gegensatz zu *E. coli* pKteiRA oder *E. coli* pKteiRC in der Lage Testosteron zu binden. Anhand dieser drei Fragmente konnte gezeigt werden, dass eine Region zwischen den Aminosäureresten 129 und 250 für die Testosteronbindung verantwortlich ist. In diesem Teilstück befindet sich auch eine, durch einen Kyte Doolittle Hydrophathie-Plot (Kyte and Doolittle 1982) identifizierte, hydrophobe Region, welche die Aminosäurereste 189 und 210 umschließt. Um einen Zusammenhang zwischen hydrophober Region und Testosteronbindung zu prüfen, wurden zwei Deletionsmutanten des C-Terminus von TeiR und eine Deletion der hydrophoben Region erstellt und anschließend in pK18 kloniert. Die resultierenden Plasmide codierten für unterschiedliche Bereiche innerhalb des TeiR-Proteins, pKteiR567 codiert für 1-189 aa, pKteiR627 codiert für 1-209 aa und pKteiR $\Delta\Psi$  codiert für eine Fusion der Bereiche 1-189 aa und 210-1176 aa. Es zeigte sich, dass nur

Proteinfragmente, die eine vollständige hydrophobe Region zwischen den Aminosäureresten 189 und 210 enthielten, imstande waren Testosteron zu binden.

Anhand der relativen Bindung im Vergleich zum Wildtyp konnte gezeigt werden, dass die hydrophobe Region zwischen den Aminosäureresten 189 und 209 für die Bindung von Testosteron verantwortlich ist. Diese 20 Aminosäuren umfassende Region wurde mit der NCBI-Datenbank verglichen. Nach einer vergleichenden Sequenzanalyse wurde mittels neighbor-Joining Verfahren ein phylogenetischer Baum berechnet.

A

CtesDRAFT_PD0431 (208-228)	VMSLYSSVTARLMVGWVILD	20
CtCNB2_4158 (222-252)	VMSLYSTVTARLMVGWVILD	20
TeiR (189-210)	VISLYSKATAQLMVGWVILD	20
FJ890932 (189-210)	VISLYSKATAQLMVGWVILD	20
CtCNB2_1292 (213-233)	VISLYSKATAQLMVGWVILD	20
TesR (203-223)	VISLYSKATAQLMVGWVILD	20
CtesDRAFT_PD3723 (213-233)	VISLYSKATAQLMVGWVILD	20
CtesDRAFT_PD3044 (218-238)	VISLYGRATAQLMMGWVILD	20
CtCNB2_1823 (214-234)	VISLYGRATAQLMMGWVILD	20
Tter_2748 (311-331)	----TAQLDYNTMMGWVIL-	15
Spea-2135 (181-201)	LGSMYSQAIGRLSIATIKID	20
Shal_2107 (181-201)	LGSMYSQAIGRLSIATIKID	20
TeiR_PHTac125 (181-201)	LGSLYSRAIGRLSIATITID	20

B

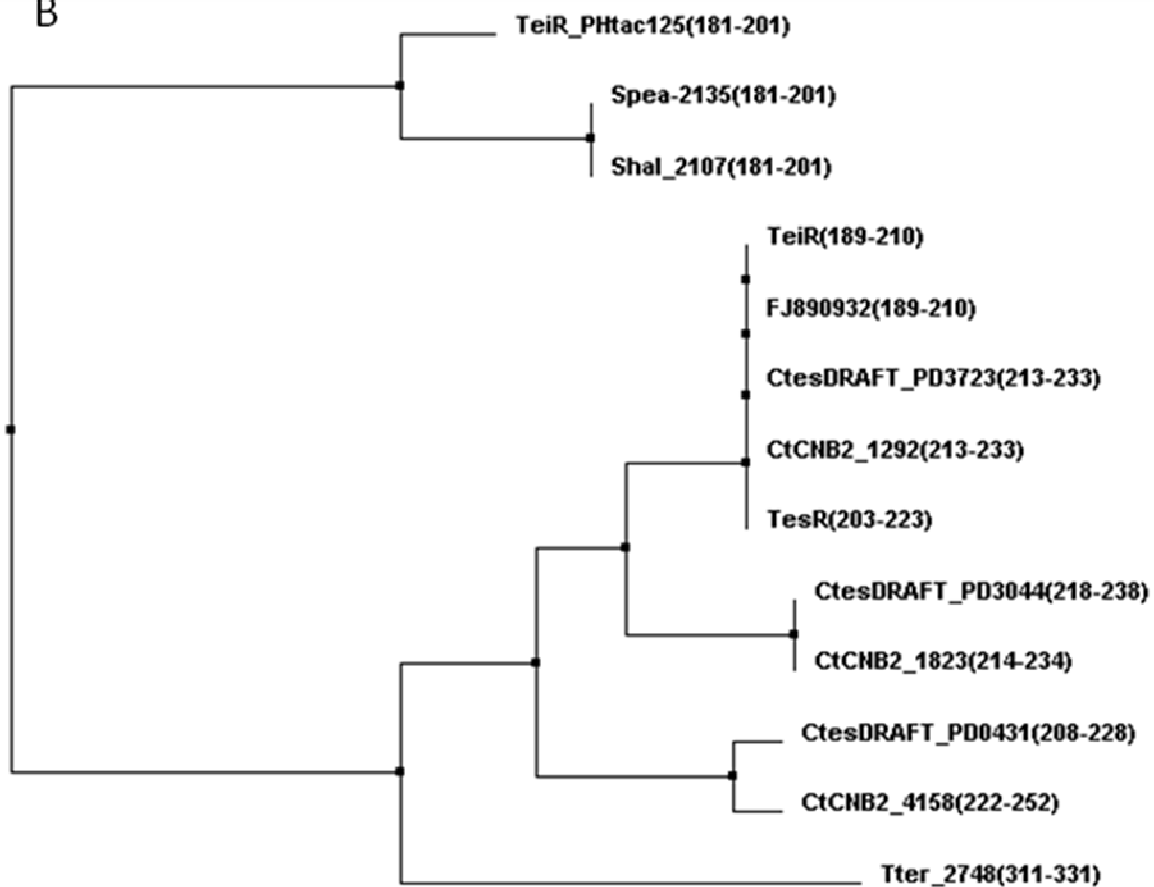


Abbildung 10 Phylogenetischer Analyse der hydrophoben Region von TeiR; (A) Alignment; (B) phylogenetischer Baum (Neighbor Joining Verfahren); TeiR\_Phtac125 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 TeiR homolog, Spea-2135 *Shewanella pealeana* ATCC700345 Orf2135, Shal\_2107 *Shewanella halifaxiensis* HAW-EB4 Orf2107, TeiR *C. testosteroni* ATCC11996 TeiR, FJ890932 *C. testosteroni* AMCa3 TeiR, CtesDRAFT\_PD3723/3044/0431 *C. testosteroni* KF-1 Orf3723/3044/0431, CtNB2\_1292/1823/4158 *C. testosteroni* CNB2, TesR *C. testosteroni* TA441, Tter\_2748 *Thermobaculum terrearrum* ATCC BA798 Orf2748, in Klammern Aminosäureposition

Laut Sequenzanalyse ist die hydrophobe Region von TeiR auch in andern TeiR-Homologen des Genus *Comamonas* zu finden ist. Auf Proteinebene weist die untersuchte Region von TeiR (Stamm ATCC11996) keine Unterschiede zu den anderen *C. testosteroni* Stämmen TA441, AMCa3, KF-1 und CNB2. Zudem konnten in *C. testosteroni* KF-1 und CNB2, mit, CtesDRAFT\_PD3044/CtCNB2\_1823 und CtesDRAFT\_PD0431/CtCNB2\_4148, jeweils zwei weitere Sequenzen gefunden werden, die untereinander sehr ähnlich sind, jedoch eine Identität zum TeiR-Protein von jeweils nur 85% und 80 % auswiesen. Allerdings scheint hier der C-terminale Teil der hydrophoben Region („MVGVVILD“ in TeiR) besonders konserviert. Mit 68% Identität auf Aminosäure-Ebene konnte eine Proteinregion des Gram-positiven Bakteriums *Thermobaculum terrearum* ATCC BA798 identifiziert werden.

Das über bioinformatische Methoden identifizierte TeiR-Protein des  $\gamma$ -Proteobakteriums *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 zeigte nur minimale Identität mit der hydrophoben Region von TeiR (*C. testosteroni* ATCC11996) und ist in einer Gruppe mit den entsprechenden Proteinregionen aus *Shewanella pealeana* ATCC700345 und *Shewanella halifaxiensis* HAW-EB4 zu finden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine, für die Testosteronbindung benötigte, Region in TeiR nur in Bakterien des Genus *Comamonas* bzw. nur der Art *C. testosteroni* gefunden werden konnte und das in *C. testosteroni* KF-1 und CNB2 weitere hypothetische Proteine mit ähnlichen Regionen existieren, deren Funktionen noch unklar sind.

### 3.1.3 Kinasefunktion von TeiR

Vorangegangene Untersuchungen führten zu der möglichen Annahme, dass TeiR als Kinase an der Steroid-abhängigen Signaltransduktion teilnehmen könnte. So wurde für das TeiR Protein ein Kinaseassay erarbeitet. Hierzu wurden 1  $\mu$ M rekombinantes TeiR zusammen mit radioaktivem [ $\gamma^{32}$ P]-ATP oder [ $\gamma^{32}$ P]-GTP verwendet. Nachdem die Verwendung von [ $\gamma^{32}$ P]-ATP keine positivem Resultate lieferte, wurde auch [ $\gamma^{32}$ P]-GTP getestet. Bei der alleinigen Anwesenheit von TeiR im Reaktionsansatz wurde keine Phosphorylierung detektiert. Allerdings konnten unter zusätzlicher Zugabe von 4  $\mu$ g cytosolischen Proteinen mit [ $\gamma^{32}$ P]-GTP Phosphorylierungereignisse nachgewiesen werden.

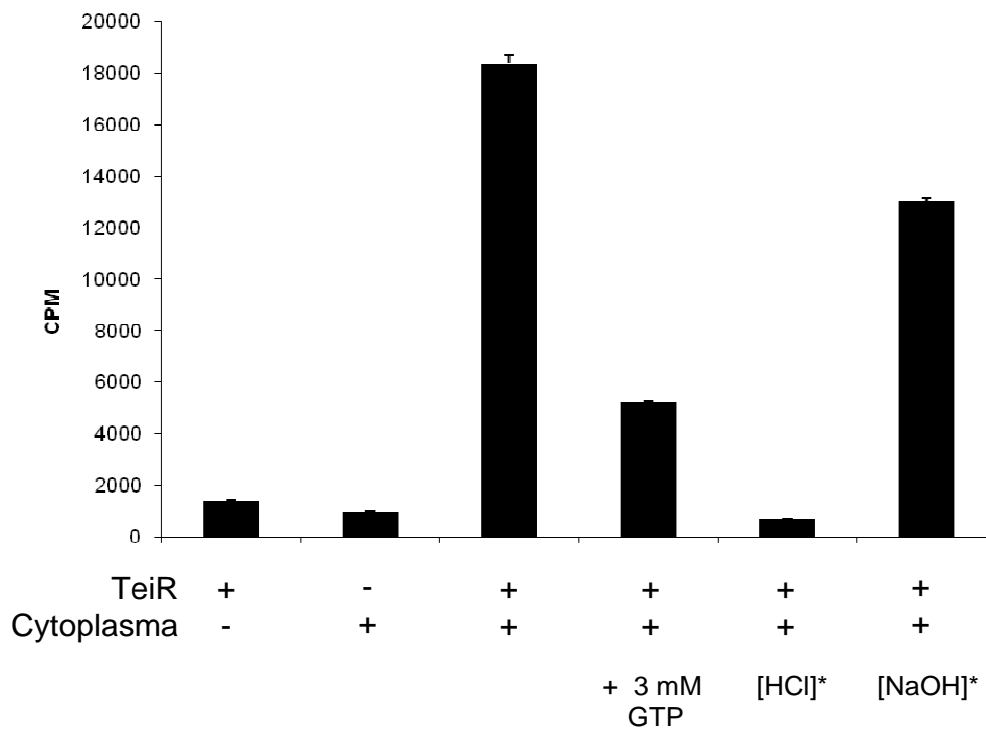


Abbildung 11 TeiR als Histidinkinase; 1  $\mu$ M TeiR mit/ohne 4  $\mu$ g cytosolischem Protein; [3 mM GTP\*] Zugabe von 3 mM "kaltem" GTP während des Tests, [HCl]/[NaOH] Zugabe von 5  $\mu$ l 2 M HCl/NaOH nach 30 Minuten Inkubation

Abbildung 11 zeigt, dass im Ansatz mit TeiR und cytosolischem Protein eine erhohnte Radioaktivität messbar war. Dies weist auf eine durch TeiR katalysierte Phosphorylierung oder TeiR-abhängige Phosphorylgruppenubertragung hin. Weiterhin ist es möglich die Intensität des Signals durch Zugabe von nicht radioaktiv markiertem GTP abzuschwächen. Das Beeinflussen des pH-Wertes im Reaktionsansatz hatte auch einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit des radioaktiven Signals. Es ist zu erkennen, dass ein niedriger pH Wert zu einem fast vollständigen Verlust der Signalintensität führt. Da Histidylphosphat als einziges Aminosaurephosphat unter sauren Bedingungen nicht stabil ist (Besant and Attwood 2009), deutet dies auf einen phosphorylierten Histidinrest hin. Unter basischen Bedingungen war eine geringe Minderung des Signals messbar.

Zudem wurde sowohl der rekombinant hergestellte N-Terminus (Aminosäure 1-257), als auch der C-Terminus (Aminosäure 251 bis 391) von TeiR auf Kinaseaktivität untersucht. Die Analyse der ersten 257 Aminosäurereste zeigte keine deutliche Steigerung. Damit kann der N-Terminus als Ursache der Phosphorylierung ausgeschlossen werden. Die Untersuchung des C-Terminus ergab eine Steigerung des radioaktiven Signals um den Faktor ca. 5- 17,2:1 zwischen dem C-Terminus mit cytosolischem Protein und dem C-Terminus allein. In der Analyse mit ausschließlich cytosolischem Protein war nur eine geringe Radioaktivität zu messen. Damit scheint der C-Terminus für die Histidin-Kinasefunktion von TeiR verantwortlich zu sein.



### 3.2 TeiR-Aktivität

Um die Aktivität von TeiR untersuchen zu können, wurde ein Aktivitätsassay für TeiR angewendet. Hierbei wurden Plasmide, welche verschiedene Versionen von *teiR* trugen, zusammen mit dem Reporterplasmid p6 in *E. coli* HB101 kotransformiert. Das Reporterplasmid p6 enthält den *hsdA*-Kernregulationscluster (Xiong et al. 2001; Xiong et al. 2003c) mit den Genen der Repressoren *repA* und *repB* aus *C. testosteronei* ATCC11996. Die kotransformierten *E. coli* Zellen wurden 16 Stunden inkubiert und anschließend die cytosolischen Proteine isoliert. Die Expression von *hsdA* (Gen der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Carbonylreduktase) wurde mittels ELISA bestimmt. Durch die Expression von *hsdA* kann somit auf die *in vivo* Aktivität der unterschiedlichen TeiR-Mutanten geschlossen werden.

Es zeigte sich, dass TeiR ohne die Anwesenheit von Testosteron oder anderen Steroiden in der Lage ist, die Expression von *hsdA* vom Plasmid p6 zu induzieren. Unter TeiR Einfluss konnten im Mittel 15,82  $\mu$ g HsdA pro mg cytosolisches Protein im Vergleich zu 4,9  $\mu$ g HsdA pro mg cytosolisches Protein nachgewiesen werden.

Anhand dieser Werte wurde die relative Induktion der einzelnen TeiR Mutanten ermittelt und miteinander verglichen. Dabei wurde die Negativkontrolle (pK18/p6) mit dem Wert „0“ und der Einfluss des nativen TeiR (pKteiR10/p6) mit dem Wert „1“ gleichgesetzt.

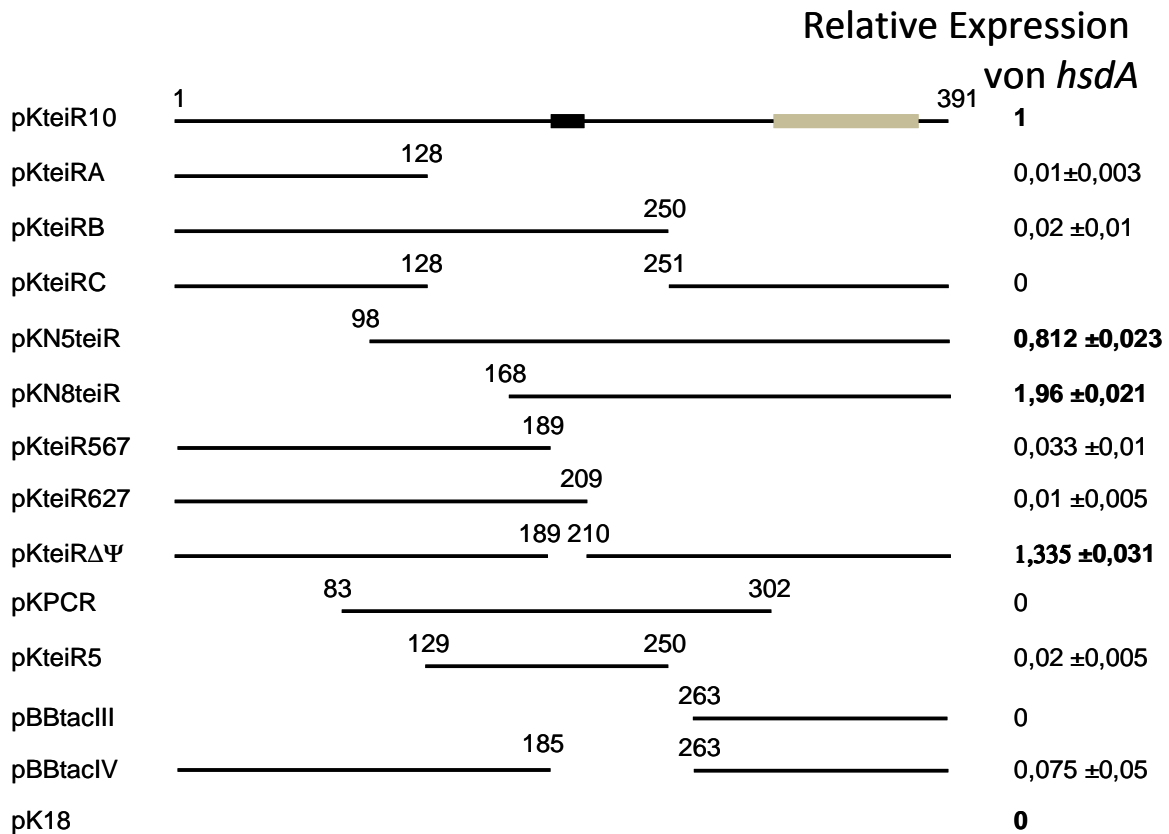


Abbildung 12 Ergebnisse des Aktivitätstests der TeiR-Mutanten; Zahlen geben Aminosäurereste an; Schwarze Box hydrophobe Region; Graue Box hypothetisches HTH-Motiv

Die Abbildung 12 zeigt die Aktivität der TeiR Mutanten. Die Deletion größerer Bereiche des C-Terminus führte in allen Fällen zu einem Verlust der Aktivität. Vor Allem aus dem Vergleich von pKteiRA, pKteiRB und pKteiRC zu pKteiR10 war zu erkennen, dass die Deletion des zentralen Bereiches (Aminosäurereste 129 bis 250) ebenso zum Verlust der Funktion führt wie durch eine Deletion des C-Terminus (Aminosäurereste 251 bis 391). Die Analyse von pKteiR5 und pKPCR zeigte keine Aktivität im zentralen Proteinteil (Aminosäurereste 129 bis 251 in pKteiR5 und Reste 83 bis 301 in pKPCR). Auch der C-Terminus war nicht in der Lage die *hsdA* Expression *in vivo* zu induzieren. Die Deletion der N-terminalen Sequenz führte dagegen nicht zu einem Verlust der Aktivität, wie an den Ergebnissen von pKN5teiR und pKN8teiR zu erkennen ist. Auch die Deletion der hydrophoben Region (Aminosäurereste 190 bis 209 in pKteiRΔΨ) im zentralen Teil des Proteins führte in diesem Testsystem nicht zu einer Abschwächung oder Verlust der *hsdA* Induktionsaktivität von TeiR. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass TeiR für die Induktion von *hsdA* in *E. coli* mehrere Proteinregionen benötigt. Zum einen muss der C-Terminus vollständig vorhanden sein und zum anderen ist eine zentrale Region notwendig. Diese zentrale Region umfasst auch die bereits beschriebene Testosteron-Binderegion, welche aber selbst ohne Aktivitätsverlust im *E. coli*-Testsystem deletiert werden kann.

Die Plasmide pKteiR846, pKteiR846:936, pKteiR846:888, pKteiR888, pKteiR888:936 und pKteiR888KL wurden eingesetzt, um den Einfluss des Abstands zwischen dem zentralen Proteinteil, welcher laut bioinformatischer Analyse (Pruneda-Paz et al. 2004a) eine PAS – Domäne enthält, und dem putativen HTH-Motiv zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene Bereiche zwischen den beiden Regionen deletiert bzw. im Falle des Vektors pKteiR888KL wurden die Aminosäuren Lysin (K) und Leucin (L) an der Aminosäureposition 296 (Basenpaar 888) eingefügt. Es wurde wiederum das Reporterplasmid p6 eingesetzt und die Expression von *hsdA* als Indikator für die TeiR-Aktivität verwendet.

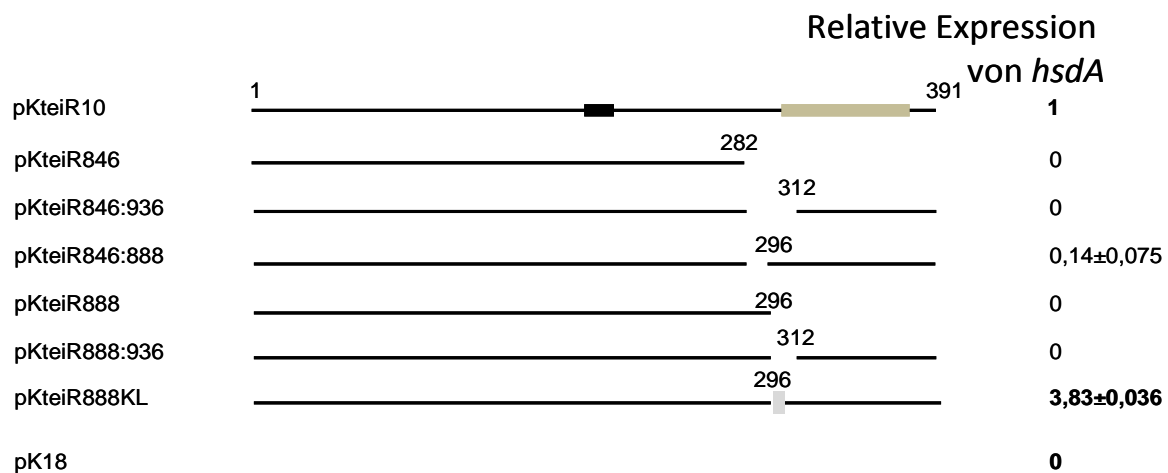


Abbildung 13 Ergebnisse des Aktivitätstest der TeiR-Mutanten; Zahlen geben Aminosäurereste an; Schwarze Box hydrophobe Region; Graue Box hypothetisches HTH-Motiv; Hellgraue Box Eingefügte Aminosäuren Lysin (K) und Leucin (L) an Aminosäureposition 296

Aus Abbildung 13 ist zu erkennen, dass eine Deletion der Region ab der Aminosäure 282 (Basenpaar 846) bzw. Aminosäure 296 (Basenpaar 888) einen Verlust der Aktivität zur Folge hat. So wird deutlich, dass der C-Terminus für die Aktivität von TeiR unabdingbar ist. Das Einfügen eines Fragments (Basenpaar 936 bis 1174), welches das HTH-Motiv (Basenpaar 939 bis 1144) enthält, führte, wie anhand von pKteiR846:936 und pKteiR888:936 zu erkennen war, nicht zu einer Wiederherstellung der Aktivität im Reportersystem. Des Weiteren war auch bei dem Konstrukt pKteiR846:888 keine, zur Kontrolle signifikant erhöhte, *hsdA* Expression zu erkennen. Es zeigte sich aber auch, dass durch pKteiR888KL die Expression von *hsdA* induziert werden konnte. Daher scheint eine minimale, zwei Aminosäuren zusätzlich umfassende Änderung der Primärstruktur keinen oder möglicherweise einen steigernden Einfluss auf die TeiR Aktivität zu haben. Bei den hier eingefügten Aminosäuren, Lysin und Leucin, handelt es sich um Reste, die in dieser Region des TeiR Proteins wahrscheinlich zu keinen größeren strukturellen Unterschieden führen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich eine Deletion des interdomänen Bereiches zwischen PAS und HTH-Motiv negativ auf die Aktivität von TeiR auswirkt. Als ein

Grund wäre zum einen der verminderte Abstand zwischen beiden Regionen zu vermuten, welcher bei einer Übertragung des Signals nach der Anlagerung des Steroids an die Steroidbinderegion (Basenpaar 567-627) über die PAS-Domäne zum HTH-Motiv nötig ist. Somit könnte durch den verringerten Abstand eine Konformationsänderung möglicherweise nicht weitergeleitet werden oder eine Dimerisierung war sterisch nicht mehr möglich. Ein anderer Grund könnte eine bisher nicht näher beschriebene funktionelle Region innerhalb der deletierten Bereiche sein, welche für die Funktion von TeiR nötig ist.

