

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. August 2003 (07.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/064653 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/53,  
9/02, 1/21, 15/63, C12R 1/06, 1/07, 1/19, 1/38

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/00855

(22) Internationales Anmeldedatum:  
28. Januar 2003 (28.01.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 04 798.7 1. Februar 2002 (01.02.2002) DE

(71) Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT  
[DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13342 Berlin (DE).

(72) Erfinder: SPELLIG, Tilman; Beurhausstrasse 31,  
44137 Dortmund (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.



WO 03/064653 A2

(54) Title: METHOD FOR OVEREXPRESSION OF DEHYDROGENASES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ÜBEREXPRESSION VON DEHYDROGENASEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for overexpressing dehydrogenases, especially for overexpressing  $\Delta^1$  dehydrogenases, especially for overexpressing 3-ketosteroid- $\Delta^1$  dehydrogenases. The invention also relates to the bacteria, plasmids and DNA sequences used for overexpression.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Überexpression von Dehydrogenasen, besonders zur Überexpression von  $\Delta^1$ -Dehydrogenasen, insbesondere zur Überexpression von 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasen, sowie die für die Überexpression verwendbaren Bakterien, Plasmide und DNA-Sequenzen beschrieben.

## Verfahren zur Überexpression von Dehydrogenasen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Überexpression von Dehydrogenasen, besonders  $\Delta^1$ -Dehydrogenasen, insbesondere 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -  
5 Dehydrogenasen sowie die für die Überexpression verwendeten Bakterien, Plasmide und DNA-Sequenzen.

Die 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase ist ein Enzym, welches im Steroidstoffwechsel eine wichtige Funktion erfüllt. Mit Hilfe dieses Enzyms wird die selektive Einführung einer Doppelbindung an Position 1 im Steroidgerüst ermöglicht. Diese Reaktion ist für  
10 die Synthese einer Vielzahl von Pharma-Wirkstoffen [z.B. Betamethason, Deflazacort, Fluocortolon, Hydroxysäure, Prednisolon, etc.] von großer Bedeutung. Es wäre wünschenswert, große Mengen dieses Enzyms für eine mikrobiologische Umsetzung verfügbar zu machen.

15 Für Verfahren zur mikrobiellen Stoffumwandlung, wie z.B. Steroidtransformationen, werden in der Regel Wildstämme von Hefen, Pilzen und Bakterien eingesetzt [s. u.a. Kieslich K (1980), *Steroid conversions*, In: *Economic Microbiology - Microbial Enzymes and Transformation*, Rose AH (ed), Academic Press, London, Vol. V, pp 370-453; Kieslich K. and Sebek OK (1980) *Microbial transformations of steroids*, In:  
20 *Annual Reports on Fermentation Processes*, Perlman D (ed), Academic Press, New York, Vol. 3, pp 275-304; Kieslich K (ed) (1984) *Biotransformation, Biotechnology*, Vol. 6a, Rehm HJ and Reed G (eds), Verlag Chemie, Weinheim]. Vereinzelt werden auch von Wildstämmen abgeleitete, durch klassische Mutagenese und Selektionsverfahren gewonnene Mutanten verwendet [s. u.a. U.S. Pat. 3,102,080;  
25 Seidel L and Hörhold C (1992) *J Basic Microbiol* **32**:49-55; EP 0322081 B1; U.S. Pat. 5,298,398]. So wird z. B. bei biotechnologischen Verfahren zur selektiven Dehydrierung die endogene katalytische Aktivität verschiedener Mikroorganismen, u.a. *Arthrobacter simplex* und *Bacillus sphaericus*, genutzt [Sedlacek (1988) *Crit Rev Biotechnol.* **7**:187-236; U.S. Pat. 2,837,464; U.S. Pat. 3,010,876; U.S. Pat.  
30 3,102,080].