Zur Analyse des C-terminalen Teils von TeiR wurden auch Insertionsmutanten von *C. testosteroni* ATCC11996 erstellt. Hierzu wurden verkürzte Varianten von *teiR* amplifiziert und in pCR2.1-TOPO kloniert. Anschließend wurden diese Vektoren in *C. testosteroni* ATCC11996 transformiert und durch die anschließende Integration in das Genom entstanden im 3'Ende des *teiR*-Leserrasters verkürzte Sequenzen. Diese wurden dann auf *hsdA* Induzierbarkeit untersucht und sind in Abbildung 14 dargestellt.

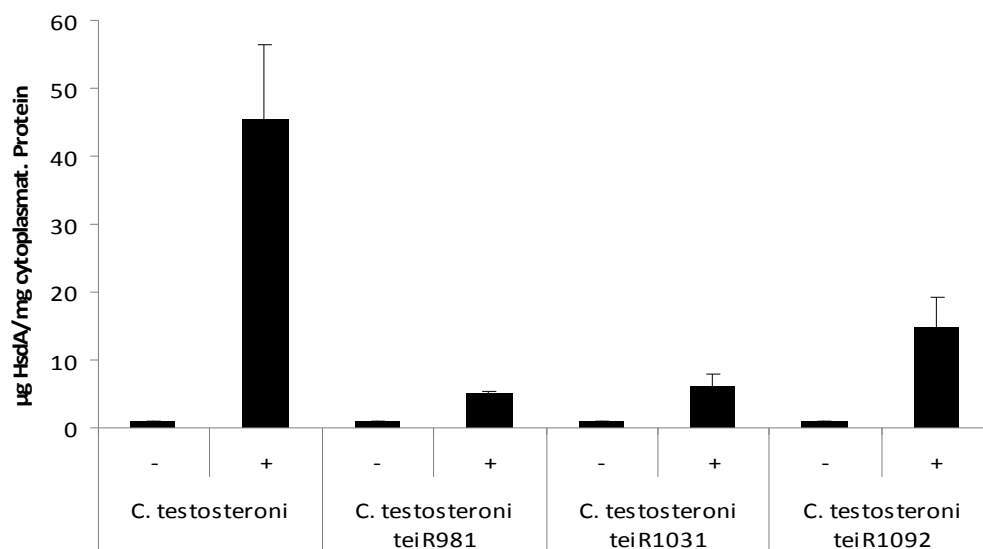
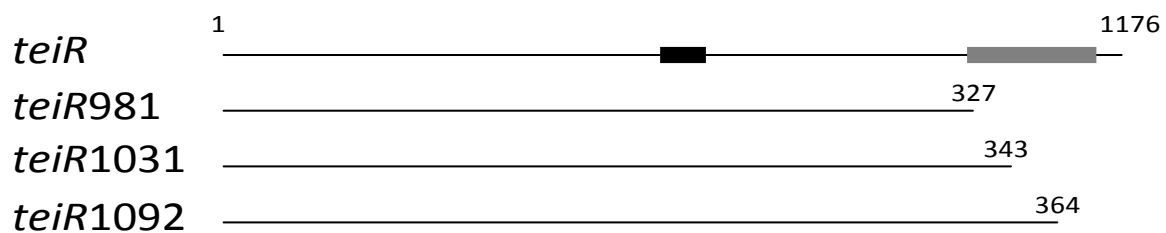


Abbildung 14 Analyse der *hsdA* Induzierbarkeit in *C. testosteroni*-Mutanten; Schwarze Box hydrophobe Region; Graue Box hypothetisches Motiv, Zahlen sind Nukleotidangaben; - Inkubation unter Standardbedingungen; + Inkubation mit 1 mM Testosteron im Medium (Startkonzentration)

Anhand der drei Integrationsmutanten (siehe Abbildung 14) konnte untersucht werden, inwieweit sich eine Deletion der 3'Region im Gen bzw. des C-Terminus auf die

Eigenschaften von *teiR*/TeiR *in vivo* auswirkt. Es zeigte sich, dass alle drei Mutanten unter Einfluss von Testosteron eine geringere Menge HsdA zu bilden vermochten. Allerdings zeigt die Mutante *teiR1092*, bei der nur 84 Nukleotide (28 Aminosäuren) deletiert wurden, unter Testosteron-Einfluss einen höheren Expressionslevel von *hsdA* als die Kontrolle. Auch die Mutanten *teiR981* und *teiR1031* waren in der Lage, *hsdA* Testosteron-abhängig zu exprimieren. Aber die Konzentrationen an HsdA waren im Vergleich zum Wildtyp sehr deutlich reduziert. Daher ist auch *in vivo* in *C. testosteronei* ATCC11996 die 3'Region des *teiR* Leserahmens wichtig.

### 3.3 Analyse putativer TeiR-abhängiger Transkripte

Um die Abhängigkeit verschiedener Gene zur TeiR Aktivität zu zeigen, wurden die Mengen der jeweiligen mRNA bestimmt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA verschiedener Zustände (Wachstumsstadien bzw. zusätzliche Steroidgabe) des *C. testosteronei* Wildtyps und der *teiR* defizienten Mutante kol isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt. Durch PCR mit spezifischen Primern und daraus resultierenden Mengen der PCR-Produkte konnte nun auf die Expressionsraten bzw. die mRNA-Level geschlossen werden. Als Standard wurde die Expression bzw. das Transkriptlevel von *rpoZ* herangezogen. Bei RpoZ handelt es sich um die  $\omega$ -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase. Diese ist für die Rekrutierung der  $\sigma$ -Faktoren und die Assemblierung des Transkriptionskomplexes nötig. Die Expressionsrate ist in den Zellen nahezu gleich (Thieme et al 2008). Auch die Sequenz von *rpoZ* in den Stämmen KF-1 und ATCC11996 weist eine sehr hohe Homologie auf (98% Identität), sodass die verwendeten Primer für beide Stämme benutzt werden können. Es wurden die Gene der im Steroid-Stoffwechsel involvierten 3 $\alpha$ -HSD/CR, *hsdA*, der im Testosteronabbau initialen 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase, *tesH*, der A-Ring spaltenden 2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase, *tesB*, und die einer Hydrolase, *tesD*, untersucht. Weiterhin wurden auch die Gene der Regulatoren TeiR (*teiR*) und ActA (*actA*) sowie eines LysR-Typ Regulators (*lysR*) downstream von *hsdA* untersucht.

Die Abbildung 15 zeigt eine Übersicht der betreffenden Gencluster, welche die untersuchten Gene beinhalteten.

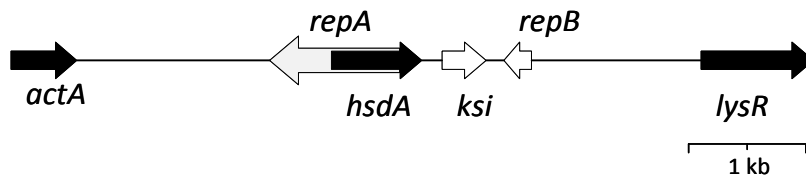
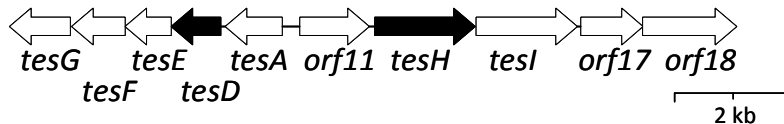
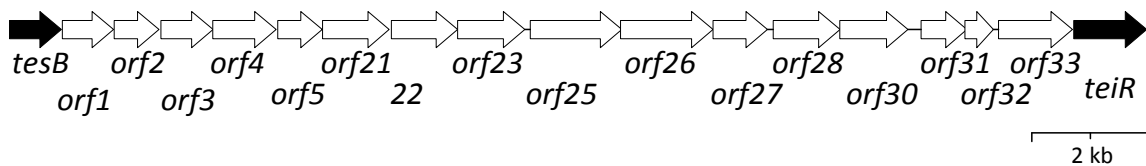
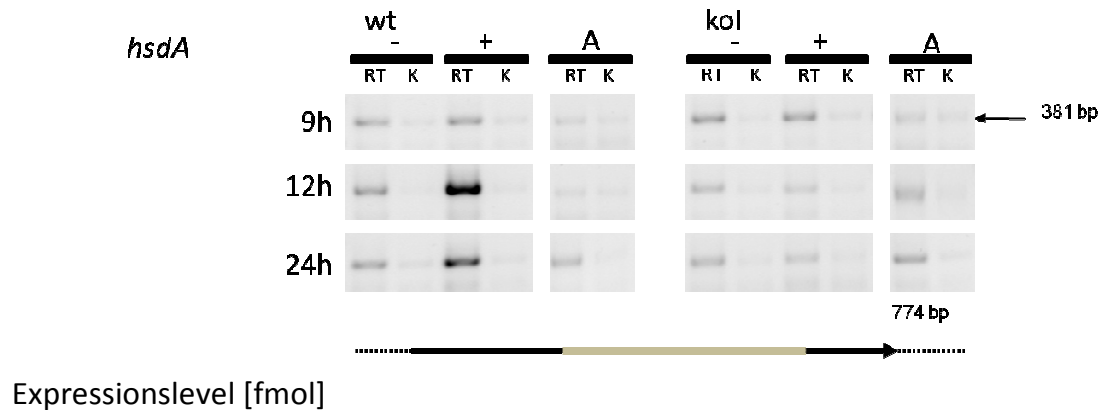
*hsdA* Cluster<sup>1</sup>*tesH* Cluster<sup>2</sup>*teiR* Cluster<sup>2</sup>

Abbildung 15 Anordnung und Orientierung der Gene zur Steroiddegradation und Regulation; die untersuchten Gene sind Schwarz markiert, *hsdA*: 3 $\alpha$ -HSD/CR, *tesH*:  $\Delta$ 1-Dehydrogenase, *tesB*: 2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase, *tesD*: Hydrolase, *actA*: Aktivator von *hsdA*, *teiR*: testosterone inducible Regulator, *lysR*: LysR-Typ Regulator; Sequenzinformationen: 1) *C. testosteronei* ATCC11996, 2) *C. testosteronei* KF-1

Die untersuchten Gene befinden sich in verschiedenen putativen Transkriptionseinheiten und kodieren entweder für wichtige, katalytisch aktive Enzyme des Steroidstoffwechsels oder deren mögliche Regulatoren.

Um die jeweiligen Expressionslevel zu bestimmen, wurden die Kulturen von *C. testosteronei* ATCC11996 und der *teiR*-defizienten Mutante *C. testosteronei* kol sowohl in Anwesenheit der Steroide Testosteron und 1,4-Androstadien-3,17-dion, als auch in deren Abwesenheit inkubiert. Von diesen Kulturen wurden nach 9,12 und 24 Stunden Proben zur Isolierung der Gesamt-RNA entnommen und deren Steroidgehalt bestimmt. Anschließend wurden die spezifischen PCR-Reaktionen durchgeführt und die resultierenden Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt. Anhand der Bandenstärke konnte eine Quantifizierung und Normalisierung in Bezug auf *rpoZ* als Standard erfolgen. Dies führt dazu, dass die auf den jeweiligen Agarosegelen dargestellten Bandenstärken nicht direkt auf die errechneten Expressionslevel schließen lassen. Zur Quantifizierung der Banden wurde das Programm LabImage1D (Kapelan, Leipzig, Deutschland) verwendet. Als Nullwert bzw. Startwert kann hier die Expression der Gene bei unbehandelten *C. testosteronei* ATCC11996 (wildtyp) und *C. testosteronei* kol (*teiR*-defizient) nach 24 Stunden gesehen werden. Denn zur initialen Inokulation der Kulturen wurden Vorkulturen verwendet, die 24 Stunden inkubiert wurden.

Nach einer Normalisierung mit dem Expressionslevel von *rpoZ* (*C. testosteroni* ATCC11996 nach neun Stunden Wachstum) zeigte sich, dass die Expressionsrate von *hsdA* nur in Zellen des Wildtyps und unter Zugabe von Testosteron gesteigert ist (siehe Abbildung 16).



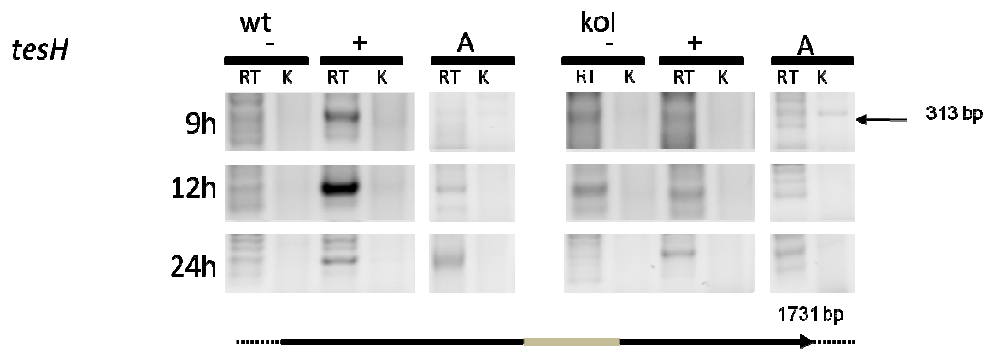
		9h	12h	24h
wt	-	228,87 (124,29-333,12)	68,1 (7,82-128,33)	169,264 (65,76-272,78)
	+	519,1 (112,54-925,69)	878,5 (644,07-1112,89)	606,1 (354,76-857,53)
	A	0	0	95,15
kol	-	178,1 (128,1-228,15)	181,9 (102,97-260,91)	129,2 (26,43-232,02)
	+	103,6 (2,3-204,98)	266,8 (68,95-464,61)	134,4 (0-268,84)
	A	0	8,73	24,39

Abbildung 16 Expressionsanalyse von *hsdA* (3 $\alpha$  HSD/CR); wt *C. testosteroni* ATCC11996; kol *C. testosteroni* kol (*teiR*-defizient); Kultivierung in SIN bei 27°C; + Kultivierung mit 1,1 mM Testosteron (n=2) (Startkonzentration); A Kultivierung mit 1,1 mM 1,4-Androstadien-3,17-dion (n=1) (Startkonzentration); RT: cDNA-Bank; K Kontrolle (RNase-Verdau statt RT-Reaktion); Schwarzer Pfeil: *hsdA* Leserahmen, Graue Box amplifizierter Bereich; Angegeben ist die Anzahl in fmol der nachgewiesenen cDNA-Bande; in Klammern ist die Spannweite der Messwerte angegeben

Nach neun Stunden Inkubation ergab sich bei *C. testosteroni* ATCC11996 ein Unterschied von Faktor 2,27 zwischen der Testosteron behandelten Probe und der Testosteron-freien Kontrolle. Nach 12 Stunden erhöhte sich dieses Verhältnis auf ca. 12,9:1 und sank in der 24 Stunden Probe auf ca. 3,58:1 ab. Daher kann vermutet werden, dass die Expressionsrate von *hsdA* in *C. testosteroni* ATCC11996 neben Testosteron auch von der Wachstumsphase der Zelle bzw. der Kultur abhängt. Dagegen konnte bei der Inkubation mit 1,4-Androstadien-3,17-dion sowohl nach neun als auch nach 12 Stunden keine *hsdA*-mRNA (bzw. deren cDNA) nach Berechnung nachgewiesen werden. Auch nach 24 Stunden war die

nachgewiesene Menge um den Faktor ca. 0,56 gegenüber der unbehandelten Kultur erniedrigt. Daher scheint 1,4-Androstadien-3,17-dion die Expression von *hsdA* zu erniedrigen. Die *teiR*-defiziente Mutante *C. testosteronei kol* zeigte in allen analysierten Proben keine Steigerung um mehr als Faktor zwei zwischen der Kontrolle und der mit Testosteron inkubierten Kultur. Auch in allen Kulturen, welche mit 1,4-Androstadien-3,17-dion kultiviert wurden, war keine Steigerung der *hsdA*-Expressionsrate zu erkennen. Allerdings konnten auch hier, im Vergleich zur Kultur ohne Steroid, niedrigere Expressionslevel von *hsdA* nachgewiesen werden.

Das Gen der 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase (*tesH*) zeigte beim Wildtyp, wie auch *hsdA*, einen erhöhten mRNA-Gehalt in der Anwesenheit von Testosteron (siehe Abbildung 17). Die Sequenz für *tesH* wurde aus *C. testosteronei* KF-1 abgeleitet und wies 90% Identität zum *tesH* Homolog aus ATCC11996 auf.



Expressionslevel [fmol]

		9h	12h	24h
wt	-	69,7 (40,69-98,67)	77,3 (16,07-138,55)	146,3 (89,29-203,22)
	+	418 (198,71-639,08)	1154,1 (824,86-1483,32)	527,7 (201,03-842,32)
	A	0	103,69	177,09
kol	-	346 (276,47-415,54)	171,9 (0-343,73)	218,4 (0-436,78)
	+	235,9 (105,9-365,87)	132,7 (47,8-217,58)	632,9 (215,08-1050,77)
	A	83,19	0	43,71

Abbildung 17 Expressionsanalyse von *tesH* (3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase); wt *C. testosteronei* ATCC11996; kol *C. testosteronei kol* (*teiR*-defizient); - Kultivierung in SIN bei 27°C; + Kultivierung mit 1,1 mM Testosteron (n=2) (Startkonzentration); A Kultivierung mit 1,1 mM 1,4-Androstadien-3,17-dion (n=1) (Startkonzentration); RT: cDNA-Bank; K Kontrolle (RNase-Verdau statt RT-Reaktion); Schwarzer Pfeil: *tesH* Leserahmen, Graue Box amplifizierter Bereich; Angegeben ist die Anzahl in fmol der nachgewiesenen cDNA-Bande; in Klammern ist die Spannweite der Messwerte angegeben



Allerdings war die *tesH*-Expression in Zellen des Wildtyps mit Testosteron nach neun Stunden um einen Faktor von ca. 6 zu Zellen ohne Testosteron erhöht. Diese erhöhte sich nach 12 Stunden Wachstum auf ca. 14,93 und war nach 24 Stunden Wachstum mit ca. 3,6 zu beziffern. Proben, die mit 1,4-Androstadien-3,17-dion inkubiert wurden, zeigten eine zur Kontrollreaktion kaum veränderte Expressionsrate von *tesH* nach 12 und 24 Stunden. Daher ist die *tesH*-Expression auch vom Testosterongehalt, aber anscheinend nicht von 1,4-Androstadien-3,17-dion, und von der Wachstumsphase der Kultur abhängig. Bei der Mutante *C. testosteroni* kol dagegen ist nach neun Stunden eine höhere *tesH*-Menge im Vergleich zu *C. testosteroni* ATCC11996 nachzuweisen. Auch nach 12 und 24 Stunden ist mehr *tesH*-Transkript im Vergleich zum Wildtyp in der Probe detektierbar, allerdings sinkt in diesem Zeitraum das Verhältnis von 2,22:1 auf 1,49:1. Die mit Testosteron inkubierten Kulturen von *C. testosteroni* kol zeigten dagegen nach neun und 12 Stunden nur geringe Unterschiede zur Kontrolle ohne Testosteron. Nach 24 Stunden konnte eine Erhöhung dieses Verhältnisses auf ca. 2,9:1 detektiert werden. Des Weiteren konnte in Proben mit 1,4-Androstadien-3,17-dion eine reduzierte Menge *tesH* nachgewiesen werden, welche mit denen von *C. testosteroni* ATCC11996 und 1,4-Androstadien-3,17-dion vergleichbar waren. Damit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *tesH* durch Testosteron, allerdings nicht durch 1,4-Androstadien-3,17-dion, induzierbar ist. Außerdem war in der Mutante kol keine Induktion nach neun und 12 Stunden nachweisbar. Daher ist die *tesH*-Expression auch von der Anwesenheit eines Funktionstüchtigen TeiR und in geringem Maße auch von der Wachstumsphase abhängig.

Neben der Analyse der Expression mittels reverser Transkription wurde bei *tesH* auch die Methode der Sandwich Hybridisierung angewandt. Die von Thieme et al (Thieme et al. 2008) angewandte Methode zum Nachweis und zur Gehaltsbestimmung verschiedener mRNA in *E. coli* wurde erfolgreich auf *C. testosteroni* angewandt und für *C. testosteroni* optimiert. Die Abbildung 18 zeigt die relative Fluoreszenz (RFU), die proportional zur zellulären mRNA-Konzentration angesehen werden kann.

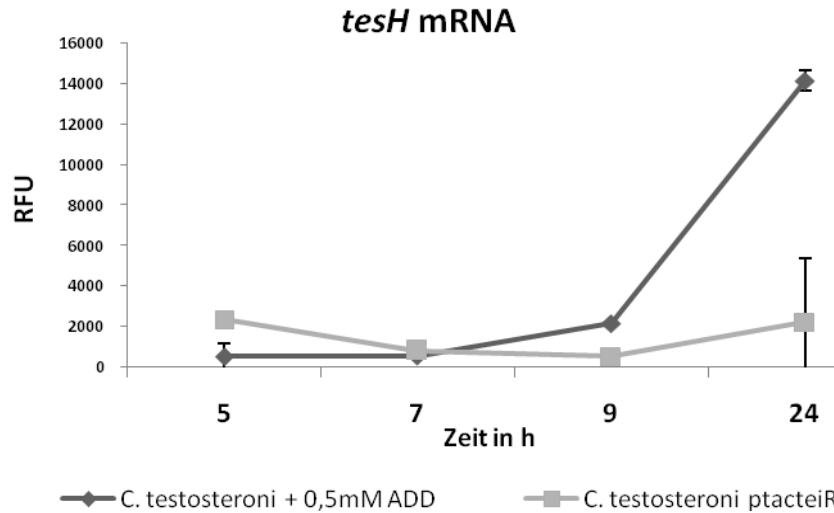
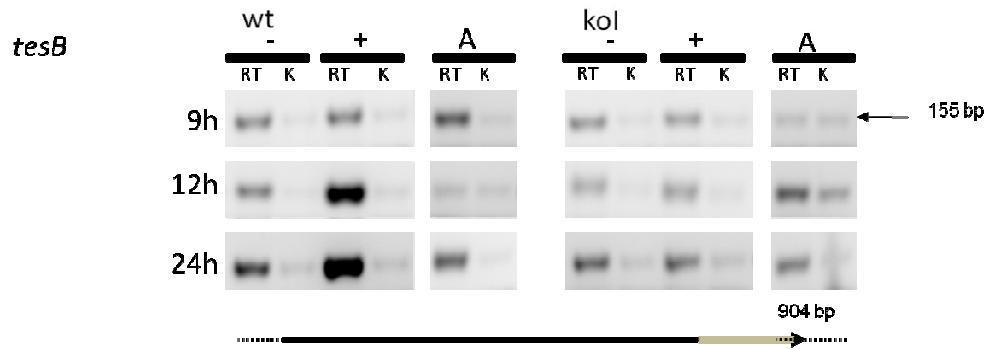


Abbildung 18 SBSH *tesH* mRNA; Wachstum in SIN Medium, ADD 1,4-Androstadien-3,17-diol

Durch die Anwendung der Solution based Sandwich Hybridization (SBSH) konnte erfolgreich die *tesH*-mRNA gemessen werden. Aus Abbildung 18 wurde geschlossen, dass *C. testosteronei* erst nach neun Stunden Wachstum in SIN Medium den mRNA-Gehalt von *tesH* erhöht. Dies korreliert mit weiteren Ergebnissen, denn auch nach neun Stunden Wachstum im Vollmedium beginnt der Steroidabbau in *C. testosteronei* (siehe Abbildung 23).

Erstaunlicherweise wurde in *C. testosteronei* pBB16*teiR* keine erhöhte Konzentration der *tesH*-mRNA detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die konstitutive (Über-)Expression von *teiR* durch das Plasmid pBB16*teiR* nicht für eine erhöhte *tesH*-mRNA-Produktion ausreicht. Frühere Experimente wiesen keine erhöhte Expression der 3 $\alpha$ HSD/CR (HsdA) bei *C. testosteronei* pBB16*teiR* nach 24 Stunden Wachstum auf. Daher liegt die Vermutung nahe, dass *TeiR* für seine Funktion in *C. testosteronei* einen oder mehrere weitere Faktoren benötigt.

Auch das Gen der A-Ring spaltenden 2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase, *tesB*, wurde untersucht. Die Expression von *tesB* zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit zu Steroiden und zur Anwesenheit eines funktionstüchtigen *TeiR*-Proteins (siehe Abbildung 19).