Es ist ferner bekannt, daß  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegene von *Arthrobacter simplex* [Choi KP et al. (1995) *J Biochem* **117**:1043-1049; Molnar I et al. (1995) *Mol Microbiol* **15**:895-905], *Comamonas testosteroni* [Plesiat P et al. (1991) *J Bacteriol* **173**:7219-

7227] und *Nocardia opaca* [Drobnic K et al. (1993) *Biochem Biophys Res Com* **190**:509-515; SUISS-PROT AC: Q04616] kloniert, sequenziert und funktionell charakterisiert wurden. Auch von *Mycobacterium tuberculosis* und *Rhodococcus rhodochromus* wurden DNA-Sequenzen publiziert, die wegen ihrer Ähnlichkeit zu den oben genannten  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegenen als mutmaßliche Dehydrogenasegene betrachtet werden können [[http://www.sanger.ac.uk/Projects/M\\_tuberculosis](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis); GenBank AC: 007847].

Eine Beschränkung der bekannten Biotransformations-Verfahren liegt darin, daß diese im allgemeinen Prozeßoptimierungen sind, die sich überwiegend auf die Verbesserung der Reaktionsbedingungen und Verfahrensparameter konzentrieren, wie z.B. Art und Zusammensetzung der Nährstoffe, Verfahrensführung, Substratapplikation, etc. Insbesondere die Verfahren zur selektiven Dehydrierung haben eine Reihe von Nachteilen wie z.B. i) vollständige Umsetzung des Edukts nur bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen [U.S. Pat. 3,102,080], ii) lange Laufzeiten und iii) die Bildung von Nebenprodukten - wie z. B.  $11\alpha$ -Hydroxyandrosta-1,4-dien-3,17-dion bei der Umsetzung von Hydrocortison zu Prednisolon, welche durch aufwendige Reinigungsverfahren abgetrennt werden müssen. Diese Nachteile führen dazu, daß der Herstellungsprozeß sehr aufwendig ist.

Es wurde nun gefunden, daß durch gezielte Veränderung der die Stoffumwandlung katalysierenden Mikroorganismen mit molekularbiologischen Methoden bessere, effizientere und zielgerichtete Biotransformationen von Steroidmolekülen erzielt werden können. Die Biotransformationsreaktionen werden mit Bakterien durchgeführt, die Plasmide zur Überexpression von 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegenen enthalten.

Zu den verwendeten Bakterien gehören insbesondere Vertreter der gram-positiven Gattung *Bacillus*, wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus* und *Bacillus megaterium*, aber auch gram-negative Vertreter, wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas species*.

Durch gezielte Stammentwicklung mit molekularbiologischen Methoden werden Mikroorganismen konstruiert, die die Synthese der Wirkstoffe beschleunigen und vereinfachen, indem i) der Einsatz sehr hoher Substratkonzentrationen bei ii) unveränderter Laufzeit möglich wird, ohne daß iii) störende Nebenprodukte entstehen.

Insbesondere wird hier die selektive Dehydrierung an Position 1 des Steroidgerüsts beschrieben, wobei aus Mikroorganismen isolierte 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegene eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß wird nun ein Verfahren zur selektiven Einführung einer

5 Doppelbindung in ein Steroidgerüst durch Überexpression von Dehydrogenasen beschrieben, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) ein Dehydrogenasegen aus einem Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert,
- b) Promotor- und Terminator-Elemente des Dehydrogenasegens oder andere Promotor- und Terminator-Elemente aus dem gleichen oder einem weiteren  
10 Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert,
- c) Expressionsplasmide konstruiert, worin das Dehydrogenasegen aus a), flankiert von Promotor- und Terminatorsequenz des Dehydrogenasegens oder von anderen Promotor- und Terminator-Elementen aus b), enthalten ist,
- d) mit dem unter c) hergestellten Expressionsplasmid Bakterien transformiert  
15 und
- e) die so hergestellten Bakterien kultiviert und mit diesen Kulturen die selektive Dehydrierung im Steroidgerüst durchführt, wobei
  - i) eine hohe Substratkonzentration bei unveränderter Laufzeit eingesetzt wird und
  - 20 ii) keine störenden Nebenzone entstehen.