Expressionslevel [fmol]

		9h	12h	24h
wt	-	1000,5 (903,96-1097,12)	1175,7 (997,93-1353,43)	905,4 (806,05-1004,79)
	+	2600,5 (1254,2-3946,79)	4434 (3881,45-4986,56)	3007,7 (2351,77-3663,7)
A		1139,88	69,414	1563,51
kol	-	983,4 (918,5-1048,28)	1094,5 (909,56-1279,38)	995,1 (708,34-1281,82)
	+	772,2 (660,71-893,61)	1030 (835,23-1224,8)	729,9 (729,61-730,11)
A		33,92	480,12	458,70

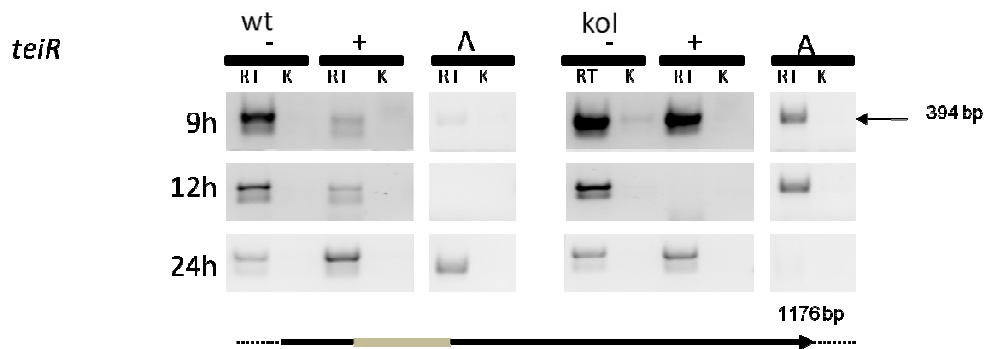
Abbildung 19 Expressionsanalyse von *tesB* (2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-Dioxygenase); wt *C. testosteroni* ATCC11996; kol *C. testosteroni* kol (*teiR*-defizient); - Kultivierung in SIN bei 27°C; + Kultivierung mit 1,1 mM Testosteron (n=2) (Startkonzentration); A Kultivierung mit 1,1 mM 1,4-Androstadien-3,17-dion (n=1) (Startkonzentration); RT: cDNA-Bank; K Kontrolle (RNase-Verdau statt RT-Reaktion); Schwarzer Pfeil: *tesB* Leserahmen, Graue Box amplifizierter Bereich; Angegeben ist die Anzahl in fmol der nachgewiesenen cDNA-Bande; in Klammern ist die Spannweite der Messwerte angegeben

Es konnte gezeigt werden, dass bei der Anwesenheit von Testosteron im Medium eine erhöhte Menge *tesB*-mRNA im Wildtyp detektierbar war. Das Verhältnis zur Kontrolle ohne Testosteron wächst von ca. 2,6:1 nach neun Stunden auf ca. 3,8:1 nach 12 Stunden an. Anschließend ist ein leichtes Absinken auf 3,3:1 zu beobachten. Dieses leichte Absinken deutet darauf hin, dass Testosteron und/oder möglicherweise ein Metabolit des Stoffwechselweges, wie das *TesB* Substrat, 3,4-Hydroxy-9,10-secoandrosta-1, 3,5-(10)-trien-9,17-dion (3,4 DHSA), induktiv auf die Expression von *tesB* wirken. Nach 24 Stunden waren in dieser Kultur nur marginale Mengen Testosteron nachweisbar (siehe Abbildung 23), was das beobachtete Absinken erklären würde. Die Anwesenheit von 1,4-Androstadien-3,17-dion dagegen führte zu keiner Induktion der *tesB*-Expression, allerdings war in der 12 Stunden Probe eine drastische Reduktion der *tesB*-Menge zu beobachten. Ein nicht funktionelles *TeiR* Protein, wie in *C. testosteroni* kol, bewirkt einen Verlust der *tesB* Induktion durch Testosteron. Bei der Anwesenheit von 1,4-Androstadien-3,17-dion konnten nur

geringe Mengen an *tesB*-cDNA detektiert werden. Allerdings war ein Ansteigen dieser Menge über die Zeit zu beobachten.

Die Expressionslevel von *tesD* wurden ebenfalls untersucht. Trotz verschiedenster Optimierungsansätze konnten keine verlässlichen Ergebnisse für die Expression von *tesD* gewonnen werden. Neben den Genen, welche für katalytische Funktionen im Testosteronstoffwechsel codieren, wurden auch die Expression der, für Regulatoren codierenden, Gene *teiR*, *actA* und *lysR* (LysR-Typ Regulator) untersucht.

Die Expression von *teiR*, welcher als Testosteron-induzierbar beschrieben worden war (Pruneda-Paz et al. 2004b), zeigte eine Abhängigkeit zu Testosteron in Zusammenspiel mit der Wachstumsphase der Bakterienkultur (siehe Abbildung 20 & Abbildung 23).



Expressionslevel [fmol]

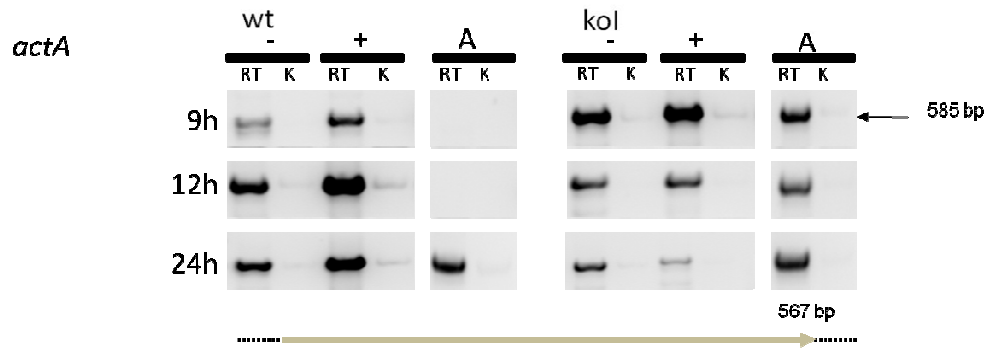
		9h	12h	24h
wt	-	<b>350</b> (112,78-587,98)	<b>541</b> (528,67-552,53)	<b>380</b> (370,18-390,26)
	+	<b>293</b> (164,17-421,63)	<b>19,5</b> (0-38,95)	<b>673</b> (568,86-777,39)
	A	<b>81,5</b>	<b>0</b>	<b>343,95</b>
kol	-	<b>684</b> (656,18-711,76)	<b>819</b> (495,62-1142,82)	<b>371</b> (318,27-422,77)
	+	<b>675</b> (640,89-708,3)	<b>119</b> (0-238,14)	<b>623</b> (498,25-747,08)
	A	<b>464,74</b>	<b>337,31</b>	<b>59,07</b>

Abbildung 20 Expressionsanalyse von *teiR* (Testosteron inducible Regulator); wt *C. testosteronei* ATCC11996; kol *C. testosteronei* kol (*teiR*-defizient); - Kultivierung in SIN bei 27°C; + Kultivierung mit 1,1 mM Testosteron (n=2) (Startkonzentration); A Kultivierung mit 1,1 mM 1,4-Androstadien-3,17-dion (n=1) (Startkonzentration); RT: cDNA-Bank; K Kontrolle (RNase-Verdau statt RT-Reaktion); Schwarzer Pfeil: *teiR* Leserahmen, Graue Box amplifizierter Bereich; Angegeben ist die Anzahl in fmol der nachgewiesenen cDNA-Bande; in Klammern ist die Spannbreite der Messwerte angegeben

Die Untersuchung der Expressionslevel von *teiR* ergab, dass dessen Expression selbst von der Wachstumsphase der Kultur abhängig ist. So ist in *C. testosteronei* ATCC11996 bei

Testosteronanwesenheit die Menge an *teiR* nach neun und 12 Stunden im Vergleich zur Kontrollkultur stark abgesenkt. Allerdings konnte nach 24 Stunden eine erhöhte Menge *teiR*-cDNA in Anwesenheit von Testosteron im Wildtyp nachgewiesen werden. Bei Präsenz von 1,4-Androstadien-3,17-dion konnte ebenfalls in Proben nach neun und 12 Stunden nur eine sehr geringe Menge *teiR*-cDNA nachgewiesen werden. Diese war nach 24 Stunden zwar im Vergleich zur neun Stunden Probe höher, erreichte aber dennoch nur den Level der unbehandelten Kontrolle. Bei *C. testosteroni* kol konnte die Expression von *teiR* verfolgt werden, da sich die Gen-inaktivierende Integration downstream der nachgewiesenen Region befindet (Gohler et al. 2008). So konnte in der unbehandelten Kultur ein ähnlicher Verlauf der Werte beobachtet werden, obwohl die Werte nach neun und 12 Stunden um Faktor 1,95 und 1,51 höher lagen. Unter Einfluss von Steroiden konnte ein zum Wildtyp unterschiedliches Expressionsmuster detektiert werden. Die Menge an *teiR*-cDNA entsprach unter Testosteroneinfluss dem der unbehandelten Kultur nach neun Stunden. Nach 12 Stunden war ein starker Rückgang und nach 24 Stunden ein Anstieg zu beobachten. Unter Einfluss von 1,4-Androstadien-3,17-dion war dagegen ein stetes Abnehmen der *teiR*-cDNA-Konzentration zu erkennen. Somit kann gefolgert werden, dass die Expression von *teiR* von mehr als ausschließlich von der Anwesenheit eines Steroids abhängt. Die Expression scheint hier unter Testosteron, wenn auch kurzzeitig, reprimiert zu werden. Im Wildtyp wird dieser Effekt auch durch 1,4-Androstadien-3,17-dion ausgelöst.

Neben der *teiR*-Expression wurde auch der Gehalt an *actA*-cDNA bzw. dessen mRNA untersucht (siehe Abbildung 21).



Expressionslevel [fmol]

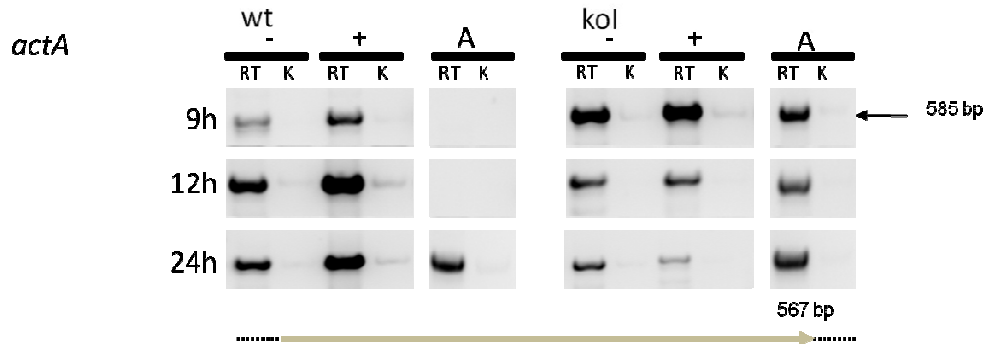
		9h	12h	24h
wt	-	249,8 (147,12-442,53)	646,4 (438,65-854,19)	339,9 (109,85-569,94)
	+	1076,6 (349,56-1803,71)	2306,4 (1031,6-3581,15)	1202,7 (876,57-1528,85)
A		0	0	317,47
kol	-	769,1 (665,9-872,23)	575,8 (411,94-739,7)	204,7 (89,34-320,09)
	+	827,3 (817,23-834,43)	560,2 (354,53-765,86)	239,4 (117,99-360,76)
A		411,62	218,46	334,54

Abbildung 21 Expressionsanalyse von *actA* (Testosteron abhängiger Aktivator von *hsdA*); wt *C. testosteroni* ATCC11996; kol *C. testosteroni* kol (*teiR*-defizient); - Kultivierung in SIN bei 27°C; + Kultivierung mit 1,1 mM Testosteron (n=2) (Startkonzentration); A Kultivierung mit 1,1 mM 1,4-Androstadien-3,17-dion (n=1) (Startkonzentration); RT: cDNA-Bank; K Kontrolle (RNase-Verdau statt RT-Reaktion); Schwarzer Pfeil: *actA* Leserahmen, Graue Box amplifizierter Bereich; Angegeben ist die Anzahl in fmol der nachgewiesenen cDNA-Bande; in Klammern ist die Spannweite der Messwerte angegeben

Die Auswertung der nachgewiesenen Mengen der *actA*-cDNA zeigten verschiedene Abhängigkeiten. In Proben des Wildtyps war unter Testosteroneinfluss eine höhere Menge von cDNA nachweisbar. Dagegen zeigte 1,4-Androstadien-3,17-dion einen reprimierenden Effekt auf den *actA*-cDNA-Gehalt nach neun und 12 Stunden. Nach 24 Stunden konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, allerdings war hier auch nur wenig 1,4-Androstadien-3,17-dion im Medium detektierbar (siehe Abbildung 24). Weiterhin zeigte sich, dass eine Induktion durch Testosteron und 1,4-Androstadien-3,17-dion in *C. testosteroni* kol nicht zu beobachten waren. Die Expression von *actA*, dem Aktivator von *hsdA* scheint selbst abhängig von der Anwesenheit von *TeiR* zu sein. Im Wildtyp konnte des Weiteren auch eine reprimierende Wirkung von 1,4-Androstadien-3,17-dion beobachtet werden.

Im Genom von *C. testosteroni* ATCC11996 konnte einem, strangabwärts von *hsdA* gelegenen, LysR-Typ-Regulator, dessen Gen mit *lysR* bezeichnet wird, eine Funktion in der

Regulation des Steroidmetabolismus zugeordnet werden (Xiong et al unpubl.). Auch auf die Expression von *lysR* konnte ein Einfluss von Testosteron beobachtet werden (siehe Abbildung 22).



Expressionslevel [fmol]

		9h	12h	24h
wt	-	249,8 (147,12-442,53)	646,4 (438,65-854,19)	339,9 (109,85-569,94)
	+	1076,6 (349,56-1803,71)	2306,4 (1031,6-3581,15)	1202,7 (876,57-1528,85)
	A	0	0	317,47
kol	-	769,1 (665,9-872,23)	575,8 (411,94-739,7)	204,7 (89,34-320,09)
	+	827,3 (817,23-834,43)	560,2 (354,53-765,86)	239,4 (117,99-360,76)
	A	411,62	218,46	334,54

Abbildung 22 Expressionsanalyse von *lysR* (LysR-Typ-Regulator); wt *C. testosteroni* ATCC11996; kol *C. testosteroni* kol (*teiR*-defizient); - Kultivierung in SIN bei 27°C; + Kultivierung mit 1,1 mM Testosteron (n=2) (Startkonzentration); A Kultivierung mit 1,1 mM 1,4-Androstadien-3,17-dion (n=1) (Startkonzentration); RT: cDNA-Bank; K Kontrolle (RNase-Verdau statt RT-Reaktion); Schwarzer Pfeil: *lysR* Leserahmen, Graue Box amplifizierter Bereich; Angegeben ist die Anzahl in fmol der nachgewiesenen cDNA-Bande; in Klammern ist die Spannweite der Messwerte angegeben

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *lysR* unter Testosteroneinfluss im Wildtyp erhöht ist, auch dann wenn im Medium nur noch wenig Testosteron nachweisbar war (siehe Abbildung 23). Dagegen konnte in der *teiR*-defizienten Mutante nur nach 24 Stunden Wachstum mit Testosteron ein Unterschied von 1,49 zur Kontrolle ohne Testosteron im Medium bestimmt werden. 1,4-Androstadien-3,17-dion zeigte beim Wildtyp einen induktiven Effekt nach 24 Stunden. In allen anderen Proben bewirkte 1,4-Androstadien-3,17-dion eine Absenkung der *lysR*-cDNA-Menge, wobei das cDNA-Level bei *C. testosteroni* kol um 450 fmol schwankte. Damit scheint auch die Expression von *lysR* von der Steroidquelle als auch

von *TeiR* abhängig zu sein, wenn auch nicht im selben Maße wie die vorangegangenen Gene.

Neben den Genen, die im Steroidstoffwechsel eine Funktion erfüllen wurde zudem die Expression von *fliG* und *orfPD1500* untersucht. Bei dem FliG-Protein handelt es sich um einen Bestandteil der bakteriellen Flagellenmotors in der inneren Zellmembran. Das durch den *orfPD1500* codierte Protein stellt einen putativen Sensor für Sauerstoff dar und kann als Mitglied der Gruppe der Methyl-akzeptierendes Chemotaxis-Proteins (MCP) der Aerotaxis zugeordnet werden (Vergleich auch 3.1.1.2). Die Expression beider Gene konnten mit der vorliegenden Methode trotz verschiedener Optimierungsversuche nicht bestimmt werden.

Zum Vergleich wurden weiterhin die optische Dichte als auch der Testosterongehalt der Proben bestimmt und mit dem Transkriptstärke bzw. -Konzentration korreliert.

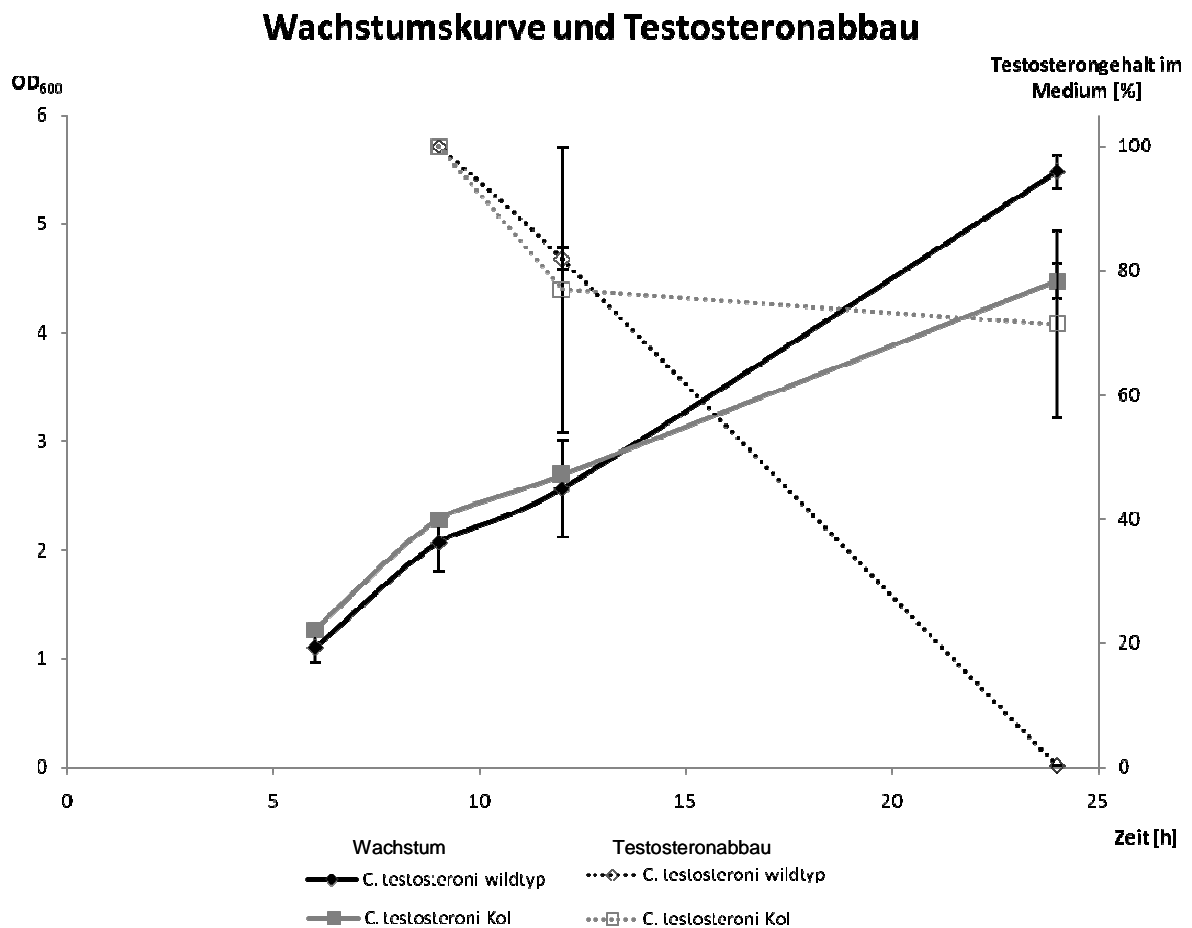


Abbildung 23 Wachstumskurve und Testosterongehalt (n=2); Wachstum bei 27°C (schütteln); Startkonzentration 1,1 mM Testosteron entspricht 100%

Aus der Abbildung 23 ist zu erkennen, dass sowohl *C. testosteroni* Zellen des Wildtyps als auch der *teiR*-defizienten Mutante kol im SIN-Vollmedium wachsen. Allerdings ist die optische Dichte nach 24 Stunden Wachstum beim Wildtyp geringfügig höher. Es ist auch



erkennbar, dass der Testosteron Gehalt in der *C. testosteronei* kol Kultur nur geringfügig sinkt und nach 24 Stunden noch über 70% der Anfangskonzentration beträgt. Im Gegensatz konnte beim Wildtyp nach 24 Stunden Wachstum ein Testosteron Gehalt von unter 1% detektiert werden. Ähnliches wurde auch für den Abbau von 1,4-Androstadien-3,17-dion durch *C. testosteronei* wildtyp und *C. testosteronei* kol ermittelt.

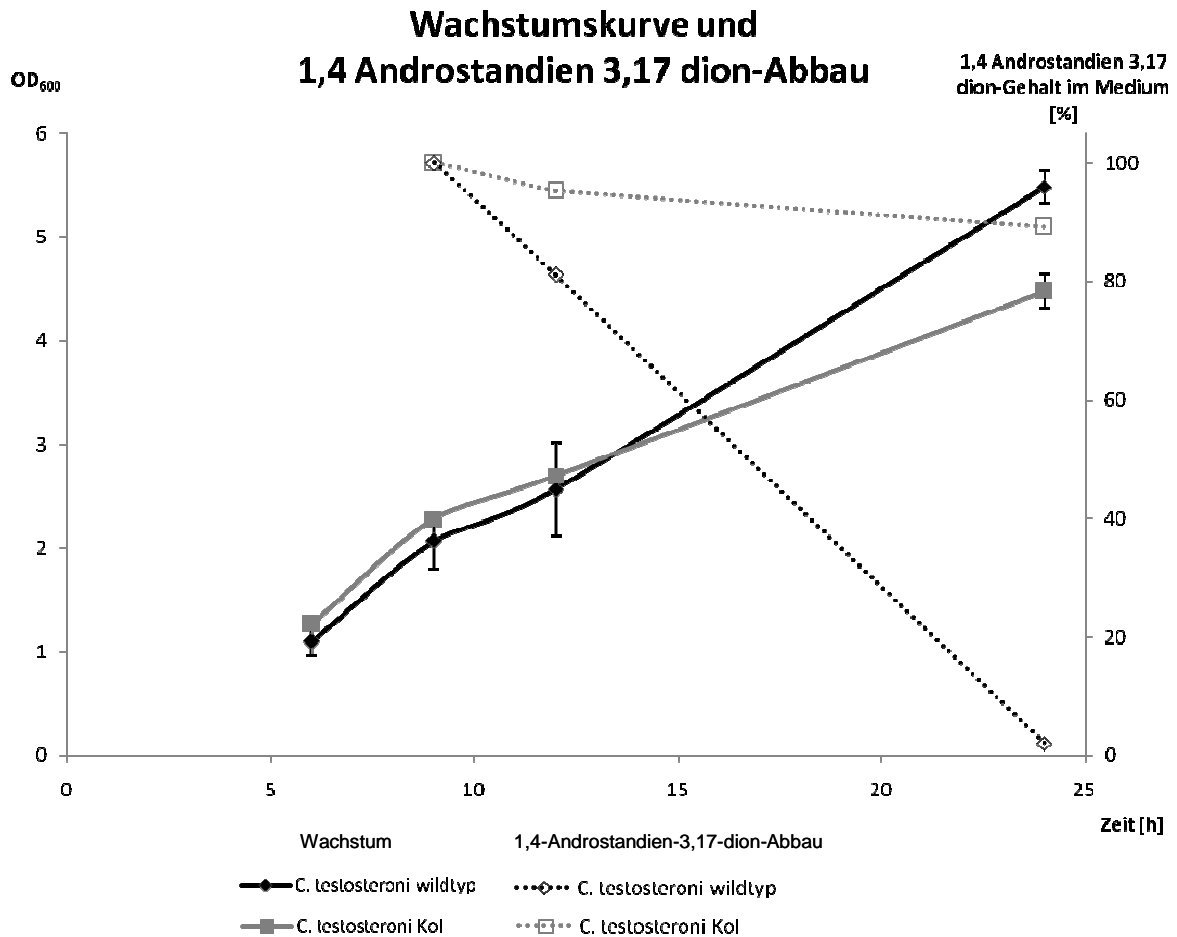


Abbildung 24 Wachstumskurve und 1,4-Androstadien-3,17-dion Gehalt (n=2); Wachstum bei 27°C (schütteln); Startkonzentration 1,1 mM 1,4-Androstadien-3,17-dion entspricht 100%

Auch hier zeigte sich, dass bei *C. testosteronei* kol der Gehalt an 1,4-Androstadien-3,17-dion nach 24 Stunden nur um 11% auf ca. 89% reduzieren ließ. Dagegen zeigt der Wildtyp eine Verringerung des 1,4-Androstadien-3,17-dion-Gehaltes um 98%.

Somit kann eine direkte Verbindung zwischen der Konzentration der jeweiligen mRNA und der Abbauleistung des Testosterons im Flüssigmedium hergestellt werden (siehe Abbildung 23 & Abbildung 24).

### 3.4 Transkriptionseinheiten von *teiR*, *tesB* und *hsdA*

Um einen Überblick über mögliche Operone zu erlangen wurden die Transkriptionseinheiten von *teiR*, *tesB* und *hsdA* unter Verwendung von cDNA-Banken untersucht, für die bereits hohe Expressionslevel der entsprechenden Gene nachgewiesen wurden (siehe 3.3).

Die Position des *teiR*-Homologs *tesR* wurde in *C. testosteroni* TAA441 am Ende eines Steroidabbau-Clusters und putativen Operons beschrieben (Horinouchi et al. 2004). Eine vergleichbare Genomstruktur findet sich auch in der Genomsequenz von *C. testosteroni* KF-1 (Schleheck et al. 2004; veröffentlicht 2006). Am 3'Ende des Leserahmen von *teiR* in *C. testosteroni* ATCC11996 wurde des Weiteren eine Terminatorsequenz beschrieben (Pruneda-Paz et al. 2004a). Zur Analyse der *teiR* Transkriptionseinheit wurden verschiedene Primer gewählt, die auch in der 5'Region des *teiR*-Gens binden (siehe Abbildung 25).