Besonders betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur selektiven Einführung einer Doppelbindung in ein Steroidgerüst durch Überexpression von  $\Delta^1$ -Dehydrogenasen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- 25 a) ein  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus einem Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert,
- b) Promotor- und Terminator-Elemente des  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens oder andere Promotor- und Terminator-Elemente aus dem gleichen oder einem weiteren Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert,
- 30 c) Expressionsplasmide konstruiert, worin das  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus a), flankiert von Promotor- und Terminatorsequenz des  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens oder von anderen Promotor- und Terminator-Elementen aus b), enthalten ist,

- d) mit dem unter c) hergestellten Expressionsplasmid Bakterien transformiert und
- e) die so hergestellten Bakterien kultiviert und mit diesen Kulturen die selektive Dehydrierung im Steroidgerüst durchführt, wobei
- 5 i) eine hohe Substratkonzentration bei unveränderter Laufzeit eingesetzt wird und
- ii) keine störenden Nebenzonen entstehen.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur selektiven

10 Einführung einer Doppelbindung in ein Steroidgerüst durch Überexpression von 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) das 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus einem Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert
- b) Promotor- und Terminator-Elemente des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -
- 15 Dehydrogenasegens oder andere Promotor- und Terminator-Elemente aus dem gleichen oder einem weiteren Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert,
- c) Expressionsplasmide konstruiert, worin das 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus a), flankiert von Promotor- und Terminatorsequenz des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens oder von anderen Promotor- und
- 20 Terminator-Elementen aus b), enthalten ist,
- d) mit dem unter c) hergestellten Expressionsplasmid Bakterien transformiert und
- e) die so hergestellten Bakterien kultiviert und mit diesen Kulturen die selektive Dehydrierung an Position 1 im Steroidgerüst durchführt, wobei
- 25 i) eine hohe Substratkonzentration bei unveränderter Laufzeit eingesetzt wird und
- ii) keine störenden Nebenzonen entstehen.

Die in den Verfahrensschritten a), b) und d) genannten Bakterien können zur *gram*-

30 positiven Gattung *Bacillus*, wie *Bacillus spec.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus* sowie zu den den *gram*-positiven Vertretern *Arthrobacter simplex* und *Brevibacterium maris* bzw. zu den *gram*-negativen Vertretern *Escherichia coli* und *Pseudomonas species* gehören.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere das 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus *Arthrobacter simplex* gemäß Seq. ID No. 1, das 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Gen aus *Bacillus sphaericus* mit Promotor- und Terminator-Elementen gemäß Seq. ID No. 9 bzw. Seq. ID No. 10 und das 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Gen aus *Brevibacterium maris* gemäß Seq. ID No. 12 sowie die entsprechend exprimierten Proteine, wie 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase aus *Bacillus sphaericus* gemäß Seq. ID No. 11, 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase aus *Brevibacterium maris* gemäß Seq. ID No. 13 und 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase aus *Arthrobacter simplex* gemäß Seq. ID. No. 14.

10

Die oben genannten DNA-Sequenzen können mit geeigneten Plasmiden in Wirtszellen eingebracht werden. Geeignete Wirtszellen bzw. Rezipienten sind z.B. gram-positive Bakterien der Gattung *Bacillus*, die für die Überexpression von  $\Delta^1$ -Dehydrogenasen mit dem Ziel, in einer Biotransformationsreaktion Steroidmoleküle selektiv zu dehydrieren, verwendet werden können. Insbesondere eignen sich hierfür Species wie *Bacillus sphaericus* und *Bacillus subtilis*.