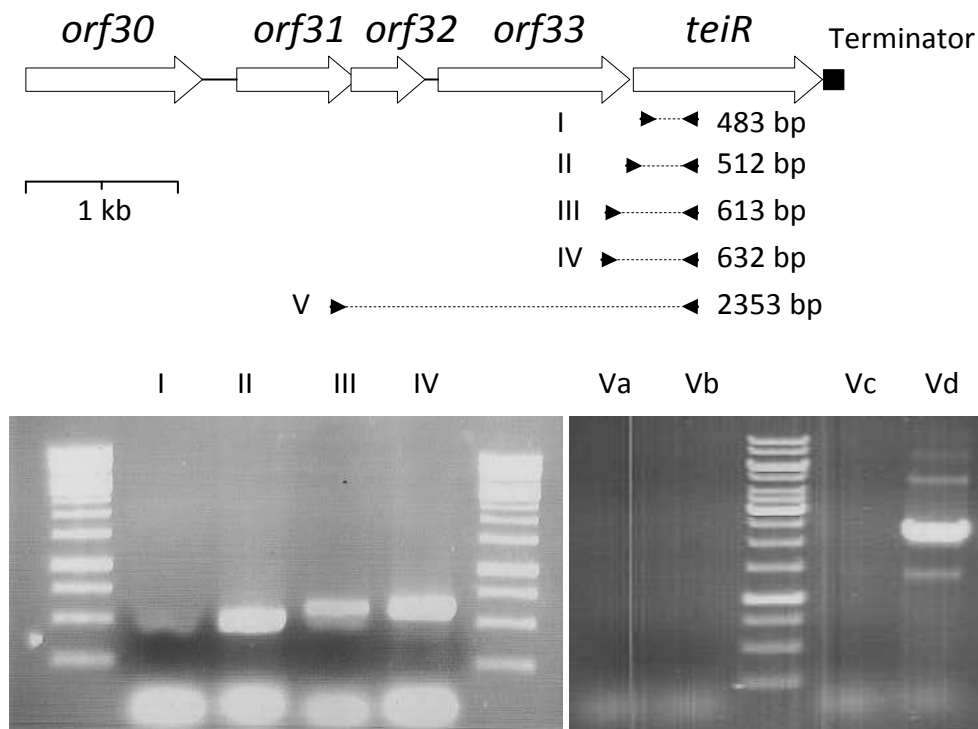


Abbildung 25 Analyse der *teiR* Transkriptionseinheit, PCR aus *C. testosteroni* ATCC11996 cDNA-Bank; I-IV) cDNA-Bank 24 Stunden mit Testosteron; Va) cDNA[Ct.12h + 1,1mM Testosteron] Vb) cDNA[Ct.24h + 1,1mM Testosteron] Vc) cDNA[Ct.24h + 1,1mM Testosteron Kontrolle] Vd) genomische DNA; Marker 1kb GeneRuler (Fermentas)

Es zeigte sich, dass mit Hilfe von Primern, welche in der 5'Region der, für *teiR* kodierenden, Sequenz als auch mit Primern, die in der 3'-Region von *orf33* binden, ein Fragment aus der cDNA-Bank amplifiziert werden konnte. Mit einem Primer, der am 3'Ende von *orf31* bindet (Abbildung 25, Probe V), konnte dagegen kein Amplifikat aus der cDNA-Bank erzeugt werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass *teiR* in einer Transkriptionseinheit mit

*orf33* vorliegt. Weiterhin ist der ca. 2kb stromaufwärts gelegene *orf31* nicht auf dieser Transkriptionseinheit vertreten.

Eines der von TeiR regulierten Gene ist *hsdA*. In *C. testosteroni* ATCC11996 befindet sich 155bp stromabwärts von *hsdA* das Gen der Ketosteroidisomerase (*ksi*), für das eine gemeinsame Transkription mit *hsdA* vermutet wird. Zur Analyse der *hsdA* Transkriptionseinheit wurde eine PCR der cDNA-Bank durchgeführt, in welcher vorher ein hoher Level der *hsdA*-mRNA detektiert wurde. Zudem wurden spezifische Primer zur Amplifikation des *ksi*-Gens gewählt.

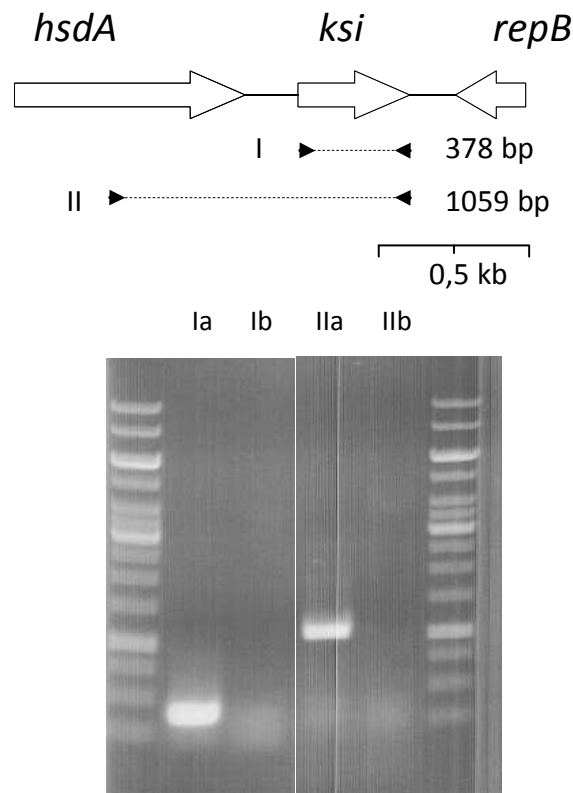


Abbildung 26 Analyse der *hsdA* Transkriptionseinheit; PCR aus *C. testosteroni* ATCC11996 cDNA Bank [Ct.24h + 1,1mM Testosteron]; Spur Ia, Ila cDNA-Bank Ct.24h + 1,1mM Testosteron; Spur Ib, IIb Kontrolle; Marker 1kb GeneRuler (Fermentas)

Aus der cDNA-Bank konnte mit den *ksi*-Primern (*pksiL*, *pksiR*) ein Fragment des *ksi*-Gens amplifiziert werden. Daher ist die *ksi*-mRNA, genau wie die mRNA von *hsdA*, in der verwendeten cDNA-Bank erhöht (siehe 3.3). Außerdem konnte ein Fragment von 1059bp amplifiziert werden, welches die Leserahmen für *hsdA* und *ksi* enthielt. Dies belegt, dass in der cDNA-Bank *hsdA* und *ksi* in einer Transkriptionseinheit vorliegen.

Zur Analyse der Transkriptionseinheit der 2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase *TesB* wurde eine PCR mit der cDNA-Bank durchgeführt, in welcher vorher hohe Level der *hsdA*-mRNA und *tesB*-mRNA, beides Gene die unter Testosteroneinfluss induziert werden, gezeigt

werden konnten. In *C. testosteroni* ATCC11996 ist das *tesB*-Gen nur durch 15bp vom nächsten putativen Leserahmen (*orf1* nach Horinouchi et al. 2004) getrennt.

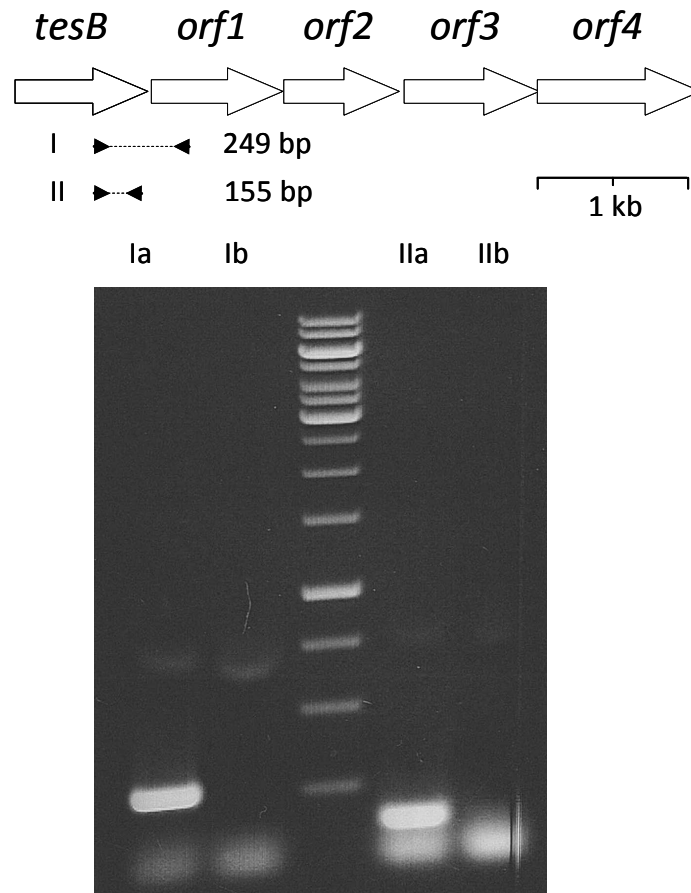


Abbildung 27 Analyse der *tesB* Transkriptionseinheit; PCR aus *C. testosteroni* ATCC11996 cDNA Bank[Ct.24h + 1,1mM Testosteron]; Spur Ia, Ila cDNA-Bank Ct.24h + 1,1mM Testosteron; Spur Ib, Ilb Kontrolle; Marker 1 kb GeneRuler (Fermentas)

Die Analyse der erhaltenen PCR-Produkte lässt den Schluss zu, dass auch *tesB* auf einer polycistronischen mRNA codiert wird. Diese Transkriptionseinheit scheint neben dem *tesB* folgenden *orf1* noch weitere Leserahmen zu enthalten, da in bisherige Sequenzanalysen keine Terminationssequenz detektiert werden konnten.

### 3.5 Analyse des Proteoms unter TeiR Einfluss

Um zu zeigen, dass TeiR eine globale Funktion erfüllt, wurde die Methode der 2D-Gelelektrophorese gewählt. Dazu wurden *C. testosteroni* ATCC11996-Zellen mit dem Vektor pBB16teiR transformiert. Diese rekombinanten Zellen sollen mit den Zellen des Wildtyps und den im Cytosol vorhandenen Proteinen verglichen werden. Hierzu wurden nach 16 Stunden Wachstum in SIN-Medium bei 27 °C die löslichen Proteine isoliert. Pro Zustand, also Zellen die *teiR* unter dem *tac*-Promoter überexprimierten und Zellen des Wildtyps, wurden jeweils sechs Gele angefertigt und ausgewertet. Aus den Gelen des jeweiligen Zustandes wurde ein

virtuelles Fusionsgel erstellt und die darin detektierten Protein-Spots konnten anschließend mit anderen Fusionsgelen verglichen werden. Die Analysen der cytosolischen Proteine des *C. testosteronei* ATCC11996-Wildtyps und von *C. testosteronei* pBB16*teiR* zeigten, dass sich beide Kulturen in ihrem Proteinmuster deutlich unterschieden.

Im Fusionsgel von *C. testosteronei* ATCC11996 konnten in den untersuchten pH-Bereich 934 Proteinspots identifiziert werden. Dem gegenüber zeigte das Fusionsgel von *C. testosteronei* pBB16*teiR* ein anderes Proteinmuster, wie der Vergleich beiden Zustände durch ein Übereinanderlegen der Fusionsgele zeigte.



Abbildung 28 2D-Page Fusionsgel der fusionierten Zustandsgel; pH Bereich 4-7; Blaue Spots *C. testosteronei* ATCC11996; orange Spots *C. testosteronei* pBB16*teiR*

In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass durch die Überexpression von *teiR* das Proteom von *C. testosteronei* merklich beeinflusst wird. Sogar ohne den Einfluss von Testosteron im Medium besaß eine höhere *TeiR*-Konzentration in den Zellen regulatorischen Einfluss. Denn von den 934 identifizierten Proteinspots von *C. testosteronei* ATCC11996 konnte gezeigt werden, dass 93 dieser Proteine unter *TeiR*-Einfluss stärker vorhanden waren. Andererseits zeigten 50 Spots unter *TeiR*-Einfluss eine schwächere Ausprägung als im Wildtyp. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass *TeiR* auch eine reprimierende Wirkung auf das Vorhandensein bestimmter Proteine haben kann. Durch die Anwendung der 2D-Page konnte

somit gezeigt werden, dass eine Überexpression von *teiR* eine Änderung des Proteoms (im pH Bereich 4-7) um ca.15% bewirkt.

### 3.6 Weitere Faktoren

#### 3.6.1 Weitere involvierte regulatorische Proteine

In Nähe der identifizierten putativen Gene und Regulatoren, welche sich womöglich für den Steroidabbau in *C. testosteronei* KF-1 verantwortlich zeichnen, konnten zwei weitere Leserahmen identifiziert werden. Die von diesen putativen ORFs kodierten hypothetischen Proteine weisen eine starke Homologie zu LysR-Typ Regulatoren auf. Diese sind unter anderem als regulatorische Faktoren im Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen beteiligt.

Die LysR-Typ Regulatoren Orf5315 und Orf5348 aus *Comamonas testosteronei* KF-1 wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Expression von *hsdA*, sowohl in *E. coli* Doppeltransformanten als auch in *C. testosteronei* ATCC11996, zu induzieren. Hierzu wurden die Gene der Regulatoren zuerst mittels PCR aus *C. testosteronei* KF-1 amplifiziert und in den Vektor pBBtac14 kloniert. Eine PCR mit den gleichen Primern und *C. testosteronei* ATCC11996 schlug fehl. Die Sequenzen der beiden Stämme schienen in den Primern-Bindestellen unterschiedlich zu sein. Es lässt sich aber nicht ausschließen, dass dennoch Homologe von *orf5315* und *orf5348* in *C. testosteronei* ATCC11996 vorhanden sind.

Der *hsdA*-Reporterassay/ELISA wurde eingesetzt um die regulatorische Funktion von Orf5315 und Orf5348 zu prüfen (Abbildung 29).

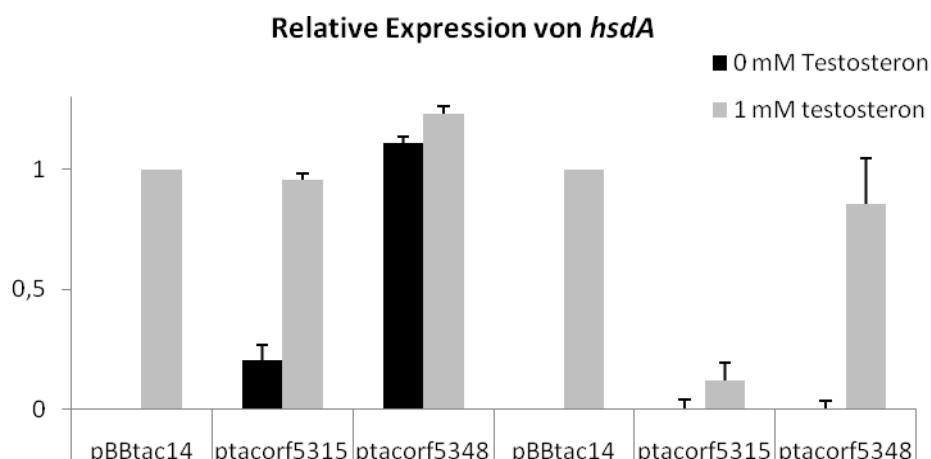


Abbildung 29 Aktivität von Orf5315 und Orf5348; gezeigt ist die relative Expression nach 24h mit/ohne Testosteron im Medium in Bezug auf einen Kontrollwert; Kontrolle = *E. coli* p6/pBBtac14 und *C. testosteronei* pBBtac14

In Abbildung 29 sind die Einflüsse der Leserahmen 5315 und 5348 des KF-1 Genoms auf die Expression des Reportergens *hsdA* dargestellt. Aus der relativen Expression in Bezug auf den jeweiligen Kontrollwert (*E. coli* p6/pBBtac14 für *E. coli* Transformanten und *C. testosteroni* pBBtac14 für *C. testosteroni* Transformanten) ergaben sich Schlussfolgerungen zur Bestimmung der Aktivität der beiden LysR-Typ Regulatoren. Der Orf5315 zeigt im *E. coli* Modell geringe bis keine Unterschiede zur Kontrolle, allerdings ist im *C. testosteroni* Modell und in Anwesenheit von Testosteron ein Unterschied zu erkennen. Die Überexpression von Orf5315 führte in der Kultur mit 1 mM Testosteron zu einer Repression der Expression von *hsdA*. Dagegen zeigte die Anwesenheit von Orf5348 im *C. testosteroni* Modell keinen Unterschied zur Kontrolle. Allerdings ist Orf5348, ebenso wie *teiR*, in der Lage in *E. coli* die Expression von *hsdA* zu induzieren.

Des Weiteren wurden die beiden LysR-Typ Faktoren auf ihre Fähigkeit untersucht, die Expression von *teiR* zu induzieren. Hierzu wurde das Reporterplasmid pJet-150GFP zusammen mit pBBtacOrf5315 bzw. pBBtacOrf5348 in *E. coli* kotransformiert und die Expression von *gfp* durch Messung der Fluoreszenz untersucht. Es zeigte sich, dass beide Regulatoren nicht in der Lage waren die GFP-Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle zu steigern. Es scheint unwahrscheinlich, dass beide Regulatoren einen direkten Einfluss auf die *teiR* Expression ausüben. Allerdings könnten im *E. coli* System die Bedingungen für die Bindung mit der 5'Region von *teiR* ungünstig gewesen sein. Auch das Fehlen von Bindemotiven aufgrund der nur 150 Nukleotide langen Region könnte als Ursache in Betracht kommen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben den bekannten Faktoren noch viele weitere hinzukommen und Regulationsmechanismen untereinander über mehrere Regulationsebenen vernetzt sein können.

### 3.6.2 Mögliche weitere Faktoren

Als möglicher weiterer Faktor bot sich neben Proteinen auch cAMP als niedermolekulare Signalsubstanz an. cAMP ist in der Zelle ein second Messenger, welcher als Hungersignal dient. Der intrazelluläre Level hängt unter anderem von der Konzentration der Kohlenstoffquelle ab. Da *C. testosteroni* Testosteron als Kohlenstoffquelle nutzen kann, ist ein Zusammenhang auch zum cAMP als involvierten Faktor denkbar. Zuerst wurde der Einfluss einer weiteren Kohlenstoffquelle auf den Abbau von Testosteron in Flüssigkultur untersucht. Abbildung 30 zeigt die mittels HPLC gemessenen Konzentrationen von Testosteron in *C. testosteroni*-Kulturen. Vorversuche zeigten, dass der Abbau von Testosteron erst nach sechs bis neun Stunden Wachstum in Vollmedium erfolgt.

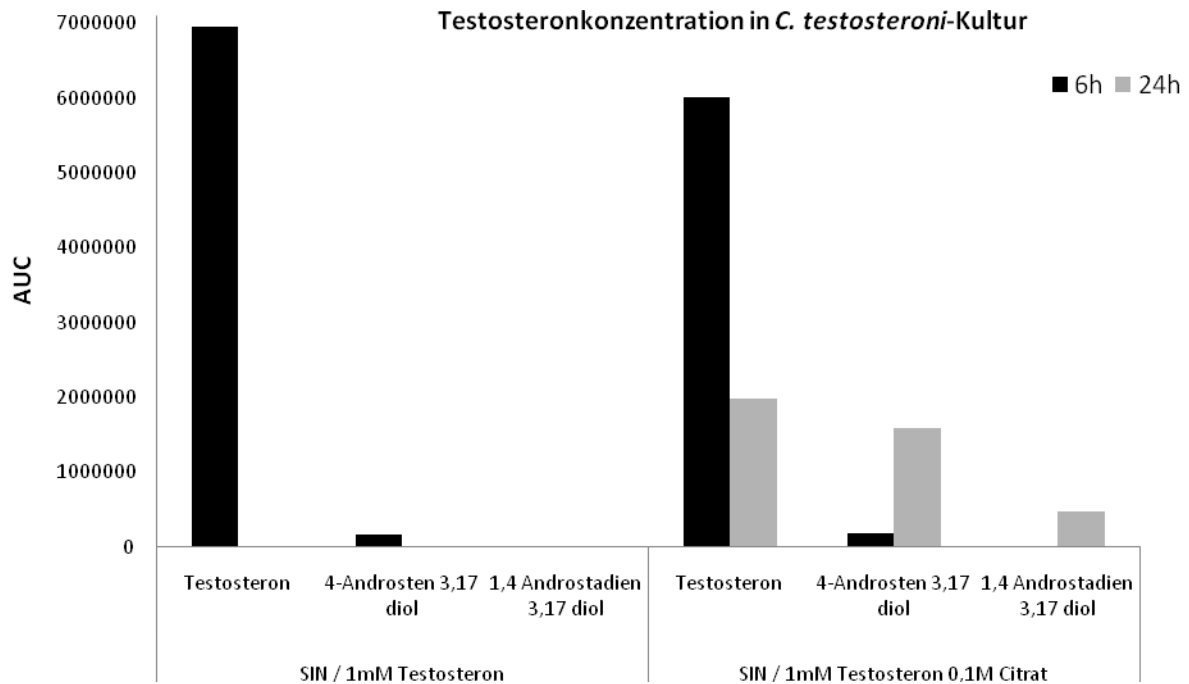


Abbildung 30 Testosterondegradation von *C. testosteronei* ATCC11996

In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass nach 24 Stunden Wachstum von *C. testosteronei* ATCC11996 in SIN (Vollmedium) kein Testosteron in Lösung nachweisbar war. Auch die Metabolite des Testosteronabbaus sind nach 24 Stunden nur noch in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Allerdings weist die Kultur mit der zusätzliche Kohlenstoffquelle Citrat ( $c=0,1$  M) im Medium einen verzögerten Abbau des angebotenen Testosterons auf. Hier sind sowohl Testosteron, als auch seine Metabolite, 4-Androsten-3,17-diol und 1,4-Androstadien-3,17-diol, nach 24 Stunden Inkubation in höheren Konzentrationen nachweisbar. Damit konnte gezeigt werden, dass der Testosteronabbau durch die Anwesenheit einer weiteren Kohlenstoffquelle verzögert werden kann. Vergleichende Untersuchungen mit zusätzlich angebotenen Aminosäuren führten jedoch zu keiner Verzögerung des Testosteronabbaus. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass die Regulation der Testosterondegradation von weiteren Kohlenstoffquellen beeinflusst werden kann. Eine Möglichkeit dieser Vernetzung wäre durch cAMP als second Messenger gegeben.

Des Weiteren konnte mit einem Reporter-Gen-Assay gezeigt werden, dass die Aktivität des *TeiR* Proteins von einem weiteren Faktor abhängig ist. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse des *hsdA* ( $3\alpha$ -HSD/CR) Reporter-Assay dargestellt.



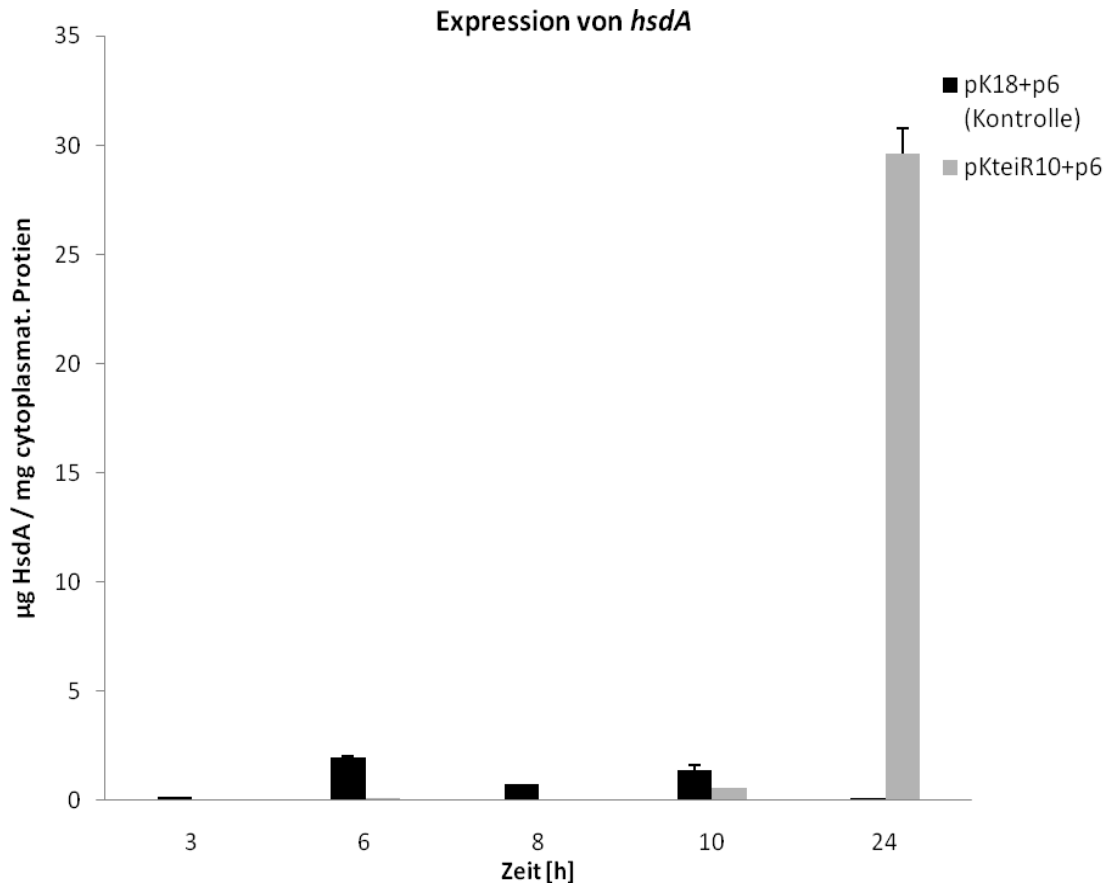


Abbildung 31 *hsdA* Reporter-Assay; Konzentration von HsdA im Cytoplasma von *E. coli* Transformanten

Der Reporter-Assay (siehe Abbildung 31) zeigt die, mittels ELISA bestimmte, Konzentration des HsdA bzw. 3 $\alpha$ -HSD/CR-Proteins im Cytoplasma von *E. coli* HB101-Doppeltransformanten. Diese Zellen enthielten zum einen das p6 Plasmid, welches das *hsdA* Gen und dessen Kernregulation trägt, sodass eine Induktion notwendig ist um *hsdA* exprimieren zu können. Zum anderen enthielten die Zellen entweder als Kontrolle das Plasmid pK18 oder pKteiR10. Das pKteiR10 Plasmid trägt das *teiR* Gen unter Kontrolle des *lacZ* Promoters, so dass *teiR* konstitutiv exprimiert wurde. Anhand der Proteinkonzentration von HsdA bzw. 3 $\alpha$ -HSD/CR kann auf induktive Ereignisse geschlossen werden. Es zeigte sich, dass das TeiR Protein in der Lage war die Expression von *hsdA* zu induzieren. Allerdings wurde diese Induktion erst nach 10 Stunden bzw. in der Messung nach 24 Stunden beobachtet. Daraus resultiert, dass ein weiterer Faktor für die TeiR-abhängige Induktion von HsdA verantwortlich ist. Da die Induktion zwischen 10 und 24 Stunden zu beobachten war, kann auf eine Verknüpfung mit Hungersignalen geschlossen werden. Denn in dieser Zeit befindet sich die Kultur in der späten logarithmischen oder bereits in der stationären Phase und verfügt über eine Kohlenstoff-Limitierung. Auch dieser Sachverhalt deutet stark auf cAMP als weiteren Faktor hin.