15

Die Bakterien sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Zum Einbringen der erfinderischen DNA-Sequenzen in die Wirtszellen werden Plasmide verwendet, die mindestens eine der oben genannten DNA-Sequenzen enthalten. Auf den Plasmiden werden die  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegene mit geeigneten Promotoren und Terminatoren versehen, die zur Überexpression in Bakterien erforderlich sind. Geeignete Promotoren und Terminatoren sind z.B. Promotor und Terminator des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens von *Bacillus sphaericus* gemäß Seq. ID No. 9, konstitutive Promotoren wie p(veg) oder Promotoren der Bacteriophagen  $\Phi 29$  und SPO1, induzierbare Promotoren wie p(aprE) oder p(sacB) aus *Bacillus subtilis*, Hybridpromotoren wie z.B. ein *lacI* kontrollierter SPO1-Promotor, Terminatoren von *Escherichia coli* wie t(rmB) oder von *Bacillus subtilis* wie t(senS) oder t(senN) [s. u.a. Doi RH (1984) In: Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Vol 2, Russell GE (ed), Intercept, Newcastle Upon Tyne, UK, pp 121-153; Le Grice SFJ et al. (1986) In: *Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications*, Ganesan AT and Hoch JA (eds), Academic Press, New

20

25

30

York, 433-445; Mountain A (1989) In: *Bacillus*, Harwood CR (ed), Plenum Press, New York, pp 73-114; Le Grice SFJ (1990) *Meth Enzymol* 185:210-214; Wang and Doi (1992) In: *Biology of Bacilli: Applications to Industry*, Doi et al. (eds), Massachusetts, Butterworth-Heinemann, pp 143-188].

5 Die Plasmide sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Plasmide können zur Transformation von Bakterien, die zur Überexpression von  $\Delta^1$ -Dehydrogenasen befähigt sind, verwendet werden.

Die Erfindung betrifft auch die DNA-Sequenzen mit 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Aktivität, deren DNA-Sequenzen eine Homologie von mehr als 80%,  
10 insbesondere eine Homologie von mehr als 90% und vorzugsweise eine Homologie von mehr als 95% aufweisen.

Die Erfindung betrifft auch Protein-Sequenzen mit 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Aktivität, die eine Homologie von mindestens 90%, insbesondere eine Homologie  
15 von mindestens 95% aufweisen.

Die Erfindung betrifft auch Promotoren, insbesondere den 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Promotor aus *Bacillus sphaericus* mit der DNA-Sequenz Seq. ID. No. 9, sowie homologe Promotoren, die eine Homologie zur Seq. ID No. 9 von mehr als 80%, vorzugsweise mehr als 90% und besonders bevorzugt mehr als 95%  
20 aufweisen.

Die Erfindung betrifft ferner die *Bacillus shaericus* 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase Oligonukleotide gemäß den Sequenzen Seq. ID No. 15, Seq. ID No. 16, Seq. ID No. 17 und Seq. ID No. 18, und die parS Oligonukleotide gemäß den Sequenzen Seq. ID No. 19 und Seq. ID No. 20 und deren Verwendung in Verfahren zur  
25 selektiven Einführung von Doppelbindungen in ein Steroidgerüst.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und Proteine können zur selektiven Dehydrierung von Steroiden eingesetzt werden. Die DNA- und Protein-Sequenzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

30 Dehydrierte Steroide sind z.B. Betamethason, Clobetason, Clocortolon,  $\Delta^1$ -11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluor-16 $\alpha$ -methylprogesteron, Deflazacort, Dexamethason, Diflocortolon, Fluocinolonacetonid, Fluocortolon, Hydroxysäure und Prednisolon und Derivate der genannten Verbindungen.

**Hinterlegungen**

Die in der Anmeldung genannten Bakterien-Stämme können über die jeweiligen Hinterlegungsstellen bezogen werden, z.B. von der DSM ⇒ Deutsche Sammlung  
5 von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig; ATCC ⇒ American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA; NRRL ⇒ Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois, USA; etc.

Zum besseren Verständnis der dieser Erfindung zugrunde liegenden Erfindung werden zunächst die verwendeten Methoden beschrieben.

### 1. Restriktion

5 Restriktionen von Plasmid- und genomischer DNA wurden - in Abhängigkeit von der Menge eingesetzter DNA [1 bis 20 µg] - in Volumina von 15 bis 100 µl durchgeführt. Die Enzymkonzentration betrug 1 bis 5 Units Restriktionsenzym pro µg DNA. Die Reaktion wurde in einem Puffer durchgeführt, für eine bis drei Stunden inkubiert und im Anschluß auf einem Agarosegel analysiert [Sambrook et al. (1989) *Molecular*  
10 *Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York].