### 3.7 Untersuchung an *C. testosteroni* KF-1

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Genomsequenz des *C. testosteroni* Stammes KF-1 veröffentlicht. Bis jetzt wurde für *C. testosteroni* KF-1 der Testosteronabbau noch nicht nachgewiesen.

#### 3.7.1 Genomanalyse von *C. testosteroni* KF-1

Die vorliegende Genomsequenz von *C. testosteroni* KF-1 wurde nach Genen durchsucht, die bereits im Steroidstoffwechsel und dessen Regulation in den Stämmen ATCC11996 und TA441 gefunden wurden. In den Analysen wurden Gene für den Steroidabbau auch in Stamm KF-1 gefunden. Tabelle 9 zeigt eine Auflistung der in *C. testosteroni* KF-1 identifizierten Gene bzw. deren Proteine für den Steroidabbau.

Tabelle 9 Auflistung der putativen Steroid-Abbau- und Regulationsproteine in *C. testosteroni* KF-1

Name (Orf)	Länge in aa	Putative Funktion	Datenbank-Eintrag	Aminosäuren-Identität [%]	Organismus
Orf_PD3103	254	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-dehydrogenase	1HXH	92	<i>C. testosteroni</i> ATCC11996
Orf_PD3643	576	TesH/ $\Delta^1$ -Dehydrogenase	BAC81692.1	93	<i>C. testosteroni</i> TA441
Orf_PD3642	578	TesI/ 3-Keto- $\Delta^4$ -Dehydrogenase	BAC81693.1	91	<i>C. testosteroni</i> TA441
Orf_PD3641	350	Orf17	BAC81694.1	93	<i>C. testosteroni</i> TA441
Orf_PD3640	540	Orf18	BAC81695.1	93	<i>C. testosteroni</i> TA441
Orf_PD3645	325	TesA	BAC67692.1	94	<i>C. testosteroni</i> TA441
Orf_PD3644	395	Orf11	BAC67691.1	94	<i>C. testosteroni</i> TA441
Orf_PD3739	300	TesB/ Biphenyl-2,3-diol-1,2-Dioxygenase	BAB15809.1/ AAM77214.1	96	<i>C. testosteroni</i> TA441/ ATCC11996

Tabelle 9 (Fortsetzung) Auflistung der putativen Steroid-Abbau- und Regulationsproteine in *C. testosteronei* KF-1

Name (Orf)	Länge in aa	Putative Funktion	Datenbank-Eintrag	Aminosäuren-Identität [%]	Organismus
Orf_PD3646	279	TesD	BAC67693.1	97	<i>C. testosteronei</i> TA441
Orf_PD3647	268	TesE	BAC67694.1	93	<i>C. testosteronei</i> TA441
Orf_PD3648	307	TesF/ Acetaldehyd-Dehydrogenase	BAC67695.1	97	<i>C. testosteronei</i> TA441
Orf_PD3649	350	TesG/ 4-Hydroxy-2-Oxovalerate Aldolase	BAC67696.1	97	<i>C. testosteronei</i> TA441
Orf_PD3679	257	HsdA/ 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	AAC79849.1	89	<i>C. testosteronei</i> ATCC11996
Orf_PD3678	125	Ketosteroid-Isomerase	8CHO	92	<i>C. testosteronei</i> ATCC11996

Es konnten im Genom von *C. testosteronei* KF-1 Gene gefunden werden, die für Proteine des gesamten 9,10-Secosteroidweges kodieren. Mit hoher Wahrscheinlichkeit metabolisiert dieser Bakterienstamm Steroide, wie Testosteron, über diesen Abbauweg. Weiterhin sind, wie auch in *C. testosteronei* TA441, die Gene für den Stoffwechselweg in Clustern angeordnet. Deren Anordnung im Genom wurde bereits publiziert (Horinouchi et al. 2001; Horinouchi et al. 2003; Horinouchi et al. 2003; Horinouchi et al. 2005; Horinouchi et al. 2005).

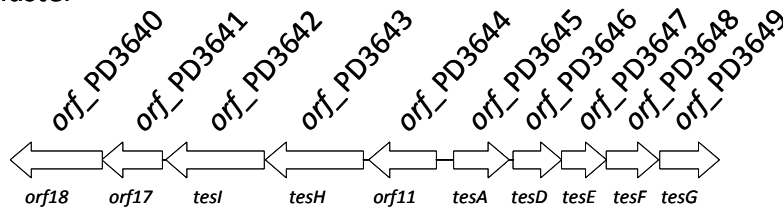
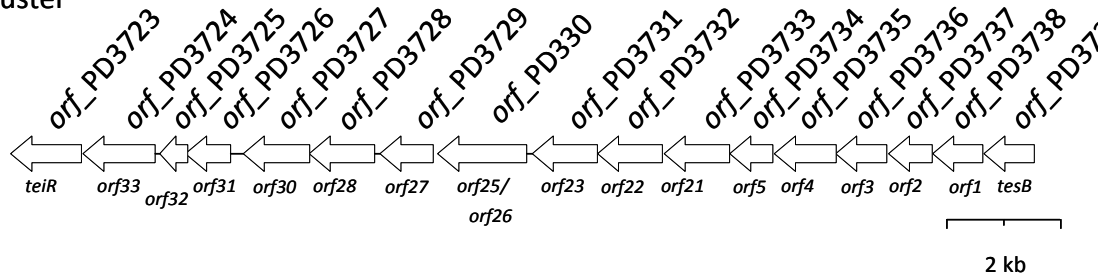
*tesH* Cluster*teiR* Cluster

Abbildung 32 Schematische Darstellung der Gencluster in *C. testosteroni* KF-1; Bezeichnung der Leserahmen: oben *orfs* aus *C. testosteroni* KF-1, unten (klein) korrespondierend von *C. testosteroni* TA441

Die Gene des Steroid-Abbaus konnten im Genom identifiziert werden und bilden hier zwei Cluster. Sowohl *tesH*- als auch das *teiR*-Cluster verfügen über mehrere hypothetische Operone. Die Organisation des *tesH*-Clusters im Stamm KF-1 ist analog zu *C. testosteroni* TA441. Stromaufwärts (upstream von *orf\_PD3640* (*orf18*)) wird dieser Cluster durch Gene der Glycin- und Leucin-tRNA begrenzt. Dagegen überschneidet sich *orf\_PD3649* (*tesG*), der letzte Leserahmen des Clusters, in seiner 3'-Region mit der 3'-Region von *orf\_PD3650* um 186 bp. Das von *orf\_PD3650* codierte putative Protein weist Homologie zu Rezeptoren der äußeren Zellmembran auf, welche Catechole binden können.

Im *teiR*-Cluster, in dem alle Gene in derselben Richtung liegen, kann in *C. testosteroni* TA441 eine Deletion des Leserahmens *orf25* oder *orf26* beobachtet werden. Beide Leserahmen sind im Stamm TA441 nahezu identisch, was auf eine Genduplikation in Stamm TA441 hindeutet. Neben dem Leserahmen *orf\_PD3723* konnten noch zwei weitere Leseraster identifiziert werden, welche eine hohe Ähnlichkeit zu *teiR* darstellen. Die von *orf\_PD3044* und *orf\_PD0431* codierten putativen Proteine unterscheiden sich allerdings in der Steroidbinderegion (siehe 3.1.2).

Mit *orf\_PD3103* wurde das Gen der im Testosteronabbau initialen 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ( *$\beta$ hsd*) ebenfalls im KF-1 Genom identifiziert. Das Gen ist allerdings außerhalb der Clusters im Genom zu finden und hat zum *tesH*-Cluster ca. 650 kb Abstand. Ebenfalls isoliert und ca. 36 kb stromaufwärts zu *teiR* liegt das Gen der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase (*hsdA/orf\_PD3679*). In der Region von *orf\_PD3679* ist mit *orf\_PD3678* das Gen der Ketosteroidisomerase assoziiert, so wie auch in *C. testosteroni*

ATCC11996 und KF-1 (Horinouchi et al. 2010; Xiong and Maser 2001; Xiong et al. 2003c). Allerdings führte eine Mutation dazu, dass der Leserahmen auf dem DNA-Gegenstrang unterbrochen wurde. Dieser Leserahmen codiert im Stamm ATCC11996 für RepA, einen Repressor der *hsdA* Expression. An Position 751 des „*repA*“-Leserahmens ist bei KF-1 ein Thymin anstatt eines Adenosins zu finden, wodurch ein Stop-Signal entsteht und die Translation von RepA nach 251 Aminosäuren abbricht. In KF-1 ist auch der Leserahmen von *repB* im Vergleich zu Stamm ATCC11996 verändert. RepB reprimiert die Translation von *hsdA* durch Bindung der mRNA. Der *repB* Leserahmen enthält in KF-1 eine Mutation an Position 60 (C→T), dadurch entsteht eine Stop-Sequenz und in Folge dessen nur ein partielles bzw. unvollständiges RepB-Protein in *C. testosteroni* KF-1.

Somit enthält das Genom von *C. testosteroni* KF-1 die nötigen Gene für die Expression der, zum Steroidabbau benötigten, Enzyme. Allerdings ist durch die vermutliche Abwesenheit von RepA und RepB ein anderes Regulationsschema zu erwarten.

### 3.7.2 Biochemische Analyse von *C. testosteroni* KF-1

Übernachtskulturen von *C. testosteroni* KF-1 und einer *teiR* Integrationsmutante *C. testosteroni* KF-1 GFPint2 (*teiR* Gen nicht mehr funktionstüchtig) wurden in SIN Medium mit 1 mM Testosteron im Medium inkubiert. Zum Startzeitpunkt und nach 16 Stunden wurde das Testosteron aus jeweils 1ml Kultur isoliert und per HPLC analysiert. Die Abbildung 33 zeigt die gemessene „Area under the curve“ (AUC), welche der Testosteronkonzentration im Medium entspricht.

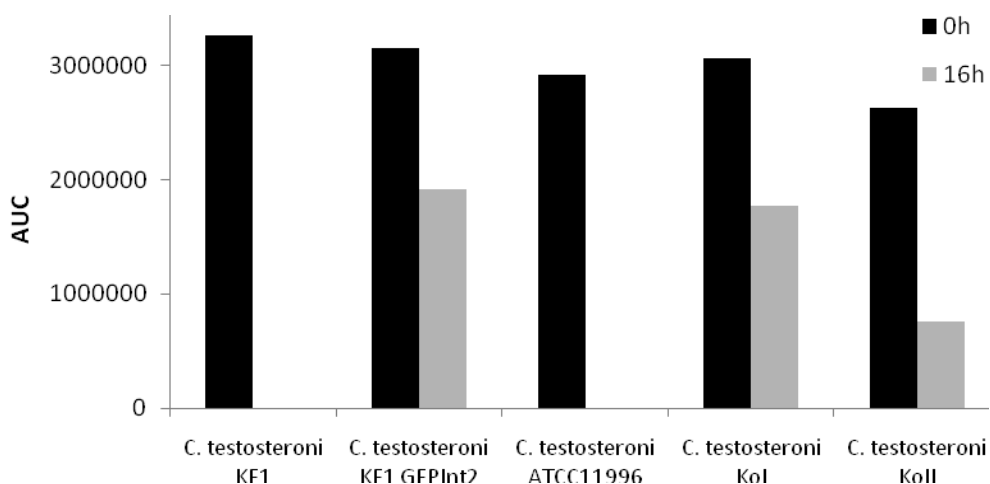


Abbildung 33 Testosteronkonzentration nach 0 und 16h Inkubation mit verschiedenen *C. testosteroni* Stämmen.

Auch bei *C. testosteroni* KF-1, ähnlich dem Kontroll-Stamm *C. testosteroni* ATCC1196, konnte nach 16 Stunden Inkubation kein oder nur geringe Mengen an Testosteron im

Medium nachgewiesen werden. Das deutet stark auf einen Abbau von Testosteron durch *C. testosteronei* KF-1 vornehmlich über den 9,10-Secosteroid-Weg hin, da die Metabolite 4-Androsten-3,17-dion und 1,4-Androstadien-3,17-dion ebenfalls detektiert wurden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch durch die Disruption des *TeiR-homologen* in *C. testosteronei* KF-1 der Abbau von Testosteron gehemmt werden kann. Denn bei der *C. testosteronei* KF-1 Mutante GFPint2, in der das *teiR* Gen durch *gfp* Integration inaktiviert wurde, zeigte sich ein ähnlicher geringerer Testosteronabbau wie er auch in den Kontrollen *C. testosteronei* kol und *C. testosteronei* koll zu beobachten war. In *C. testosteronei* kol und *C. testosteronei* koll wurde das *teiR* Gen ebenfalls durch Integration inaktiviert. Aus dem Vergleich zwischen *C. testosteronei* KF-1 und *C. testosteronei* ATCC11996 bzw. den *teiR* inaktivierten Mutanten kann geschlossen werden, dass *C. testosteronei* KF-1 in der Lage ist Steroide wie Testosteron zu verwerten und dass hier ebenfalls *TeiR* als Master Regulator fungiert. Weiterhin wurde untersucht, ob die Induzierbarkeit von *hsdA* im Stamm KF-1 der von *C. testosteronei* ATCC11996 entspricht. Auf DNA- und Protein-Ebene unterscheiden sich die Gene der Stämme nur marginal (87% und 89% Identität).

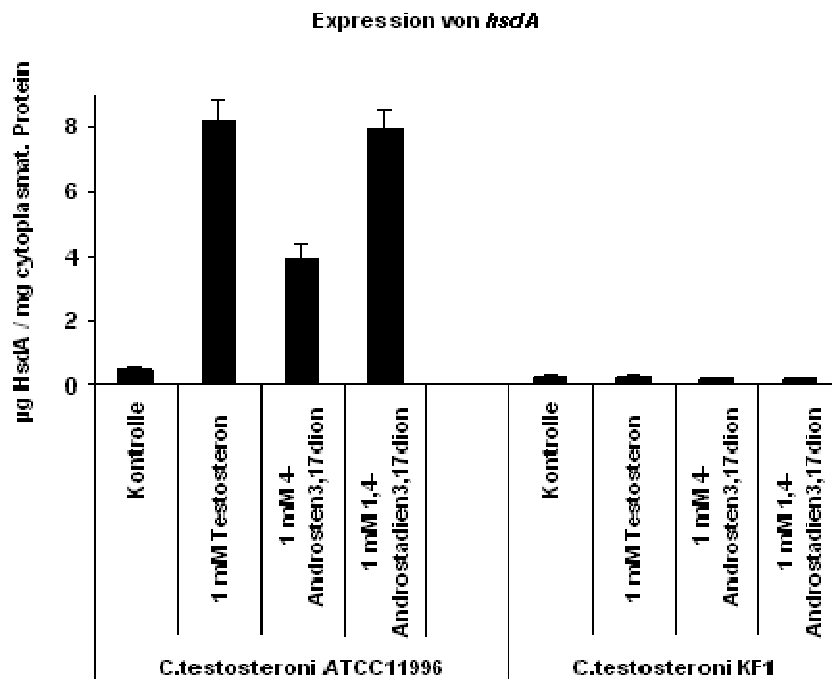


Abbildung 34 Vergleich *hsdA* Expression von *C. testosteronei* ATCC11996 und *C. testosteronei* KF-1

Aus Abbildung 34 wird deutlich, dass die Expression von *hsdA* durch die Anwesenheit von Testosteron, 4-Androsten-3,17-dion und 1,4-Androstadien-3,17-dion in *C. testosteronei* ATCC11996 induzierbar war. Dagegen konnte in *C. testosteronei* KF-1 in mehreren

Versuchen keine Induktion der *hsdA* detektiert werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass HsdA in *C. testosteroni* KF-1 nicht unter Kontrolle der getesteten Steroide steht.

### **3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Durch biochemische und fluoreszenz-mikroskopischen Analysen konnte die Lokalisation von TeiR gezeigt und vorher erzielte Ergebnisse bestätigt werden. Weiterhin konnte eine für die  $\beta$ -Proteobakterien einzigartige Steroidbinderegion innerhalb von TeiR identifiziert und analysiert werden. Mithilfe von radioaktiven Nukleotidtriphosphaten wurde TeiR eine Histidin-Kinasefunktion zugeordnet, die höchstwahrscheinlich C-Terminal lokalisiert ist. Die Funktionalität wurde durch Reporter-gen-Assays verifiziert. Auch TeiR-abhängige Gene und deren Transkriptionseinheiten wurden analysiert. Die globale Rolle von TeiR in der Regulation zeigte sich auch in einer Proteomanalyse mittels 2D-PAGE. Hier war durch Überexpression von *teiR* eine Veränderung des Proteinmusters um 15% zu erkennen. Es wurde auch der Testosteron-Abbau in *C. testosteroni* KF-1 nachgewiesen und zwei weitere Faktoren zu dessen Regulation identifiziert.

## 4 Diskussion

Die Regulation des Steroidmetabolismus in Bakterien und auch im Modellorganismus *C. testosteronei* wurde bisher nur unzureichend beschrieben. Dabei sind die meisten Proteine und deren Gene im Testosteron-Stoffwechselweg bereits beschrieben worden (Horinouchi et al. 2005; Horinouchi et al. 2003a; Horinouchi et al. 2003b; Horinouchi et al. 2004). Weiterhin wurden auch für das Gen der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/ Carbonylreduktase (*hsdA*) Regulationsmechanismen postuliert (Xiong et al. 2001; Xiong et al. 2003c). Die Repressoren RepA und RepB kontrollieren die Expression von *hsdA* auf Transkriptions- und Translationsebene. Für das TeiR Protein aus *C. testosteronei* wurde ebenfalls eine Regulation von *hsdA* als auch für die im Testosteronabbau initiale 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase ( *$\beta$ hsd*) postuliert (Pruneda-Paz et al. 2004a). Durch eine nähere Untersuchung von TeiR als auch dessen Effekten soll ein Bild der Steroidregulation in *C. testosteronei* entstehen bzw. vervollständigt werden. Hierzu soll auf mikrobiologische, biochemische als auch bioinformatische Verfahren zurückgegriffen werden.

### 4.1 Lokalisation von TeiR

Zur Untersuchung der Lokalisation von TeiR wurden sowohl biochemische als auch fluoreszenz-mikroskopische Methoden verwendet. Um TeiR nachweisen zu können, musste eine Methodik für die Isolierung aus der Membranfraktion erarbeitet werden. Hierzu wurden die cytosolischen Zellbestandteile abgetrennt und die Fraktion der Membranfragmente weiter bearbeitet. Nach einem Waschschrift konnte TeiR mittels eines SLS-Puffers aus der Membranfraktion sowohl in *E. coli* als auch in *C. testosteronei* isoliert werden. Allerdings konnte nicht geklärt werden, ob das etablierte Protokoll eine quantitative Isolierung von TeiR aus der Membran ermöglichte. In transformierten *E. coli*-Zellen konnte ein TeiR -Verhältnis von Cytosol zu Membran von 1:3,37 ermittelt werden. Daher kann angenommen werden, dass auch im *E. coli* System TeiR durch eine Signalsequenz oder eine hydrophobe Domäne an der Membran lokalisiert ist. Durch den Waschschrift konnten vorwiegend leicht assoziierte Proteine von der Membran separiert werden. Daher scheint TeiR durch eine andere, möglicherweise kovalente, Interaktion in der Membran integriert oder an ihr assoziiert vorzuliegen. In der Primärstruktur von TeiR konnte kein Signalpeptid am N-Terminus für eine Sec- oder Tat- abhängige Translokation mit den vorhandenen Methoden nachgewiesen werden (Bendtsen et al. 2004). Es besteht aber auch die Möglichkeit für eine Integration in die Membran. Hierfür würden Signalsequenzen für einen Sec-, YidC-abhängigen oder noch völlig unbekanntem Mechanismus innerhalb des Proteins nötig sein (Natale et al. 2008). In vielen integralen Membranproteinen wurde noch keine Signalsequenz gefunden (Facey and Kuhn 2004). Allerdings wurde in einem Protein des Phagen M13 eine Sequenz von 3



Leucinen und 16 Alaninen als Membrananker identifiziert (Xie et al. 2007). Ein Unterschied in der Protein-Translokationsmaschinerie könnte auch den Grund für das unterschiedliche Verhalten von TeiR in *E. coli* und *C. testosteroni* liefern. Womöglich wird TeiR innerhalb der Membran von *C. testosteroni* durch einen Faktor am Zellpol gehalten (Shapiro et al. 2009). Die Abwesenheit dieses Faktors führt zu einer unpolaren Membranlokalisation von TeiR in *E. coli*. Auch in *C. testosteroni* Zellen konnte das TeiR-Protein aus der Membranfraktion mittels Immunofluoreszenz- und Westernblot-Analyse identifiziert und später isoliert werden (Gohler et al. 2008; Linares et al. 2008). Das Verhältnis zwischen cytosolischen und membranständigen TeiR betrug in dem verwendeten Assay 1:30. Wenn die *C. testosteroni*-Zellen allerdings mit Testosteron inkubiert wurden, sank dieses Verhältnis auf 1:5 ab. Die Abnahme des membrangebundenen TeiR nach Testosterongabe lässt auf einen Regulationsmechanismus schließen. Eine Autoregulation oder Vernetzung mit anderen Faktoren, wie etwa weiteren Proteinen, könnten hier mögliche Mechanismen sein.

Um zu verifizieren, ob die TeiR-Lokalisation spezifisch am Zellpol von *C. testosteroni* stattfindet, wurde auch die Position eines weiteren Proteins in der Zelle untersucht. Aufgrund bioinformatischer Analysen der publizierten Genomsequenz von *C. testosteroni* KF-1 (Schleheck et al. 2004) wurde ein Leserahmen identifiziert, der für ein polares Protein kodieren könnte. Der Leserahmen *orfPD1500* kodiert für ein Protein, welches dem Aer-Protein aus *E. coli* und *P. putida* ähnlich ist (Sarand et al. 2008; Taylor et al. 1999). Aer ist ein FAD-bindendes Protein, welches als Aerotaxis-, Energie- und Redox-Sensor dient (Amin et al. 2006). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit kann diese Funktion auch vom Protein PD1500 angenommen werden. Proteine wie Aer, die zu den Mitgliedern des Chemotaxisapparats zählen, sind somit auch Vertreter der Methyl-akzeptierenden Chemotaxis-Proteinen (MCP) (Taylor et al. 1999). Die MCP Proteine sind in unterschiedlichen Bakterien polar organisiert (Bardy and Maddock 2005; Sourjik and Berg 2000). An den Zellpolen bilden sie Trimere von Dimeren (Vaknin and Berg 2006; 2007; 2008). Aufgrund dieser Struktur kann das zu transduzierende Signal verstärkt werden (Kentner and Sourjik 2009). Durch Fluoreszenz-Mikroskopie konnte ein mit CFP-fusioniertes Protein von OrfPD1500 am Zellpol von *C. testosteroni* nachgewiesen werden. Damit zeigte sich, dass die polare Lokalisation von TeiR kein Artefakt sein kann. TeiR scheint also ein Mitglied der MCP-Proteine von *C. testosteroni* zu sein, wobei eine Interaktion mit den MCP-Clustern noch nachzuweisen wäre. Da *teiR*-defiziente Mutanten von *C. testosteroni* nicht mehr zur Testosteron-abhängigen Chemotaxis fähig waren (Gohler et al. 2008), bekräftigt dies die Vermutung, dass TeiR wahrscheinlich Mitglied der MCP ist.

Die Deletion des N-Terminus von TeiR führte in *E. coli* zu einem Verlust der Membranständigkeit. Innerhalb dieser 97 Aminosäuren umfassenden Deletion konnte keine

Signalsequenz identifiziert werden. Eine Deletion des N-Terminus führte in *C. testosteroni* zu keiner signifikanten Änderung der TeiR-Position. Das Fluoreszenzsignal der N5TeiR-GFP Fusion (deletierte 97 N-terminale Aminosäuren) entsprach im wesentlichen dem Signal von TeiR-GFP, wobei eine leichte Verschiebung der Fluoreszenz ins Cytoplasma beobachtet werden konnte. Hier könnte ein weiterer Faktor relevant sein, der selbst polar lokalisiert ist und TeiR am Zellpol fixieren könnte. Die hypothetische Binderegion zwischen TeiR und dem polaren Faktor konnte nicht identifiziert werden. Allerdings sind die PAS-Domänen auch für die Fähigkeit bekannt, die Protein-Protein-Interaktion in Homo- und Heterodimere vermitteln zu können (Gu et al. 2000; Hefti et al. 2004; Taylor and Zhulin 1999). Auch TeiR besitzt im zentralen Teil eine solche PAS-Domäne. Demnach wäre eine solche Interaktion durchaus möglich.