### 2. Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophoresen wurden in Minigel- [BioRad], Midi-Widegel- [Biometra] und  
15 Maxigelapparaturen [Biometra] durchgeführt. Es wurden je nach Trennproblem Agarosegele mit 0,8 % bis 4 % [w/v] Agarose in 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 0,5 x TBE als Laufpuffer. DNA-Fragmente wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und auf einem Transilluminator sichtbar gemacht [Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory  
20 Press, Cold Spring Harbor, New York].

### 3. Elution von DNA aus einem Agarosegel

Präparative Restriktionsansätze wurden im Agarosegel nach Größe getrennt. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das zu isolierende  
25 DNA-Fragment wurde mit Hilfe des "Jetsorb Kit" [Genomed] unter Berücksichtigung der Vorschrift des Herstellers wiedergewonnen und in TE-Puffer aufgenommen.

### 4. Phosphorylierung von Oligonukleotiden

50 pmol Oligonucleotid wurden im vom Hersteller empfohlenen Puffer in  
30 Anwesenheit von 0.1 mM ATP und 20 Units T4 Polynucleotidkinase 45 min bei 37 °C inkubiert. Eine Enzymaktivierung erfolgte bei 68 °C [Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York].

## 5. Ligation

Zur Ligation wurden geeignete Mengen dephosphorylierter, linearisierter Vektor-DNA und und Fragment-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Die

5 Reaktion erfolgte in einem Volumen von 10 µl mit 1 Unit T4-DNA-Ligase im vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 16°C über Nacht im Wasserbad [Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York].

## 10 6. Transformation von *Escherichia coli*

Kompetente *E. coli* Zellen wurden durch CaCl<sub>2</sub> - Behandlung erhalten und bei -80°C gelagert. In der Regel wurde ein 10 µl Ligationsansatz mit 200 µl kompetenten Zellen inkubiert. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Agar mit dem jeweils

15 erforderlichen Antibiotikumzusatz plattiert und 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Eine Herstellung kompetenter Zellen und eine Transformation erfolgten nach Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

## 7. Transformation von *Bacillus subtilis*

20 Die Transformation von *Bacillus subtilis* erfolgte nach dem von Cutting SM und Vander Horn PB beschriebenen Zwei-Stufen-Verfahren [In: *Molecular Biological Methods for Bacillus* (1990), Harwood CR and Cutting SM (eds), John Wiley & Sons, Chichester].

## 25 8. Transformation von *Bacillus sphaericus*

*Bacillus sphaericus* wurde in Anlehnung an ein von Taylor und Burke (1990) publiziertes Verfahren durch Elektroporation transformiert [FEMS Microbiol Lett

66:125-128]. Die Zellen wurden in MM2G-Medium [0.3 % (w/v) Fleischextrakt, 0.8 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Pepton, 0.2 % (w/v) Glucose, 0.7 % (w/v) NaCl, 7.36 g/L

30 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.65 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 ml/L 100 % Glycerin, pH 7] über Nacht angezogen, 1:20 in frisches MM2G-Medium transferiert und 90 min bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Die Zellen wurden pelletiert, 3 x mit 10 % Glycerin gewaschen und anschließend in 750 µl Glycerin aufgenommen. 50 µl Zellsuspension wurden in einer

Elektroporationsküvette mit Plasmid-DNA gemischt, auf Eis inkubiert und in das Elektroporationsgerät [Biorad Gene Pulser™] gestellt [2.5 kV, 25 µF, 600 Ω]. Die Zellen wurden zur Regeneration 90 min bei 30 °C in MM2G-Medium inkubiert und im Anschluß auf TBAB-Agar / 5 µg Neomycin [Tryptose Blood Agar Base (Difco)]  
5 plattiert und 24 h bei 30 °C bebrütet.

### 9. Plasmidminipräparation aus *Escherichia coli*

Minipräparationen wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory  
10 Press, Cold Spring Harbor, New York] durchgeführt. Einzelkolonien wurden in Reagenzgläsern mit 4 ml LB-Medium und Selektion über Nacht angezogen. 2 ml davon wurden zur Präparation eingesetzt.

### 10. Plasmidminipräparation aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus sphaericus*

15 Die Präparation von Plasmiden aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus sphaericus* erfolgte über Säulen der Firma Genomed [“Jetstar Kit Mini”] nach dem vom Hersteller vorgegebenem Protokoll. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten wurde das in Puffer E1 aufgenommene Zellpellet mit 5 mg/ml Lysozym versetzt und die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

20

### 11. Plasmidmaxipräparation aus *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus sphaericus*

Plasmid-Maxipräparation wurde mit dem “Jetstar Kit Maxi” der Firma Genomed durchgeführt. Die Stämme wurden in 200 ml LB-Medium in Anwesenheit eines  
25 Antibiotikums über Nacht angezogen. Die Präparation der Plasmide erfolgte nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Um eine vollständige Lyse von *Bacillus subtilis* und *Bacillus sphaericus* zu gewährleisten, wurden die in Puffer E1 aufgenommenen Zellpellets zusätzlich mit 5 mg/ml Lysozym versetzt und die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

30

## 12. Präparation genomischer DNA aus *Arthrobacter simplex*, *Bacillus species* und *Rhodococcus maris*

200 ml einer dichtgewachsenen Bakterienkultur wurden pelletiert und in 11 ml Lösung I [50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton x-100, 200 µg/ml  
5 Rnase] suspendiert. Die Suspension wurde mit Lysozym [5 mg/ml → *A.simplex*,  
*B.sp.* / 15 mg/ml → *R.maris*] und 500 µl Proteinase K [20 mg/ml] versetzt und > 30  
min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß daran wurden 4 ml Lösung II [3 M Guanidinium-  
Hydrochlorid, 20 % (v/v) Tween] hinzugegeben und der Ansatz für 30 min bei 50 °C  
inkubiert. Nicht aufgelöste Partikel wurden pelletiert und verworfen. Die im Lysat  
10 gelöste chromosomale DNA wurde per Anionen-Austauschchromatographie [“Jetstar  
Kit Maxi” der Firma Genomed, s. das vom Hersteller angegebene Protokoll]  
gereinigt.

## 13. Polymerase Ketten Reaktion

15 Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden für jeden Einzelfall optimiert.  
In der Regel wurden 0,1 bis 0,5 µg Template - DNA, 10 mM dNTPs, je 50 pmol 5'-  
und 3'-Primer sowie 2,5 Units Pwo-Polymerase [Boehringer Mannheim] im vom  
Hersteller empfohlenen Puffer in 100 µl Gesamtvolumen vereinigt. Je nach Template  
- DNA wurden dem Ansatz bis zu 10 % DMSO zugesetzt. Die PCR wurde in einem  
20 “Biometra Trio Thermoblock” durchgeführt. Das Temperaturprofil wurde für jede  
Fragestellung neu angepaßt. Die Annealing-Temperatur variierte zwischen 50 °C  
[wenig stringente Bedingungen] und 65 °C. [s. PCR 1: A *Practical Approach*,  
McPherson et al. (eds), Oxford University Press (1991)]

## 25 14. Southern - Analysen

Im Agarosegel nach Größe getrennte DNA wurde nach dem Kapillar-Blot-Verfahren  
[Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor  
Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York] auf positiv geladene  
Nylonmembranen transferiert und durch UV-Bestrahlung kovalent mit der Membran  
30 verknüpft.

Hybridisierungen wurden mit Digoxigenin markierten Sonden durchgeführt. Die  
Markierung der Sonden erfolgte mit dem “DIG - High - Prime” oder dem “PCR DIG

Probe Synthesis Kit" von Boehringer Mannheim nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll.

Zur Hybridisierung wurde ein SDS-Phosphat-Puffer verwendet [7 % SDS (w/v); 0,5 M NaPhosphat pH 7,0]. Je nach Fragestellung wurden stringente oder wenig stringente Hybridisierungsbedingungen gewählt [Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York]

Die Detektion gebundener DNA erfolgte mit einem Chemilumineszenz-Reagenz [CSPD®] von Boehringer Mannheim nach der vom Hersteller empfohlenen Vorschrift.