## 4.2 Testosteronbindung

Durch Bindeassays mit Tritium-markiertem Testosteron konnte gezeigt werden, dass das TeiR-Protein in der Lage war dieses Steroid zu binden. Vorausgegangene Experimente ließen vermuten, dass sich das Vorhandensein von Membranpartikeln positiv auf die Testosteronbindung von TeiR auswirkt. Daher wurden Membranvesikel von transformierten *E. coli* Zellen in diesem Assay verwendet. Durch dieses Experiment konnten jedoch keine Bindungsparameter bestimmt werden und die Bindung musste relativ zum Wildtyp erfolgen. Weiterhin war das Verhältnis von membranassoziiertem zu cytosolischem TeiR in transformierten *E. coli* Zellen ähnlich dem von *C. testosteroni* unter Testosteroneinfluss (siehe 3.1.1.1).

Die Analyse mehrerer TeiR-Mutanten zeigte, dass eine zentrale Region für die Bindung von Testosteron nötig war. Ein Hydrophatite-Plot zeigte eine hydrophobe Region in der Primärstruktur des Proteins auf. Diese 20 Aminosäuren lange Sequenz befindet sich genau vor der PAS-Domäne. Die Deletion dieser kurzen Sequenz führte im TeiR-Protein zu einem Verlust der Testosteronbindung. Daher kann die 20 Aminosäure kurze Region für die Testosteronbindung verantwortlich gemacht werden. Durch bioinformatische Analysen konnte die Einmaligkeit dieser Region innerhalb des Taxons bewiesen werden. Es zeigten sich keine Übereinstimmungen zu bereits beschriebenen eukaryotischen Testosteronbindemotiven (Beato et al. 1989).

### 4.3 Kinasefunktion von TeiR

Vorangegangene Untersuchungen ließen vermuten, dass TeiR durch Phosphoryltransfer an der Steroid-abhängigen Signaltransduktion teilnehmen könnte. Durch die Entwicklung eines Kinase-Assay, ähnlich dem Testosteron-Bindeassay, konnte ein Phosphorylierungsereignis nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass TeiR nur zusammen mit cytosolischem Protein dieses Phosphorylierungsereignis hervorrufen konnte, welches durch den Waschschrift nicht wieder abgetrennt werden konnte. Der Zeitpunkt bzw. die Wachstumsphase in der sich die Kultur befand war weiterhin wichtig. Die Bakterienkultur musste sich in der stationären Phase befinden, wenn die cytosolischen Proteine und kleine Moleküle extrahiert wurden. Auch die Art des verwendeten radioaktiven Nukleotidtriphosphates wirkte sich auf die Phosphorylierung aus. Nur durch die Verwendung von  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP}$  konnte eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Weiterhin führte eine Gabe von nicht markiertem GTP zu einer Abschwächung des gemessenen radioaktiven Signals, was auf eine kompetitive Hemmung schließen lässt. Die nachgewiesene Phosphorylierung war instabil unter sauren, aber beständig unter alkalischen Bedingungen. Diese Eigenschaft ist typisch für eine Phosphorylierung an Stickstoffatomen, und schloss somit die in Signaltransduktionsprozesse phosphorylierten Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin aus (Klumpp and Krieglstein 2002). Die einzige Aminosäure mit Stickstoffatomen in der Seitenkette und nachgewiesener Funktion in der Signaltransduktion ist Histidin. Es enthält im Imidazolring der Seitengruppe zwei Stickstoffatome, die mit  $\delta 1$  und  $\epsilon 2$  bezeichnet werden. Durch eine Phosphorylierung können nun  $\delta 1$ - und  $\epsilon 2$ -Histidyl-Phosphate entstehen. Diese unterscheiden sich durch ihre Halbwertszeiten in sauren und neutralen pH-Bereichen (Hultquist 1968). So wurden die Halbwertszeiten von  $\delta 1$ - und  $\epsilon 2$ -Histidyl-Phosphat in 1 M HCl mit 18, respektive 25, Sekunden bestimmt (Hultquist 1968). Phosphorylierte Histidine gelten als hochenergetisiert und haben die Tendenz die Phosphatgruppe weiterzugeben (Attwood et al. 2007; Stock et al. 1990). Daher werden Histidin-Phosphorylierungen in verschiedenen zellulären Mechanismen gefunden. Neben den Enzymen Nucleosid-Diphosphatkinase (Lascu et al. 1983) und Succinyl-CoA-Synthetase (Fraser et al. 2000) sind Phosphorylierungen an Histidinresten in Regulations- und Signaltransduktionsprozessen weit verbreitet (Puttick et al. 2008). So sind phosphorylierbare Histidine im Phosphotransferase-System (PTS) innerhalb des Zuckertransports über die Membran beteiligt, wobei hier Phosphoenolpyruvat als Donor dient (Puttick et al. 2008). Daneben finden sich Histidinphosphate in Zweikomponenten-Systemen (TCS). Diese Signaltransduktionssysteme, deren Gene im Mittel ca. 1% der im Genom vorhandenen Leserahmen ausmachen, sind essentiell für die Wahrnehmung und Transduktion von Umweltreizen in Bakterien (Puttick et al. 2008). Bei TCS wird vorrangig der  $\epsilon 2$ -Stickstoff phosphoryliert (Surette et al. 1996). Zweikomponenten Systeme bestehen aus zumeist zwei

Proteinen, einem Sensor und einem Response Regulator. Der Sensor ist für die Wahrnehmung eines Stimulus zuständig. Nach der Wahrnehmung des Signals wird er an einem Histidinrest (auto-)phosphoryliert. Anschließend wird der Phosphatrest auf ein Aspartatrest im Response Regulator (RR) weitergegeben, der dadurch aktiviert bzw. deaktiviert werden kann. Durch Dephosphorylierung des Response Regulators wird dieser wieder in den Ausgangszustand überführt (Parkinson 1993). Die Bildung eines Sensor-Dimers ist allerdings Voraussetzung für diesen Phosphotransfer. Die initiale Phosphorylierung erfolgt an einer Domäne, welche eine Helix-turn-Helix Struktur enthält (Khorchid and Ikura 2006). Auch im C-Terminus von TeiR konnte eine solche Struktur identifiziert werden (Gohler et al. 2008; Pruneda-Paz et al. 2004b). In Reaktionen mit dem TeiR-C-Terminus und cytosolischem Protein konnte ebenfalls ein Phosphorylierungsereignis nachgewiesen werden. Dieser enthält auch das benötigte Histidin an Position 360.

Neben ATP dient auch GTP als Donor der Phosphorylgruppe (Scaramozzino et al. 2009). Eine ATPase- oder GTPase-Domäne, wie sie zum Spalten von ATP oder GTP notwendig und in daher vielen Histidinkinasen vorhanden ist, konnte in TeiR nicht nachgewiesen werden. Folglich muss ein anderes Protein für die Phosphorylierung am Histidin verantwortlich sein. Dies erklärt auch die Notwendigkeit von cytosolischem Protein im Reaktionsansatz. Daher ist im verwendeten Cytosol von *C. testosteroni* mindestens ein Faktor vorhanden, der für die Funktion von TeiR nötig ist. Phosphorylierte Histidinreste geben die Phosphatgruppe zumeist an ein Aspartatrest weiter. Dieser Rest kann sich entweder im selben wie auch in einem anderen Protein befinden. Der Rezipient der Phosphatgruppe von TeiR konnte trotz mehrerer Ansätze nicht ermittelt werden.

#### 4.4 Funktion von TeiR

Die Aktivität von TeiR wurde sowohl in *E. coli* als auch in *C. testosteroni* untersucht. Als Reportersystem wurde HsdA gewählt und ein bereits etablierter ELISA verwendet (Gohler et al. 2008). Bei Untersuchungen in *E. coli* wurde das *hsdA*-Gen über das Plasmid p6 (Xiong et al. 2003a) eingebracht. Dieses Plasmid enthält neben dem Reporter gen *hsdA* die Gene der beiden Repressoren *repA* und *repB*, als auch den *ksi*-Leserahmen. Wobei die Leserahmen *hsdA* und *ksi* höchstwahrscheinlich auf einer mRNA liegen (siehe 3.4). Die Zugabe von Testosteron kann die *hsdA*-Expression, durch die resultierende Hemmung von RepA und RepB, auch in transformierten *E. coli*-Zellen induzieren. Im kotransformierten *E. coli*-Stamm wurde die Menge an HsdA (3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase) nach 16 bis 18 Stunden als Maß für die Funktionalität verwendet. Der Einfluss von TeiR auf *hsdA* konnte bereits in *C. testosteroni* gezeigt werden (Pruneda-Paz et al. 2004b).

Durch Kotransformation von p6 und dem *teiR*-tragenden Plasmid pKteiR10 konnte gezeigt werden, dass nach mindestens 16 Stunden Kultivierung im Cytosol von *E. coli* eine erhöhte Menge HsdA vorlag (Gohler et al. 2008). Mit diesem System wurden nun auch verschiedene Versionen von *teiR* auf Funktionalität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des N-Terminus bis zu 168 Aminosäuren ohne Auswirkungen auf die Funktion hatte. Auch die Deletion der Steroidbinderegion führte überraschenderweise nicht zu einem Verlust der TeiR-Aktivität. Daher scheint die Testosteronbindung von TeiR in transformierten *E. coli*-Zellen die Funktionalität des Proteins nicht zu bedingen. Denn auch ohne Testosterongabe ist TeiR im *E. coli* Reportersystem aktiv (siehe 3.2). Weiterhin zeigt das Verhältnis von membrangebundenen zu cytosolischem TeiR in *E. coli* und *C. testosteronei* klare Unterschiede (siehe 3.1.1.1). Allerdings gleicht sich das Verhältnis zwischen *E. coli* und *C. testosteronei* unter Testosteroneinfluss. Daher könnte ein Zusammenhang zwischen dem Membran-Cytosol-Verhältnis und der TeiR-Aktivität bestehen. Eine Deletion des C-Terminus führte dagegen immer zu einem Verlust der Aktivität von TeiR. Ähnliches konnte beobachtet werden, wenn größere Deletionen des zentralen Bereiches untersucht wurden. In diesem Bereich wurde eine PAS-Domäne identifiziert (Pruneda-Paz et al. 2004b). Der Name der PAS-Domänen leitet sich von den Proteinen, **P**er aus *Drosophila*, welches den circadianen Rhythmus kontrolliert, **A**RNT (Arylhydrocarbon-Receptor/Ahr – nuclear translocator) aus Mammalia und **S**IM ebenfalls aus *Drosophila* ab. Da bisher nur eine extrazelluläre PAS-Domäne experimentell nachgewiesen wurde (Reinelt et al. 2003), geht man davon aus, dass diese Domänen intrazelluläre Funktionen erfüllen. Im Allgemeinen sind sie in Proteinen zu finden, welche Umwelt- oder Entwicklungssignale perzipieren (Gu et al. 2000). Ihr Sensor-Spektrum reicht vom Redoxstatus der Zelle über Sauerstoff und Licht, bis hin zum Energiestatus der Zelle (Taylor and Zhulin 1999). PAS-Domänen sind in der Lage, Kofaktoren wie FAD, FMN und Heme zu binden (Bibikov et al. 1997; Crosson and Moffat 2001; Gong et al. 2000). Die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren kann ebenfalls durch PAS-Domänen katalysiert werden (Gu et al. 2000). Eine Deletion der PAS-Domäne könnte somit zu einem Verlust der Dimerisierungsfähigkeit und/oder Kofaktorbindung von TeiR führen. Auch Deletionen im C-terminalen Teil von TeiR führten zu einem Verlust der Funktion. In diesem Bereich wurde ein Helix-Turn-Helix-Motiv beschrieben (Pruneda-Paz et al. 2004b). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Teil auch an einem Phosphorylierungsereignis beteiligt ist (siehe 3.1.2). Somit ist der Funktionsverlust durch die Deletion auf eine fehlende Phosphorylierung zurückzuführen. Dies wird auch durch die Experimente in *C. testosteronei* belegt. Hier wurde über homologe Rekombination TeiR am C-Terminus verkürzt. Zwei von drei erstellten Mutanten besaßen kein Histidin 360, an dem die Phosphorylierung höchstwahrscheinlich stattfindet. Eine Mutante von TeiR besitzt mit 364 Aminosäuren Länge dieses Histidin, allerdings nur weitere vier Aminosäuren. Dadurch wird

die Helix-Struktur nicht stabilisiert und folgt in einer niedrigeren Phosphorylierungsrate, was wiederum zu einer eingeschränkten Funktionalität führt.

Der Abstand zwischen der PAS-Domäne und dem HTH-Motiv hat ebenfalls einen Einfluss auf die Funktionalität von *TeiR*. Deletionen innerhalb dieses Bereiches führten zu einem Verlust der *TeiR*-Funktion. Dagegen war bei einem Einfügen von zwei Aminosäuren keine funktionale Abnahme zu beobachten. Daher scheint eine minimale, zwei Aminosäuren zusätzlich umfassende, Änderung der Primärstruktur keinen oder möglicherweise sogar einen steigenden Einfluss auf die *TeiR*-Aktivität zu haben. Bei den hier eingefügten Aminosäuren Lysin und Leucin handelt es sich um Moleküle, die in dieser Region des *TeiR*-Proteins wahrscheinlich zu keinen größeren strukturellen Unterschieden führen. Zusammenfassend wirkte sich die Deletion des interdomänen Bereiches zwischen PAS und HTH-Motiv negativ auf die Aktivität von *TeiR* aus. Ein Grund wäre der verminderte Abstand zwischen beiden Regionen, welcher jedoch bei einer Übertragung des Signals, nach der Anlagerung des Steroids an die Steroidbinderegion über die PAS-Domäne zum HTH-Motiv, nötig ist. Durch den verringerten Abstand könnte eine etwaige Konformationsänderung möglicherweise nicht weitergeleitet werden oder eine Dimerisierung wäre sterisch nicht mehr möglich. Ein anderer Grund könnte eine bisher nicht näher beschriebene funktionelle Region innerhalb der deletierten Bereiche sein, welche für die Funktion von *TeiR* nötig ist.

#### 4.5 *TeiR* Abhängige Transkripte

*teiR*-Zellen von *C. testosteronei* waren nicht mehr in der Lage, Testosteron zu metabolisieren. Daher besteht der Verdacht, dass mehr als nur *hsdA* und *βhsd* von *TeiR* beeinflusst werden (Gohler et al. 2008; Horinouchi et al. 2004; Linares et al. 2008; Pruneda-Paz et al. 2004a). Weiterhin waren vorangegangene Untersuchungen unstimmtig und es wurden unterschiedliche Parameter zur Kultivierung gewählt.

Die Gene der im Steroid-Stoffwechsel involvierten Enzyme 3 $\alpha$ -HSD/CR, *hsdA*, der im Testosteronabbau initialen 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase, *tesH* und der A-Ring spaltenden 2,3 Dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase, *tesB*, wurden erfolgreich untersucht. Weiterhin konnten die Gene der Regulatoren *TeiR* (*teiR*), *ActA* (*actA*) und eines LysR-Typ Regulators (*lysR*), downstream von *hsdA*, untersucht.

Die Expressionsanalyse von *hsdA* bestätigte die vorangegangenen Untersuchungen (Pruneda-Paz et al. 2004a). Zellen, welche nicht in der Lage waren ein funktionales *TeiR* zu synthetisieren, zeigten unter Testosteronzugabe keine oder eine stark verminderte *hsdA*-Expression. Weiterhin war nach der Zugabe von 1,4-Androstadien-3,17-dion keine oder eine reprimierte *hsdA*-Expression nachweisbar. Dies lässt auf einen weiteren Mechanismus auf Ebene des zweiten Intermediates des Testosteronstoffwechsels schließen. Allerdings konnte

nach Inkubation mit 1,4-Androstadien-3,17-dion in *C. testosteronei* ATCC11996 eine erhöhte Menge HsdA nach mindestens 16 Stunden Wachstum nachgewiesen werden (siehe 3.7.2 & Abbildung 34). Daher scheinen neben der Expressionsrate von *hsdA* auch die Transkriptionsrate und die Lebensdauer des maturen Proteins von externen Reizen beeinflusst zu werden. In *C. testosteronei* ATCC11996 befindet sich einige Basenpaare downstream des *hsdA*-Gens die Sequenz der Ketosteroidisomerase, *ksi* (Xiong et al. 2001). Durch eine PCR-basierte Analyse konnte, in Korrelation mit weiteren Voruntersuchungen, gezeigt werden, dass *hsdA* und *ksi* gemeinsam zu einer Transkriptionseinheit gehören. Dieses putative Operon scheint nur *hsdA* und *ksi* zu umfassen.

Da die Sequenz von *tesH* in *C. testosteronei* ATCC11996 nicht bekannt war, wurde diese innerhalb dieser Studien bestimmt. Es hatte sich gezeigt, dass die *tesH*-Gene der Stämme KF-1 und ATCC11996 zu 90% identisch sind und die abgeleiteten Primer von KF-1 auch bei Arbeiten mit dem Stamm ATCC11996 genutzt werden konnten. Durch die Analyse der Transkripte konnte auch für *tesH* gezeigt werden, dass dieses abhängig von einem funktionalen *teiR* ist. Für *tesH* wurde das Verfahren der „Solution-based-Sandwich-Hybridization“ (SBSH) angewendet (Thieme et al. 2008). Bei diesem für *C. testosteronei* etablierten Verfahren wurden die *tesH*-mRNA Moleküle direkt in den Zellextrakten nachgewiesen. Die Untersuchung zeigte, dass auch 1,4-Androstadien-3,17-dion in der Lage war die *tesH*-Expression zu induzieren. Dagegen schien eine Überexpression von *teiR* diesen Effekt nicht auszulösen. Dies lässt auf einen mehrstufigen, *teiR*-abhängigen Mechanismus der Induktion der *tesH*-Expression schließen. Auch in den RT-Experimenten konnte eine Induktion der *tesH*-Expression dargelegt werden, obgleich diese hinter Testosteroninduktion und der Kontrolle zurücksteht. Dies deutet auf eine Reprimierung durch andere Faktoren, wie zum Beispiel leichter zu verwertende Kohlenstoffquellen hin. In Experimenten anderer Arbeitsgruppen konnte über Northernblot nachgewiesen werden, dass die Synthese von *tesH*-mRNA durch Testosteron in den Stämmen ATCC11996 als auch in TA441 induzierbar ist (Horinouchi et al. 2003b; Pruneda-Paz et al. 2004a). Dies konnte durch die durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden, wobei nach 12 Stunden die höchste Menge *tesH*-mRNA detektiert werden konnte. Weiterhin wurde auch für die mRNA, des downstream von *tesH* befindlichen Leserahmens *orf18*, ein ähnliches Expressionsmuster nachgewiesen (Horinouchi et al. 2003b). Es besteht der Verdacht, dass *tesH* polycistronisch transkribiert wird und diese Transkriptionseinheit bis hin zu *orf18* reicht.

Die 2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase, TesB, katalysiert die Spaltung des phenolischen A-Ringes im Steroidabbau. Das Gen *tesB* wurde in *C. testosteronei* ATCC11996 als auch in den Stämmen TA441 und KF-1 identifiziert (Horinouchi et al. 2001; Skowasch et al. 2002)(siehe 3.7.1). Das *tesB*-Gen liegt am Anfang eines Abbaucusters (Horinouchi et al.

2003b). Durch die Untersuchungen konnte für *tesB* ebenfalls eine *TeiR*-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Nach Gabe von Testosteron konnte im *C. testosteroni*-Wildtyp, allerdings nicht im *teiR*-defizienten Stamm kol, ein erhöhter *TesB*-Transkriptlevel detektiert werden. Da *tesB* am Anfang eines Steroid-Abbau-Clusters liegt ist hier eine Operonstruktur wahrscheinlich. Diese These konnte weiter untermauert werden, da *tesB* zusammen mit dem Leserahmen *orf1* (nach Horinouchi et al. 2005) auf einem Transkript nachgewiesen werden konnte. Der Leserahmen *orf1* kodiert für eine putative Coenzym A-Transferase, deren Funktion im Steroidmetabolismus noch nicht näher bestimmt wurde. Analog zu der *tesB*-Induktion in *C. testosteroni* ATCC11996 konnte in Stamm TA441 eine Induktion der *tesB*-mRNA mittels Northernblot, nach Wachstum in Minimalmedium und Testosteronzugabe, nachgewiesen werden (Horinouchi et al. 2003a). Auch Cholsäure und 1,4-Androstadien-3,17-dion zeigten *tesB*-induzierende Eigenschaften in *C. testosteroni* TA441 (Horinouchi et al. 2005; Horinouchi et al. 2003a). Dagegen konnte bei Stamm ATCC11996 in den hier durchgeführten Analysen nur eine marginale Induktion von *tesB* durch 1,4-Androstadien-3,17-dion gezeigt werden (siehe 3.3).

Die Analyse der *teiR*-Transkription zeigte, dass die *teiR*-Expression selbst durch Steroidzugabe reprimiert und auch induziert werden kann. *TeiR* wurde initial als **testosterone-inducible Regulator** beschrieben (Pruneda-Paz et al. 2004b). Das *teiR* Gen ist am Ende eines Steroidabbau-Clusters in *C. testosteroni* TA441 lokalisiert (Horinouchi et al. 2004). Eine ähnliche Lokalisation wird auch in *C. testosteroni* ATCC11996 vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionseinheit von *teiR* noch mindestens einen weiteren Leserahmen, *orf33*, enthält. Dieser Leseraster kodiert für eine putative Acyl-CoA-Thiolase, der noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (Horinouchi et al. 2005). Die Expression von *teiR* wird in Kulturen des Wildtyps in Anfangsstadien des Wachstums und bei Testosteronanwesenheit gehemmt. Auch 1,4-Androstadien-3,17-dion ist in der Lage die Expression zu reprimieren. Dies lässt sich durch einen Autoregulationsmechanismus erklären.

Upstream des *hsdA* Leserahmens wurde ein putativer Regulator der *hsdA*-Expression identifiziert (Xiong et al unpubl.). Dieser Regulator wird vom Gen *actA* codiert. Auch in dessen Expression konnte eine *TeiR*-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Ein weiterer beteiligter Faktor konnte in Nähe von *repB* im Genom von *C. testosteroni* KF-1 und ATCC11996 nachgewiesen werden. Der identifizierte Leserahmen codiert für einen LysR-Typ-Faktor, dessen Gen wurde mit *lysR* bezeichnet (Xiong et al unpubl.). Bei der Regulation dieses Faktors scheint *TeiR* eine Rolle zu spielen. Allerdings ist diese aus der Transkriptionsanalyse noch nicht klar ersichtlich.



## 4.6 Analyse des Proteoms unter TeiR Einfluss

Eine Analyse der löslichen Proteine von *C. testosteronei* ATCC11996 und *C. testosteronei* mit pBB16teiR zeigte deutliche Unterschiede im Expressionsmuster. Die Überexpression von *teiR* führte sowohl zu einer Steigerung als auch zu einer Reduktion von bestimmten Proteinkonzentrationen. Daher zeigte eine hohe Konzentration von TeiR in der Zelle, unabhängig vom Vorhandensein von Testosteron, einen Einfluss auf ca. 15% der Proteine im analysierten Bereich.

## 4.7 Weitere Faktoren

Nahe dem bereits beschriebenen Genclustern im Steroidmetabolismus von *C. testosteronei* konnten, durch die Publikation der Genomsequenz von *C. testosteronei* KF-1, weitere Faktoren identifiziert werden. Zwei Leserahmen nahe dem *actA* und dem *teiR*-Gen kodieren für hypothetische LysR-Typ-Regulatoren. Beide Leserahmen, *orf5315* und *orf5348*, wurden kloniert und auf ihre Funktionalität hin untersucht. Es zeigte sich, dass *orf5348* in der Lage war, die Expression von *hsdA* im p6-Reportersystem zu induzieren. Weiterhin zeigte *orf5315* eine Abschwächung der *hsdA*-Induktion in *C. testosteronei*. Dies deutet auf einen Einfluss dieser beiden Regulatoren im Steroidmetabolismus von *C. testosteronei* hin.

Durch bisherige Untersuchungen entstand der Eindruck, dass zur Funktionalität von TeiR ein weiterer, cytosolischer Faktor nötig ist. Durch die Ergebnisse der zeitabhängigen Bestimmung der HsdA-Konzentration in kotransformierten *E. coli*-Zellen konnte dieser Verdacht erhärtet werden. Nur Zellen, die sowohl *teiR* exprimierten und sich in der stationären Phase befanden, zeigten eine erhöhte HsdA-Konzentration innerhalb des Cytoplasma. Die stationäre Phase im Wachstumsverlauf einer Bakterienkultur wird durch mangelnde Verfügbarkeit von Energie, Kohlenstoff, Phosphat oder Stickstoff bedingt. Der Wechsel vom logarithmischen Wachstum zur stationären Phase ist durch verschiedene morphologische und physiologische Änderungen geprägt und wird durch ein komplexes Netzwerk kontrolliert (Nystrom 2004). Unter anderem wechselt die Zelle ihren Sigmafaktor, um den veränderten Bedingungen auf molekularbiologischer Ebene begegnen zu können. So kontrolliert RpoS (oder  $\sigma^s$ ,  $\sigma^{38}$ ) in *E. coli* die Expression von über 50 Genen (Lange and Hengge-Aronis 1991). Diese Gene erfüllen verschiedene Funktionen in der Stressantwort und auch bei Kohlenstoff-Limitierten Bedingungen (Hengge-Aronis 2002). Das Molekül cAMP gilt als „Alarmon“ für einen Kohlenstoff-Hungerzustand (Lengeler et al. 1999). Durch das Fehlen einer geeigneten einfach zu spaltenden Kohlenstoff-Verbindung wird die Bildung von cAMP durch die Adenylatcyclase induziert. So könnte ein hoher cAMP-Gehalt für die Funktionalität von TeiR nötig ist. Eine niedrige cAMP-Konzentration innerhalb der Zelle würde dagegen zu einer Deaktivierung der TeiR-Funktion und zu einer Reprimierung des Testosteronabbaus führen. Daher ist die Zelle bei Anwesenheit einer leicht zu

verstoffwechselnden Kohlenstoffquelle nicht in der Lage, den Testosteronabbau zu induzieren, da kein C-Limitationssignal bzw. eine niedrige cytosolische cAMP-Konzentration vorliegt. Dies konnte auch beobachtet werden, wenn *C. testosteronei* mit Testosteron und Citrat als weitere Kohlenstoffquelle inkubiert wurde. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Citrat, zeigte sich hier ein verlangsamter Testosteronabbau. Daher scheint die intrazelluläre Konzentration von cAMP eine wichtige, wenn nicht die zentrale Rolle bei der Aktivierung von TeiR zu spielen. Das cAMP könnte direkt an TeiR, an ein TeiR-induzierendes Protein oder den hypothetischen TeiR-Response-Regulator binden und so die Regulationskaskade für eine Signaltransduktion aktivieren.

#### 4.8 *C. testosteronei* KF-1

*Comamonas testosteronei* KF-1 wurde aus Aktivschlamm isoliert (Schleheck et al. 2004) und dessen Genom 2006 veröffentlicht. Anhand von Sequenzvergleichen konnte davon ausgegangen werden, dass auch dieser Stamm Testosteron abzubauen vermag. Durch die Inkubation mit Testosteron und anschließender HPLC konnte ein Verschwinden von Testosteron in der Bakterienkultur gezeigt werden. Die Absenkung des Testosterongehaltes während der Inkubation in der Kultur von *C. testosteronei* KF-1 entsprach der des Typstammes *C. testosteronei* ATCC11996. Das Auftauchen der beiden Intermediate 4-Androsten-3,17-dion und 1,4-Androstadien-3,17-dion lassen auf den 9,10-Secosteroidweg schließen, der auch schon für *C. testosteronei* ATCC11996 und TA441 postuliert wird (Horinouchi et al. 2005). Alle im Steroidabbau beschriebenen Gene anderer *C. testosteronei* Stämme (ATCC11996 und TA441) konnten auch im Stamm KF-1 identifiziert werden (Horinouchi et al. 2005; Horinouchi et al. 2003a; Horinouchi et al. 2003b; Horinouchi et al. 2001; Pruneda-Paz et al. 2004a; b; Skowasch et al. 2002; Xiong et al. 2001). Die Gene für den Abbau von Testosteron sind in verschiedenen Clustern angeordnet. Diese Anordnung im Stamm KF-1 entsprach bereits beschriebenen Genclustern in *C. testosteronei* TAA441 (Horinouchi et al. 2005; Horinouchi et al. 2003a; Horinouchi et al. 2003b; Horinouchi et al. 2001; Xiong et al. 2003a). Es konnten zwei Cluster identifiziert werden (siehe Abbildung 32), welche zwischen den Stämmen KF-1 und TA441 nahezu identisch sind. Weiterhin ergab die Analyse der Genomregion des *hsdA* Homologen in KF-1 Unterschiede. Das Gen der 3 $\alpha$ -HSD/CR (*hsdA*) konnte assoziiert mit dem Gen der Ketosteroid-Isomerase (*ksi*) lokalisiert gefunden werden. Daher scheint das *hsdA*-Gen in *C. testosteronei* im Gegensatz zu den HsdA-Homologen in anderen Bakterien, wie verschiedenen Clostridien, einem relativ kleinen Gencluster anzugehören. Bei *Clostridium hylemonae* TN271 und *Clostridium hiranonis* TO931 sind die Gene der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase mit sechs weiteren Genen in einem Cholal induzierbaren Operon lokalisiert (Ridlon et al. 2010; Wells and Hylemon 2000). Bei *Clostridium scindens* VPI 12708 konnten neben einem im Operon lokalisierten 3 $\alpha$ -

Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Gen (*baiA2*) noch zwei weitere, nahezu identische Gene, *baiA1* und *baiA3*, identifiziert werden (Ridlon et al. 2006). Die *bai*-Gene der Clostridien sind für die Resistenz gegen und Nutzung der Gallensäuren nötig. Für *C. testosteroni* KF-1 konnte ein Abbau des Gallensalzes Taurocholat und für *C. testosteroni* TA441 der Cholsäureabbau nachgewiesen werden (Horinouchi et al. 2010; Rosch et al. 2008). Anscheinend sind die Gene für den Steroidabbau in *C. testosteroni* TA441 in einem 100kb umfassenden „hot spot“ lokalisiert (Horinouchi et al. 2010). Allerdings konnten auch Unterschiede zwischen den Stämmen ATCC11996 und TA441 in der Genstruktur beschrieben werden (Horinouchi et al. 2010). So konnte *stdC* aus *C. testosteroni* ATCC11996, dem noch keine Funktion experimentell zugeordnet werden konnte (Cabrera et al. 1997), nicht in *C. testosteroni* TA441 identifiziert werden (Horinouchi et al. 2010). *C. testosteroni* KF-1 weist dagegen mit dem Leserahmen orfPD3105 ein *stdC* Homolog in gleicher genomischer Struktur wie in Stamm ATCC11996 auf. Der Vergleich der Genomregion von *hsdA* ergab Aberrationen zwischen KF-1 und dem Typstamm ATCC11996. So konnten keine vollständigen Leserahmen für die Repressoren der *hsdA*-mRNA RepA und RepB identifiziert werden (Xiong et al. 2003b). Eine Analyse der *hsdA*-Induktion ergab einen immensen Unterschied zwischen dem Typstamm ATCC11996 und KF-1. Obwohl der Sequenzvergleich von *hsdA*/HsdA eine Identität von 87% auf Gen und 89% auf Proteinebene ergab, konnte nach Testosterongabe keine erhöhte Menge cytosolischer HsdA detektiert werden. Auch nach Inkubation mit den Intermediaten 4-Androsten-3,17-dion und 1,4-Androstadien-3,17-dion konnte bei *C. testosteroni* KF-1 kein erhöhter Gehalt an HsdA nachgewiesen werden. Als Grund kann hier nur ein anderer Regulationsmechanismus betrachtet werden, der unter anderem auf Mutationen in den Leserahmen der Repressoren RepA und RepB zurückgeht. Vor allem die Region des *repB*-Leserahmens scheint bei den Stämmen ATCC11996, TA441 und KF-1 variabel zu sein (Horinouchi et al. 2010). Allerdings scheint das TeiR Protein hier eine ähnliche, wenn nicht sogar selbe Funktion in der Regulation des Steroidstoffwechsels zu spielen, da *teiR*-defiziente Mutante von KF-1 nicht mehr zur Absenkung des Testosterongehaltes in Flüssigkultur fähig war. Daher ist die Regulation von *hsdA* in *C. testosteroni* KF-1 von der Regulation durch Testosteron wahrscheinlich losgelöst. Da Testosteron nicht zu den Substraten von HsdA gehört, ist jedoch der Abbau dieser Substanz durch die zu ATCC11996 veränderte Regulation von HsdA nicht betroffen.

## 5 Resümee

Bislang konnte kein umfassender Regulationsmechanismus der Steroidregulation in Bakterien und somit auch nicht im Modellorganismus *Comamonas testosteroni* publiziert werden. Allerdings wurden schon einzelne Experimente zur Regulation der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase, HsdA durchgeführt und deren Ergebnisse publiziert (Xiong et al. 2001; Xiong et al. 2003b). Das *hsdA*-Gen wird durch zwei Repressoren kontrolliert, die auf Transkriptions- und Translationsebene wirken. Bei Anwesenheit von Steroiden, vornehmlich Testosteron oder 4-Androsten-3,17-dion, werden die Repressoren inaktiviert und Transkription und Translation können stattfinden. Mit TeiR wurde ein weiterer Regulator publiziert (Pruneda-Paz et al. 2004b). Dieser Regulator wirkt neben seinem Einfluss auf die *hsdA*-Expression auch kontrollierend auf mindestens zwei weitere Gene im Steroidmetabolismus (Pruneda-Paz et al. 2004b). TeiR<sup>-</sup> Mutanten von *C. testosteroni* ATCC11996 waren zudem nicht mehr in der Lage Testosteron als Kohlenstoffquelle zu verwenden. Ein *teiR*-Homolog konnte auch in einem anderen *C. testosteroni* Stamm, TA441, identifiziert werden (Horinouchi et al. 2004). Das TeiR-Protein stellt einen wichtigen Faktor im Steroidmetabolismus dar und ist als Regulator unabdingbar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TeiR sowohl in *E. coli* als auch in *C. testosteroni* membranständig ist. In *C. testosteroni*-Zellen wies TeiR eine polare Lokalisation auf, wie sie bereits für Chemotaxisproteine beschrieben wurde (Bardy and Maddock 2005; Sourjik and Berg 2000). Der N-Terminus ist für die Lokalisierung des Proteins an der Membran notwendig. Auch im zentralen Proteinteil scheint es einen Faktor zu geben, der in *C. testosteroni* eine polare Position bedingt. Hier wurde bereits eine PAS-Domäne nachgewiesen (Pruneda-Paz et al. 2004b). Diese PAS-Domäne überlappt eine hydrophobe Region von 20 Aminosäureresten, die für die Testosteronbindung verantwortlich ist. Der PAS-Domäne schließt sich ein Sequenzbereich an, der bioinformatisch keine Besonderheiten zeigte. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass dieser Bereich für die Funktionalität essentiell ist. Am C-Terminus wurde ein Helix-Turn-Helix-Motiv identifiziert (Pruneda-Paz et al. 2004b). Diese Struktur ist für die Aktivität von TeiR notwendig. Die beiden Helices enthalten ein Histidin an Position 360, die wahrscheinlich GTP-abhängig phosphoryliert werden. Die Phosphorylgruppenübertragung ist darüber hinaus abhängig von einem oder mehreren cytosolischen Faktoren. Im Cytoplasma spielt die Konzentration von cAMP als „Hungersignal“ wahrscheinlich einen regulatorischen Einfluss auf die TeiR-Aktivität. In *E. coli* ist die Aktivität von TeiR nicht von der Anwesenheit von Testosteron abhängig und TeiR nur in der stationären Wachstumsphase aktiv. Das legt die Schlussfolgerung nahe, dass TeiR in *C. testosteroni* zuerst von Testosteron an oder in der

Membran aktiviert wird. Um phosphoryliert zu werden muss TeiR mit einem weiteren Faktor, möglicherweise cAMP, interagieren. Durch diese Perzeptions- und Interaktionsprozesse von TeiR kann die Steroid-abhängige Signalkaskade starten.

TeiR selbst ist in der Lage mehrere Prozesse in der Signalkaskade zu beeinflussen. So waren *teiR*-defiziente Mutanten von *C. testosteronei* nicht mehr zu einer Testosteron-abhängigen Chemotaxis fähig (Gohler et al. 2008). Weiterhin ist die Expression verschiedener Steroid-abhängiger Operone von der TeiR-Aktivität abhängig. Hierzu zählen die in dieser Arbeit nachgewiesenen Operone *hsdA-ksi* und *tesB-orf1* als auch das *tesH*-Gen, welches in einem putativen Operon, zusammen mit *orf17* und *orf18*, vorliegt. Auch das Operon *sip48-βhsd* wird von TeiR reguliert (Pruneda-Paz et al. 2004b). Die Expression eines Regulators von *hsdA*, *actA*, wird durch die gemeinsame Anwesenheit von Testosteron und TeiR induziert. Ein putativer Regulator, *lysR*, dessen Gen sich stromabwärts des *hsdA-ksi* Operons befindet, zeigte kein eindeutiges Abhängigkeitsverhältnis. Vermutlich fungiert TeiR in diesem Fall eher als ein Modulator. Neben den benannten Regulatoren wurden in der Genomsequenz von *C. testosteronei* KF-1 zwei putative Regulatoren identifiziert. Die Untersuchung der Gene dieser beiden Leserahmen ergab einen Einfluss auf das benutzte Reportersystem, sowohl in *E. coli* als auch in *C. testosteronei*. Daher scheinen auch diese beiden Faktoren in der Regulation des Steroidmetabolismus involviert zu sein. Im Genom von *C. testosteronei* KF-1 wurden die für den Testosteronabbau nötigen Gene identifiziert und ein Absinken des Testosterongehalts in Flüssigkultur gezeigt. Dies lässt auf den Abbau von Testosteron über den 9,10-Secosteroidweg schließen. Es zeigte sich allerdings, dass die Regulation von *hsdA* in diesem Stamm von der des Typstammes ATCC11996 abweicht.

Mit TeiR konnte der Master-Regulator des Steroidstoffwechsels in *C. testosteronei* näher charakterisiert werden. Es konnten sowohl Mechanismus als auch Effekte von TeiR auf unterschiedlichen Regulationsebenen aufgedeckt werden. Somit trägt diese Arbeit maßgeblich zum Verständnis der Regulation des Steroidstoffwechsels in Bakterien bei.

## 6 Referenzen

- Aiello A, Fattorusso E and Menna M 1999 Steroids from sponges: recent reports. *Steroids* 64, 687-714.
- Altschul S F, Wootton J C, Gertz E M, Agarwala R, Morgulis A, Schaffer A A and Yu Y K 2005 Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *Febs J* 272, 5101-5109.
- Amin D N, Taylor B L and Johnson M S 2006 Topology and boundaries of the aerotaxis receptor Aer in the membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 894-901.
- Arda B, Aydemir S, Yamazhan T, Hassan A, Tunger A and Serter D 2003 *Comamonas testosteroni* meningitis in a patient with recurrent cholesteatoma. *Apmis* 111, 474-476.
- Arima K, Nagasawa M, Bae M and Tamura G 1969 Microbial Transformation of Sterols .I. Decomposition of Cholesterol by Microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry* 33, 1636-&.
- Atkinson S, Atkinson M J and Tarrant A M 2003 Estrogens from sewage in coastal marine environments. *Environ Health Perspect* 111, 531-535.
- Attwood P V, Piggott M J, Zu X L and Besant P G 2007 Focus on phosphohistidine. *Amino Acids* 32, 145-156.
- Bardy S L and Maddock J R 2005 Polar localization of a soluble methyl-accepting protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187, 7840-7844.
- Beato M, Chalepakis G, Schauer M and Slater E P 1989 DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem* 32, 737-747.
- Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G and Brunak S 2004 Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340, 783-795.
- Bentovim T, Eylan E, Romano A and Stein R 1974 Gram-Negative Bacteria Isolated from External Eye Infections. *Infection* 2, 162-165.
- Besant P G and Attwood P V 2009 Detection and analysis of protein histidine phosphorylation. *Mol Cell Biochem*.
- Bibikov S I, Biran R, Rudd K E and Parkinson J S 1997 A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 4075-4079.
- Boon N, Goris J, De Vos P, Verstraete W and Top E M 2000 Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Appl Environ Microbiol* 66, 2906-2913.
- Braga O, Smythe G A, Schafer A I and Feitz A J 2005 Steroid estrogens in ocean sediments. *Chemosphere* 61, 827-833.
- Capon R J and Faulkner D J 1985 Herbasterol, an Ichthyotoxic 9,11-Secosterol from the Sponge *Dysidea-Herbacea*. *Journal of Organic Chemistry* 50, 4771-4773.
- Chang Y H, Han J I, Chun J S, Lee K C, Rhee M S, Kim Y B and Bae K S 2002 *Comamonas koreensis* sp nov., a non-motile species from wetland in Woopo, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 377-381.
- Chou J H, Sheu S Y, Lin K Y, Chen W M, Arun A B and Young C C 2007 *Comamonas odontotermitis* sp nov, isolated from the gut of the termite *Odontotermes formosanus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 887-891.
- Coote J G and Hassall H 1973 Degradation of L-Histidine, Imidazolyl-L-Lactate and Imidazolylpropionate by *Pseudomonas-Testosteroni*. *Biochemical Journal* 132, 409-&.
- Coulter A W and Talalay P 1968 Studies on Microbiological Degradation of Steroid Ring A. *Journal of Biological Chemistry* 243, 3238-&.
- Crosson S and Moffat K 2001 Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2995-3000.

- Culos D and Watanabe M 1982 Testosterone-Dependent Oxygen-Consumption in Membrane-Vesicles of *Pseudomonas-Testosteroni*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 17, 67-69.
- Dagley S and Patel M D 1957 Oxidation of P-Cresol and Related Compounds by a *Pseudomonas*. *Biochemical Journal* 66, 227-233.
- David K, Dingemans E, Freud J and Laqueur E 1935 Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 233, 281-283.
- Davis G H G and Park R W A 1962 Taxonomic Study of Certain Bacteria Currently Classified as *Vibrio* Species. *Journal of General Microbiology* 27, 101-&.
- de las Heras L F, Fernandez E G, Llorens J M N, Perera J and Drzyzga O 2009 Morphological, Physiological, and Molecular Characterization of a Newly Isolated Steroid-Degrading Actinomycete, Identified as *Rhodococcus ruber* Strain Chol-4. *Current Microbiology* 59, 548-553.
- Desbrow C, Routledge E J, Brighty G C, Sumpter J P and Waldock M 1998 Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology* 32, 1549-1558.
- Devos P, Kersters K, Falsen E, Pot B, Gillis M, Segers P and Deley J 1985 *Comamonas* Davis and Park 1962 Gen-Nov, Nom Rev Emend, and *Comamonas-Terrigena* Hugh 1962 Sp-Nov, Nom Rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35, 443-453.
- Drzyzga O, Llorens J M N, de las Heras L F, Fernandez E G and Perera J 2009 *Gordonia cholesterivorans* sp nov., a cholesterol-degrading actinomycete isolated from sewage sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1011-1015.
- Etchebehere C, Errazquin M I, Dabert P, Moletta R and Muxi L 2001 *Comamonas nitrivorans* sp nov., a novel denitrifier isolated from a denitrifying reactor treating landfill leachate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 977-983.
- Facey S J and Kuhn A 2004 Membrane integration of *E. coli* model membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1694, 55-66.
- Fahrbach M 2006 Anaerobic degradation of steroid hormones by novel denitrifying bacteria. *In* Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, Aachen.
- Fahrbach M, Kuever J, Meinke R, Kampfer P and Hollender J 2006 *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1547-1552.
- Fahrbach M, Kuever J, Remesch M, Huber B E, Kampfer P, Dott W and Hollender J 2008 *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2215-2223.
- Fox J E 2004 Chemical communication threatened by endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives* 112, 648-653.
- Francis M and Watanabe M 1981 Membrane-Associated Steroid-Binding Proteins of *Pseudomonas-Testosteroni*. *Canadian Journal of Microbiology* 27, 1290-1297.
- Francis M M, Kowalsky N and Watanabe M 1985 Extraction of a Steroid-Transport System from *Pseudomonas-Testosteroni* Membranes and Incorporation into Synthetic Liposomes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 23, 523-528.
- Fraser M E, James M N, Bridger W A and Wolodko W T 2000 Phosphorylated and dephosphorylated structures of pig heart, GTP-specific succinyl-CoA synthetase. *J Mol Biol* 299, 1325-1339.
- Fricke N 2009 Der Nachweis endokriner wirksamer Substanzen in der Ostsee anhand der Messung der Vitellogenin-Konzentration im Blutplasma männlicher Dorsche (*Gadus morhua*). *In* Institute of Toxicology and Pharmacology for Natural Scientists Christian-Albrechts University Kiel, Kiel.

- Fujii K, Satomi M, Morita N, Motomura T, Tanaka T and Kikuchi S 2003 *Novosphingobium tardaugens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 47-52.
- Garciavaldes E, Cozar E, Rotger R, Lalucat J and Ursing J 1988 New Naphthalene-Degrading Marine *Pseudomonas* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2478-2485.
- Gentiraimondi S, Tolmasky M E, Patrino L C, Flury A and Actis L A 1991 Molecular-Cloning and Expression of the Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Gene from *Pseudomonas-Testosteroni*. *Gene* 105, 43-49.
- Gibson D T, Wang K C, Sih C J and Whitlock H 1966 Mechanisms of Steroid Oxidation by Microorganisms .9.on Mechanism of Ring a Cleavage in Degradation of 9,10-Seco Steroids by Microorganisms. *Journal of Biological Chemistry* 241, 551-&.
- Gilardi G L 1971 Characterization of Nonfermentative Nonfastidious Gram Negative Bacteria Encountered in Medical Bacteriology. *Journal of Applied Bacteriology* 34, 623-&.
- Gohler A, Xiong G M, Paulsen S, Trentmann G and Maser E 2008 Testosterone-inducible regulator is a kinase that drives steroid sensing and metabolism in *Comamonas testosteroni*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 17380-17390.
- Gong W, Hao B and Chan M K 2000 New mechanistic insights from structural studies of the oxygen-sensing domain of *Bradyrhizobium japonicum* FixL. *Biochemistry* 39, 3955-3962.
- Goyal A K and Zylstra G J 1996 Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 230-236.
- Gu Y Z, Hogenesch J B and Bradfield C A 2000 The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 519-561.
- Gul M, Ciragil P, Bulbuloglu E, Aral M, Alkis S and Ezberci F 2007 *Comamonas testosteroni* bacteremia in a patient with perforated acute appendicitis. Short communication. *Acta Microbiol Immunol Hung* 54, 317-321.
- Gumaelius L, Magnusson G, Pettersson B and Dalhammar G 2001 *Comamonas denitrificans* sp nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 999-1006.
- Hanselman T A, Graetz D A and Wilkie A C 2003 Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: A review. *Environmental Science & Technology* 37, 5471-5478.
- Harries J E, Sheahan D A, Jobling S, Matthiessen P, Neall M, Sumpter J P, Taylor T and Zaman N 1997 Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 534-542.
- Hefti M H, Francoijs K J, de Vries S C, Dixon R and Vervoort J 2004 The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur J Biochem* 271, 1198-1208.
- Heftmann E 1975 Functions of Steroids in Plants. *Phytochemistry* 14, 891-901.
- Hengge-Aronis R 2002 Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 373-395, table of contents.
- Hoffmann F and Maser E 2007 Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the shortchain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metabolism Reviews* 39, 87-144.
- Hollender J, Hopp J and Dott W 1997 Degradation of 4-chlorophenol via the meta cleavage pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4567-4572.
- Holthaus K I E, Johnson A C, Jurgens M D, Williams R J, Smith J J L and Carter J E 2002 The potential for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2526-2535.



- Horinouchi M, Hayashi T, Koshino H, Kurita T and Kudo T 2005 Identification of 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostanoic acid, 4-hydroxy-2-oxohexanoic acid, and 2-hydroxyhexa-2,4-dienoic acid and related enzymes involved in testosterone degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *Appl Environ Microbiol* 71, 5275-5281.
- Horinouchi M, Hayashi T, Koshino H, Malon M, Yamamoto T and Kudo T 2008 Identification of genes involved in inversion of stereochemistry of a C-12 hydroxyl group in the catabolism of cholic acid by *Comamonas testosteroni* TA441. *J Bacteriol* 190, 5545-5554.
- Horinouchi M, Hayashi T, Koshino H, Yamamoto T and Kudo T 2003a Gene encoding the hydrolase for the product of the meta-cleavage reaction in testosterone degradation by *Comamonas testosteroni*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2139-2152.
- Horinouchi M, Hayashi T, Yamamoto T and Kudo T 2003b A new bacterial steroid degradation gene cluster in *Comamonas testosteroni* TA441 which consists of aromatic-compound degradation genes for seco-steroids and 3-ketosteroid dehydrogenase genes. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4421-4430.
- Horinouchi M, Kurita T, Hayashi T and Kudo T 2010 Steroid degradation genes in *Comamonas testosteroni* TA441: Isolation of genes encoding a  $\Delta^4(5)$ -isomerase and 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -dehydrogenases and evidence for a 100kb steroid degradation gene hot spot. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Horinouchi M, Kurita T, Yamamoto T, Hatori E, Hayashi T and Kudo T 2004 Steroid degradation gene cluster of *Comamonas testosteroni* consisting of 18 putative genes from meta-cleavage enzyme gene *tesB* to regulator gene *tesR*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324, 597-604.
- Horinouchi M, Yamamoto T, Taguchi K, Arai H and Kudo T 2001 Meta-cleavage enzyme gene *tesB* is necessary for testosterone degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiology-Sgm* 147, 3367-3375.
- Horowitz H, Gilroy S, Feinstein S and Gilardi G 1990 Endocarditis associated with *Comamonas acidovorans*. *J Clin Microbiol* 28, 143-145.
- Howell W M and Denton T E 1989 Gonopodial Morphogenesis in Female Mosquitofish, *Gambusia-Affinis-Affinis*, Masculinized by Exposure to Degradation Products from Plant Sterols. *Environmental Biology of Fishes* 24, 43-51.
- Hugh R 1962 *Comamonas-Terrigena* Comb-Nov with Proposal of a Neotype and Request for an Opinion. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 12, 33-35.
- Hultquist D E 1968 The preparation and characterization of phosphorylated derivatives of histidine. *Biochim Biophys Acta* 153, 329-340.
- Hylemon P B and Harder J 1998 Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 22, 475-488.
- Isobe K O, Tarao M, Zakaria M P, Chiem N H, Minh L Y and Takada H 2002 Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography-mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. *Environmental Science & Technology* 36, 4497-4507.
- Ivanchina N V, Kicha A A, Kalinovsky A I, Dmitrenok P S, Prokofreva N G and Stonik V A 2001 New steroid glycosides from the starfish *Asterias rathbuni*. *J Nat Prod* 64, 945-947.
- Jacobsen A M, Lorenzen A, Chapman R and Topp E 2005 Persistence of testosterone and 17 beta-estradiol in soils receiving swine manure or municipal biosolids. *Journal of Environmental Quality* 34, 861-871.
- Jenkins R L, Wilson E M, Angus R A, Howell W M, Kirk M, Moore R, Nance M and Brown A 2004 Production of androgens by microbial transformation of progesterone in vitro: A model for androgen production in rivers receiving paper mill effluent. *Environmental Health Perspectives* 112, 1508-1511.
- Jez J M, Bennett M J, Schlegel B P, Lewis M and Penning T M 1997 Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J* 326 ( Pt 3), 625-636.