10

#### **14. Kolonie-Hybridisierung**

Die Übertragung von Kolonien auf Pall BIODYNE® A Membranen [1,2 µm und 0,2 µm Porengröße] wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Verfahren durchgeführt.

Die Hybridisierung erfolgte mit Digoxigenin-markierten Sonden im o.a. SDS-Phosphat-Puffer, die Detektion mit einem Chemilumineszenz-Reagens CSPD® von Boehringer Mannheim ["Pall Bio Support" Anwendungs-Information SD1359G].

#### **15. DNA-Sequenzanalyse**

DNA-Sequenzanalysen erfolgten mit dem GATC® 1500-System. Die Sequenzreaktionen wurden mit dem GATC®-BioCycle Sequencing Kit nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt und auf einem 4% Polyacrylamid-Harnstoff-Gel analysiert [GATC® 1500-System Protokoll]. Die Detektion erfolgte mit CSPD® [GATC®-BioCycle Sequencing Kit Protokoll].

25

#### **16. Hydrocortison/Hydrocortison-17-acetat → Prednisolon: Aufarbeitung und Analytik**

Die Kulturbrühe wurde mit dem 3-fachen Volumen Methanol / 1 % Essigsäure verdünnt, Ultraschall-behandelt und abgeschleudert. Der Überstand wurde auf einer ODS-Hypersil-Säule [250 x 4.6 mm] mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten bei einer Flußrate von 1 ml/min chromatographiert.

Reihenfolge der Eluenten: Hydrocortison, Prednisolon, 11 $\beta$ -Hydroxyandrosta-1,4-dien-3,17-dion, Hydrocortison-17-acetat, Hydrocortison-21-acetat, Prednisolon-21-acetat.

5 **17. 4-Androsten-3,17-dion  $\rightarrow$  Androsta-1,4-dien-3,17-dion: Aufarbeitung und Analytik**

Isobutylmethylketon-Extrakte der Kulturbrühe wurden gaschromatographisch analysiert:

Säule 1: 50 m x 0.25 mm, Chrompack WCOT CP5 CB, Filmdicke 0.4  $\mu$ m

10 Säule 2: 30 m x 0.25 mm, hp 1701, Filmdicke 0.4  $\mu$ m

Detektor: FID

Trägergas: Wasserstoff

Säulenvordruck: 175 kPa

Reihenfolge der Eluenten: 4-Androsten-3,17-dion, Androsta-1,4-dien-3,17-dion

15

**18. Fluocortolon A Acetat  $\rightarrow$  Fluocortolon: Aufarbeitung und Analytik**

Die Kulturbrühe wurde mit Essigsäure auf pH 4-6 eingestellt und anschließend mit dem 4-fachen Volumen Isobutylmethylketon extrahiert. Der Extrakt wurde eingedampft, in Chloroform aufgenommen und auf einer Kromasil 100 Säule [250 x 4

20 mm] mit einem isokratischen Gradienten von Chloroform:Isooctan:1,4-Dioxan:Ethanol:Wasser 1000:100:50:10:2 bei einer Flußrate von 1.2 ml/min chromatographiert.

Reihenfolge der Eluenten: Fluocortolon A Acetat, Fluocortolon A, Fluocortolon

25 **19. 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluor-16 $\alpha$ -methylprogesteron  $\rightarrow$   $\Delta^1$ -11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluor-16 $\alpha$ -methylprogesteron: Aufarbeitung und Analytik**

Die Kulturbrühe wurde mit dem 3-fachen Volumen Methanol / 1 % Essigsäure verdünnt, Ultraschall-behandelt und abgeschleudert. Der Überstand wurde auf einer

30 ODS-Hypersil-Säule [250 x 4.6 mm] mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten bei einer Flußrate von 1 ml/min chromatographiert.