- Jobling S, Nolan M, Tyler C R, Brighty G and Sumpter J P 1998 Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology* 32, 2498-2506.
- Joshi B and Walia S 1995 Characterization by Arbitrary Primer Polymerase Chain-Reaction of Polychlorinated Biphenyl (Pcb)-Degrading Strains of *Comamonas-Testosteroni* Isolated from Pcb-Contaminated Soil. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 612-619.
- Junker F and Cook A M 1997 Conjugative plasmids and the degradation of arylsulfonates in *Comamonas testosteroni*. *Appl Environ Microbiol* 63, 2403-2410.
- Jurgens M D, Holthaus K I E, Johnson A C, Smith J J L, Hetheridge M and Williams R J 2002 The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 480-488.
- Kanazawa S and Mori K 1996 Isolation of cadmium-resistant bacteria and their resistance mechanisms .1. Isolation of Cd-resistant bacteria from soils contaminated with heavy metals. *Soil Science and Plant Nutrition* 42, 725-730.
- Karlson P 1983 Eighth Adolf Butenandt lecture. Why are so many hormones steroids? *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 364, 1067-1087.
- Kentner D and Sourjik V 2009 Dynamic map of protein interactions in the *Escherichia coli* chemotaxis pathway. *Mol Syst Biol* 5, 238.
- Khorchid A and Ikura M 2006 Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 307-312.
- Kieslich K 1985 Microbial side-chain degradation of sterols. *J Basic Microbiol* 25, 461-474.
- Kim K H, Ten L N, Liu Q M, Im W T and Lee S T 2008 *Comamonas granuli* sp nov., isolated from granules used in a wastewater treatment plant. *Journal of Microbiology* 46, 390-395.
- Kim K P, Rhee I K and Park H D 2003 Degradation of cholesterol by *Bacillus subtilis* SFF34 in flatfish during fermentation. *Journal of Microbiology* 41, 284-288.
- Kirchman D L 2002 The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 39, 91-100.
- Klumpp S and Krieglstein J 2002 Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem* 269, 1067-1071.
- Koivula T T and Hantula J 1997 Diversity within bacterial isolates hybridizing with *Comamonas* probe ppT. *Journal of Basic Microbiology* 37, 129-137.
- Lange R and Hengge-Aronis R 1991 Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5, 49-59.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J and Higgins D G 2007 Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lascu I, Pop R D, Porumb H, Presecan E and Proinov I 1983 Pig heart nucleosidediphosphate kinase. Phosphorylation and interaction with Cibacron blue 3GA. *Eur J Biochem* 135, 497-503.
- Lee L S, Strock T J, Sarmah A K and Rao P S C 2003 Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment. *Environmental Science & Technology* 37, 4098-4105.
- Lefebvre Y, Po L and Watanabe M 1976a Effect of Sulfhydryl and Disulfide Agents on 3beta and 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase and on Steroid Uptake of *Pseudomonas-Testosteroni*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 7, 535-538.
- Lefebvre Y, Po L and Watanabe M 1976b The involvement of the electron transport chain in uptake of testosterone by membrane vesicles of *Pseudomonas testosteroni*. *J Steroid Biochem* 7, 867-868.
- Lefebvre Y A, Lefebvre D D, Schultz R, Groman E V and Watanabe M 1979 Effects of Specific Inhibitors and an Antiserum of 3-Beta and 17-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase on Steroid Uptake in *Pseudomonas-Testosteroni*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 10, 519-522.
- Lengeler J, Drews G and Schlegel H 1999 *Biology of the Prokaryotes*. Thieme.
- Lestrovaia N N 1981 [3-oxosteroid-delta 1-dehydrogenase localization in *Mycobacterium rubrum* and *Arthobacter globiformis* cells]. *Mikrobiologija* 50, 619-625.

- Letunic I and Bork P 2007 Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23, 127-128.
- Levy H R and Talalay P 1959 Bacterial oxidation of steroids. II. Studies on the enzymatic mechanism of ring A dehydrogenation. *J Biol Chem* 234, 2014-2021.
- Li J M, Nagpal P, Vitart V, McMorris T C and Chory J 1996 A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis. *Science* 272, 398-401.
- Linares M, Pruneda-Paz J L, Reyna L and Genti-Raimondi S 2008 Regulation of testosterone degradation in *Comamonas testosteroni*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 112, 145-150.
- Lopp A, Pihlak A, Paves H, Samuel K, Koljak R and Samel N 1994 The Effect of 9,11-Secosterol, a Newly Discovered Compound from the Soft Coral *Gersemia-Fruticosa*, on the Growth and Cell-Cycle Progression of Various Tumor-Cells in Culture. *Steroids* 59, 274-281.
- Ma Y F, Zhang Y, Zhang J Y, Chen D W, Zhu Y, Zheng H, Wang S Y, Jiang C Y, Zhao G P and Liu S J 2009 The complete genome of *Comamonas testosteroni* reveals its genetic adaptations to changing environments. *Appl Environ Microbiol* 75, 6812-6819.
- Marcus P I and Talalay P 1956 Induction and purification of alpha- and beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *J Biol Chem* 218, 661-674.
- Maser E, Mobus E and Xiong G M 2000 Functional expression, purification, and characterization of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272, 622-628.
- Maser E, Xiong G M, Grimm C, Ficner R and Reuter K 2001 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: biological significance, three-dimensional structure and gene regulation. *Chemico-Biological Interactions* 130, 707-722.
- Mathieu J, Schloendorn J, Rittmann B E and Alvarez P J J 2008 Microbial degradation of 7-ketocholesterol. *Biodegradation* 19, 807-813.
- Minale L, Iorizzi M, Palagiano E and Riccio R 1996 Steroid and triterpenoid oligoglycosides of marine origin. *Adv Exp Med Biol* 404, 335-356.
- Mobus E and Maser E 1998 Molecular cloning overexpression, and characterization of steroid-inducible 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni* - A novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 273, 30888-30896.
- Narayan K D, Pandey S K and Das S K 2009 Characterization of *Comamonas thiooxidans* sp. nov., and Comparison of Thiosulfate Oxidation with *Comamonas testosteroni* and *Comamonas composti*. *Curr Microbiol*.
- Natale P, Bruser T and Driessen A J 2008 Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1735-1756.
- Nystrom T 2004 Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol* 58, 161-181.
- Oppermann U C T, Belai I and Maser E 1996 Antibiotic resistance and enhanced insecticide catabolism as consequences of steroid induction in the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 58, 217-223.
- Oppermann U C T and Maser E 1996 Characterization of a 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *European Journal of Biochemistry* 241, 744-749.
- Panter G H, Thompson R S and Sumpter J P 1998 Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicology* 42, 243-253.
- Parkinson J S 1993 Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* 73, 857-871.

- Patil A D, Freyer A J, Breen A, Carte B and Johnson R K 1996 Halistanol disulfate B, a novel sulfated sterol from the sponge *Pachastrella* sp: Inhibitor of endothelin converting enzyme. *Journal of Natural Products* 59, 606-608.
- Plesiat P, Grandguillot M, Harayama S, Vragar S and Michelbriand Y 1991 Cloning, Sequencing, and Expression of the *Pseudomonas-Testosteroni* Gene Encoding 3-Oxosteroid Delta-1-Dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* 173, 7219-7227.
- Pruneda-Paz J L, Linares M, Cabrera J E and Genti-Raimondi S 2004a Identification of a novel steroid inducible gene associated with the beta hsd locus of *Comamonas testosteroni*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 88, 91-100.
- Pruneda-Paz J L, Linares M, Cabrera J E and Genti-Raimondi S 2004b TeiR, a LuxR-type transcription factor required for testosterone degradation in *Comamonas testosteroni*. *J Bacteriol* 186, 1430-1437.
- Puttick J, Baker E N and Delbaere L T J 2008 Histidine phosphorylation in biological systems. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1784, 100-105.
- Raman D R, Williams E L, Layton A C, Burns R T, Easter J P, Daugherty A S, Mullen M D and Saylor G S 2004 Estrogen content of dairy and swine wastes. *Environmental Science & Technology* 38, 3567-3573.
- Readman J W, Fillmann G, Tolosa I, Bartocci J and Mee L D 2005 The use of steroid markers to assess sewage contamination of the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin* 50, 310-318.
- Reddy A K, Murthy S I, Jalali S and Gopinathan U 2009 Post-operative endophthalmitis due to an unusual pathogen, *Comamonas testosteroni*. *J Med Microbiol* 58, 374-375.
- Reinelt S, Hofmann E, Gerharz T, Bott M and Madden D R 2003 The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. *J Biol Chem* 278, 39189-39196.
- Ren H Y, Ji S L, Cui C W and Wang D 2006 [Degradation pathway of 17alpha-ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5]. *Huan Jing Ke Xue* 27, 1835-1840.
- Ridlon J M, Kang D J and Hylemon P B 2006 Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 47, 241-259.
- Ridlon J M, Kang D J and Hylemon P B 2010 Isolation and characterization of a bile acid inducible 7alpha-dehydroxylating operon in *Clostridium hylemonae* TN271. *Anaerobe* 16, 137-146.
- Rosch V, Denger K, Schleheck D, Smits T H and Cook A M 2008 Different bacterial strategies to degrade taurocholate. *Arch Microbiol* 190, 11-18.
- Routledge E J, Sheahan D, Desbrow C, Brighty G C, Waldock M and Sumpter J P 1998 Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science & Technology* 32, 1559-1565.
- Rowland S S, Falkler W A and Bashirelahi N 1992 Identification of an Estrogen-Binding Protein in *Pseudomonas-Aeruginosa*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 42, 721-727.
- Russell D W 1996 Green light for steroid hormones. *Science* 272, 370-371.
- Sallam L, Osman M, Hamdy A and Zaghlol G 2008 Microbial transformation of phytosterols mixture from rice bran oil unsaponifiable matter by selected bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1643-1656.
- Sambrook J and Russel D W 2001 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sarand I, Osterberg S, Holmqvist S, Holmfeldt P, Skarfstad E, Parales R E and Shingler V 2008 Metabolism-dependent taxis towards (methyl)phenols is coupled through the most abundant of three polar localized Aer-like proteins of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 10, 1320-1334.
- Scaramozzino F, White A, Perego M and Hoch J A 2009 A Unique GTP-Dependent Sporulation Sensor Histidine Kinase in *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 191, 687-692.
- Schleheck D, Knepper T P, Fischer K and Cook A M 2004 Mineralization of individual congeners of linear alkylbenzenesulfonate by defined pairs of heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70, 4053-4063.

- Schoenmakers H J N and Dieleman S J 1981 Progesterone and Estrone Levels in the Ovaries, Pyloric Ceca, and Perivisceral Fluid During the Annual Reproductive-Cycle of Starfish, *Asterias-Rubens*. *General and Comparative Endocrinology* 43, 63-70.
- Schubert K, Horhold C, Bohme K, Groh H, Ritter F and Schumann W 1970 Mechanismen des Steroidabbaues. *Steroidologia* 1, 201-217.
- Shapiro L, McAdams H H and Losick R 2009 Why and how bacteria localize proteins. *Science* 326, 1225-1228.
- Shi J, Fujisawa S, Nakai S and Hosomi M 2004 Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research* 38, 2323-2330.
- Sica D and Musumeci D 2004 Secosteroids of marine origin. *Steroids* 69, 743-756.
- Sih C J and Bennett R E 1962 Steroid I-dehydrogenase of *Nocardia restrictus*. *Biochim Biophys Acta* 56, 584-592.
- Skowasch D, Mobus E and Maser E 2002 Identification of a novel *Comamonas testosteroni* gene encoding a steroid-inducible extradiol dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294, 560-566.
- Smith L 1984 *Steroids*. Verlag Chemie, Weinheim. 211-236 p.
- Sourjik V and Berg H C 2000 Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Mol Microbiol* 37, 740-751.
- Stackebrandt E, Murray R G E and Truper H G 1988 *Proteobacteria-Classis Nov*, a Name for the Phylogenetic Taxon That Includes the Purple Bacteria and Their Relatives. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 321-325.
- Stanier R Y, Palleron.Nj and Doudorof.M 1966 Aerobic Pseudomonads - a Taxonomic Study. *Journal of General Microbiology* 43, 159-&.
- Stock J B, Stock A M and Mottonen J M 1990 Signal transduction in bacteria. *Nature* 344, 395-400.
- Sumpter J P 1995 Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* 82-3, 737-742.
- Sumpter J P and Johnson A C 2005 Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology* 39, 4321-4332.
- Surette M G, Levit M, Liu Y, Lukat G, Ninfa E G, Ninfa A and Stock J B 1996 Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* 271, 939-945.
- Tago Y and Yokota A 2004 *Comamonas badia* sp nov., a floc-forming bacterium isolated from activated sludge. *Journal of General and Applied Microbiology* 50, 243-248.
- Tak J 1942 On bacteria decomposing cholesterol. *Antonie van Leeuwenhoek* 8, 32-40.
- Talalay P, Dobson M M and Tapley D F 1952 Oxidative Degradation of Testosterone by Adaptive Enzymes. *Nature* 170, 620-621.
- Talalay P and Wang V S 1955 Enzymic isomerization of delta5-3-ketosteroids. *Biochim Biophys Acta* 18, 300-301.
- Taylor B L and Zhulin I B 1999 PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 479-506.
- Taylor B L, Zhulin I B and Johnson M S 1999 Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 53, 103-128.
- Ternes T A, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken R D and Servos M 1999 Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil (vol 225, pg 81, 1999). *Science of the Total Environment* 228, 87-87.
- Thieme D, Neubauer P, Nies D H and Grass G 2008 Sandwich hybridization assay for sensitive detection of dynamic changes in mRNA transcript levels in crude *Escherichia coli* cell extracts in response to copper ions. *Appl Environ Microbiol* 74, 7463-7470.
- Thomas J E, Carroll R, Sy L P and Watanabe M 1989 Isolation and Characterization of a 50-Kda Testosterone-Binding Protein from *Pseudomonas-Testosteroni*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 32, 27-34.

- Thomas K V, Hurst M R, Matthiessen P, McHugh M, Smith A and Waldock M J 2002 An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1456-1461.
- Tschesche R and Wulff G 1965 [On the antimicrobial action of saponins]. *Z Naturforsch B* 20, 543-546.
- Vaknin A and Berg H C 2008 Direct evidence for coupling between bacterial chemoreceptors. *J Mol Biol* 382, 573-577.
- Vaknin A and Berg H C 2006 Osmotic stress mechanically perturbs chemoreceptors in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 592-596.
- Vaknin A and Berg H C 2007 Physical responses of bacterial chemoreceptors. *J Mol Biol* 366, 1416-1423.
- Wacker A, Drews J, Pratt W B, Laurent H and Petzoldt K 1965 Enzyminduktion Mit Steroiden Bei *Pseudomonas Testosteroni*. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete B* 20, 547-&.
- Wagner B, Atrat P G, Clarkcurtiss J E and Wagner M 1992 Localization of the Steroid 1-Dehydrogenase in *Rhodococcus-Erythropolis Imet-7030* by Immunoelectron Microscopy. *Journal of Basic Microbiology* 32, 65-71.
- Wainfan E, Henkin G, Rittenberg S C and Marx W 1954 Metabolism of cholesterol by intestinal bacteria in vitro. *J Biol Chem* 207, 843-849.
- Watanabe M, Lefebvre D, Lefebvre Y and Sy L P 1980 Membrane-bound dehydrogenases of *Pseudomonas testosteroni*. *J Steroid Biochem* 13, 821-827.
- Watanabe M and Po L 1976 Membrane-Bound 3-Beta and 17 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase and Its Role in Steroid Transport in Membrane-Vesicles of *Pseudomonas-Testosteroni*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 7, 171-175.
- Watanabe M, Sy L P, Hunt D and Lefebvre Y 1979 Binding of steroids by a partially purified periplasmic protein from *Pseudomonas testosteroni*. *J Steroid Biochem* 10, 207-213.
- Watanabe M and Watanabe H 1974 Periplasmic Steroid-Binding Proteins and Steroid Transforming Enzymes of *Pseudomonas-Testosteroni*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 5, 439-446.
- Wauters G, De Baere T, Willems A, Falsen E and Vaneechoutte M 2003 Description of *Comamonas aquatica* comb. nov and *Comamonas kerstersii* sp nov for two subgroups of *Comamonas terrigena* and emended description of *Comamonas terrigena*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 859-862.
- Wells J E and Hylemon P B 2000 Identification and characterization of a bile acid 7alpha-dehydroxylation operon in *Clostridium* sp. strain TO-931, a highly active 7alpha-dehydroxylating strain isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol* 66, 1107-1113.
- Wen A M, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S and Sly L I 1999 Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 567-576.
- Willems A, Pot B, Falsen E, Vandamme P, Gillis M, Kersters K and Deley J 1991 Polyphasic Taxonomic Study of the Emended Genus *Comamonas* - Relationship to *Aquaspirillum-Aquaticum*, Falsen,E. Group-10, and Other Clinical Isolates. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 427-444.
- Willems A and Vos P 2006 *Comamonas*. In *The Prokaryotes*. pp 723-736.
- Wovcha M G, Brooks K E and Kominek L A 1979 Evidence for two steroid 1,2-dehydrogenase activities in *Mycobacterium fortuitum*. *Biochim Biophys Acta* 574, 471-479.
- Xie K, Hessa T, Seppala S, Rapp M, von Heijne G and Dalbey R E 2007 Features of transmembrane segments that promote the lateral release from the translocase into the lipid phase. *Biochemistry* 46, 15153-15161.

- Xiong G, Martin H, Blum A, Schafers C and Maser E 2001 A model on the regulation of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase expression in *Comamonas testosteroni*. *Chem Biol Interact* 130-132, 723-736.
- Xiong G and Maser E 2001 Regulation of the steroid-inducible 3  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 363, 529.
- Xiong G M, Markowitz S and Maser E 2003a Regulation of 3  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*: function and relationship of two operators. *Chemico-Biological Interactions* 143, 411-423.
- Xiong G M, Martin H J and Maser E 2003b Characterization and recombinant expression of the translational repressor RepB of 3  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*. *Chemico-Biological Interactions* 143, 425-433.
- Xiong G M, Martin H J and Maser E 2003c Identification and characterization of a novel translational repressor of the steroid-inducible 3  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47400-47407.
- Ying G G and Kookana R S 2003 Degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment. *Environmental Science & Technology* 37, 1256-1260.
- Yoshimoto T, Nagai F, Fujimoto J, Watanabe K, Mizukoshi H, Makino T, Kimura K, Saino H, Sawada H and Omura H 2004 Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 70, 5283-5289.
- Young C C, Chou J H, Arun A B, Yen W S, Sheu S Y, Shen F T, Lai W A, Rekha P D and Chen W M 2008 *Comamonas composti* sp nov., isolated from food waste compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 251-256.
- Yu X Y, Li Y F, Zheng J W, Li Y, Li L, He J and Li S P 2010 *Comamonas zonglianii* sp. nov., isolated from phenol-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L and Miller W 2000 A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7, 203-214.
- Zhao J S and Ward O P 1999 Microbial degradation of nitrobenzene and mono-nitrophenol by bacteria enriched from municipal activated sludge. *Canadian Journal of Microbiology* 45, 427-432.

## 7 Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Arbeiten präsentiert:

Referierte Publikationen:

Göhler A, Xiong G, Paulsen S, Trentmann G, Maser E. Testosterone inducible regulator is a kinase which drives steroid sensing and metabolism in *Comamonas testosteroni*. J Biol Chem. 2008 Jun 20; 283(25):17380-90

Vorträge:

Göhler A, Xiong G, Grass G and Maser E; Steroid dependent gene regulation in *Comamonas testosteroni* and the TeiR protein. ASM Missouri Valley Branch Annual Meeting 2009 Lawrence Kansas, 27.-28.03.2009 (2. Preis Kategorie "general Microbiology")

Poster:

Göhler A, Xiong G, Grass G and Maser E; Steroid dependent gene regulation in *Comamonas testosteroni* and the TeiR protein. VAAM-Jahrestagung Hannover, 28.-31.3.2010

Göhler A, Xiong G, Grass G and Maser E; Steroid dependent gene regulation in *Comamonas testosteroni* and the TeiR protein. UNL-Redox Biology Center Annual Meeting 2009 Nebraska-City, 3.-5.04.2009 (3. Preis Kategorie bestes Poster)

Kisiela M, El-Hawari Y, Ebert B, Göhler A, Stegk J, Xiong G and Maser E; Hydroxysteroid-Dehydrogenases as Molecular Switch for Steroid Action in Marine Bacteria and in Human Medicine. Future Ocean Annual Retreat 2009

Göhler A, Xiong G, Maser E; Steroid signalling in bacteria: TeiR as the "master regulator" required for testosterone sensing and degradation in *Comamonas testosteroni*. VAAM-Jahrestagung Frankfurt, 9.-11.3.2008

Xiong G, Göhler A, Trentmann G, Paulsen S and Maser E; Characterization of the TeiR gene protein which regulates testosterone-induced expression of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*. ProkaGenomics 2007, 3<sup>rd</sup> Europeance on Prokaryotic Genomics Göttingen. 7. -10.10.2007

Maser E, Göhler A, Trentmann G, Paulsen S, Xiong G; Characterization of functional domains of the TeiR protein which regulates testosterone-induced expression of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*. VAAM-Jahrestagung Osnabrück, 1.-4.4.2007

Maser E, Trentmann G, Paulsen S, Göhler A and Xiong G; Characterization of functional domains of the TeiR protein which regulates testosterone-induced expression of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*. Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie 48. Frühjahrstagung Mainz. 13.-15.3. 2007.

Xiong G, Göhler A, Trentmann G, Thierbach K, Schulz B, Kuhns S, Maser E; Testosterone receptor teiR effect on testosterone-induced expression of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*; VAAM Tagung 2006, JenaVAAM-Jahrestagung Jena,19.-22.3.2006



## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Maser für die Bereitstellung des Labors und dieses interessante Thema bedanken. Mein Dank gilt weiterhin auch Herrn Dr. Xiong für die Laborleitung und die Hilfestellung.

Besonders gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Grass, der mir einen Austausch in die USA ermöglichte. Auch für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Gastfreundschaft bedanke ich mich herzlich.

Der FAZIT-Stiftung möchte ich für die Finanzierung danken, ohne die dieser Umfang der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Auch dem Exzellenzcluster Future Ocean danke ich für die Weiterbildungen und die Übernahme der Reisekosten.

Meinen Kollegen und Freunden, die mich während meiner Promotionszeit begleitet haben gebührt ebenfalls mein Dank. Christophe Espirito Santo danke ich für die Freundschaft, die Chauffeurdienste und das er mich in den Staaten „ertragen“ hat. Michael Kisiela danke ich für die Diskussionen, das „Dampf ablassen“ und Hilfe, die mir zuteil wurde. Herrn Dr. Seibert danke ich für die anregenden Diskussionen und Sabine Seibert für die unsägliche Erleichterung des Laboralltages, die mir viele graue Haare ersparte. Herrn Dr. Gülden danke ich für seine Hilfe bei der 2D-Page. Azzozz danke für den Kaffee und das Leben im Sozialraum. Dr. Danny Brodkorb möchte ich für die fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen, die Gedankenexperimente und hauptsächlich für die Freundschaft danken. Ebenfalls sei Dr. „J“ Dietrich und Stephan Scholz für die notwendigen Ablenkungen als auch nötigen Hilfestellungen gedankt.

Weiterhin möchte ich mich bei denen bedanken die mir in den Kaffeeräumen, Laboren und auch Kneipen dieser Welt mit Rat und Tat, fachlichem Interesse und ihrer Freundschaft zur Seite standen und stehen werden. Alex, Danny & Annett, Lydia, Nico, Sybille, Svenja, Gabi, Chris, Carl, Scott, Yukari, Mel & Gabe, Sven, Sebastian, Paul, Jessica, Steffen, Marieke, Bettina, Claudia, Jochen und allen anderen Gilt mein Dank.

Auch meinen Eltern danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen und die aufbauenden Worte. Ein großer Anteil meines Dankes gilt meiner besseren Hälfte Heike, aus deren Unterstützung und Geduld ich viel Kraft und Zuversicht ziehen konnte. Ronja danke ich dafür, dass sie in Sekunden alles andere nebensächlich wirken lässt und für das bezauberndste Lächeln der Welt.

## Wissenschaftlicher Werdegang

André Göhler

Hans Fallada Str. 10

17489 Greifswald

Email: [andre\\_goehler@hotmail.com](mailto:andre_goehler@hotmail.com)

Geburtsdatum 14. Mai 1982

Geburtsort Dresden

Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulbildung

1988 - 2000 Grundsule "Tamara-Bunke" und Julius-Ambrosius-Hülße Gymnasium Dresden;  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung

08/2001 - 04/2004 Studium der Biologie an der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg; Abschluss: Vordiplom

05/2004 - 05/2006 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Abschluss: Diplom  
Thema der Abschlussarbeit: „Untersuchungen zur Spezifität der Wechselwirkungen des Ltp-Proteins des *S. thermophilus* Phagen TP-J34 mit anderen Bakteriophagen“ (am Max Rubner-Institut, Kiel)

05/2006 - 08/2010 Promotion am Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Thema der Dissertation: „Molekulare Regulation des Steroidstoffwechsels in *Comamonas testosteroni*“

03.2008	Teilnehmer im PhD-Programm (ISOS) des Future Ocean Cluster of Excellence
10.2008-03.2010	Promotionsstipendium der FAZIT-Stiftung
10.2008-12.2008	Aufenthalt an der University of Nebraska-Lincoln, Vereinigte Staaten von Amerika
02.2009-06.2009	Aufenthalt an der University of Nebraska-Lincoln, Vereinigte Staaten von Amerika

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit

Molekulare Regulation des Steroidstoffwechsels in *Comamonas testosteroni*

Nach Form und Inhalt – abgesehen von der Beratung durch den Betreuer – selbstständig von mir erstellt wurde und ihre Inhalte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden sind.

Diese Arbeit wurde weder vollständig, noch in Teilen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Greifswald/Kiel August 2010

---

André Göhler