Reihenfolge der Eluenten: 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluor-16 $\alpha$ -methylprogesteron,  $\Delta^1$ -11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluor-16 $\alpha$ -methylprogesteron

**20. 11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' $\beta$ H-pregn-4-eno[17,16-d]oxazol-3,20-dion  
→ 11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' $\beta$ H-pregna-1,4-dieno[17,16-d]oxazol-  
3,20-dion (Deflazacortalkohol): Aufarbeitung und Analytik**

- 5 Die Kulturbrühe wurde turraxiert und anschließend mit dem 4-fachen Volumen Methylisobutylketon extrahiert. Der Extrakt wurde bis zur Trockne eingedampft und im gleichen Volumen Chloroform aufgenommen. Die Probe wurde auf eine Kromasil-100 Säule [250 x 4.6 mm] aufgetragen und mit Diisopropylether : Dichlorethan : 1,4-Dioxan : H<sub>2</sub>O (250:150:75:4) bei einer Flußrate von 2 ml/min chromatographiert.
- 10 Reihenfolge der Eluenten: 11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' $\beta$ H-pregn-4-eno[17,16-d]oxazol-3,20-dion, 11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' $\beta$ H-pregna-1,4-dieno[17,16-d]oxazol-3,20-dion (Deflazacortalkohol)

**Beschreibung der Abbildungen**

**Fig. 1a/ 1b** zeigt das Alignment aller bekannten 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasen [CLUSTAL W Algorithmus, Thompson JD et al. (1994) *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680].

In der Abbildung bedeuten:

*Bm3os-delta1-DH* = *Brevibacterium maris* 3-Oxosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase

*Rr3os-delta1-DH* = *Rhodococcus rhodochrous* 3-Oxosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase

*As3os-delta1-DH* = *Arthrobacter simplex* 3-Oxosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase

*Bs3os-delta1-DH* = *Bacillus sphaericus* 3-Oxosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase

*Mt3os-delta1-DH* = *Mycobacterium tuberculosis* 3-Oxosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase

*No3os-delta1-DH* = *Nocardia opaca* 3-Oxosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase

*Ct3os-delta1-DH* = *Comamonas testosteroni* 3-Oxosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase

Number of perfect matches	*	61 $\Rightarrow$ 10.34 %
Number of high similarity	:	48 $\Rightarrow$ 8.14 %
Number of low similarity	.	54 $\Rightarrow$ 9.15 %

*Bm3os-delta1-DH* [diese Arbeit]; *Rr3os-delta1-DH* [GenBank AC: AB007847]; *As3os-delta1-DH* [Molnar I et al. (1995) *Mol Microbiol* 15:895-905; GenBank AC: D37969]; *Bs3os-delta1-DH* [diese Arbeit]; *Mt3os-delta1-DH* [Cosmid Z82098, complement 16520...18211; [http://www.sanger.ac.uk/M\\_tuberculosis](http://www.sanger.ac.uk/M_tuberculosis)]; *No3os-delta1-DH* [Drobnic K et al. (1993) *Biochem Biophys Res Comm* 190:509-515; SUISS-PROT AC: Q04616]; *Ct3os-delta1-DH* [Plesiat P et. (1991) *J Bacteriol* 173:7219-7227; SUISS-PROT AC: Q06401].

**Fig. 2** zeigt das Expressionsplasmid TS#196

- Fig. 3** zeigt die Umsetzung von EAF/MAF/F zu Pln [1 g/L]: Vergleich Stamm AD#67 mit *Bacillus sphaericus* ATCC 13805  
In der Abbildung bedeuten:
- 5 EAF ⇒ Hydrocortison-21-acetat  
MAF ⇒ Hydrocortison-17-acetat  
F ⇒ Hydrocortison  
Pln ⇒ Prednisolon
- 10 **Fig. 4** zeigt die Umsetzung von EAF/MAF/F zu Pln [10 g/L]: Vergleich Stamm AD#67 mit *Bacillus sphaericus* ATCC 13805  
In der Abbildung bedeuten:
- EAF ⇒ Hydrocortison-21-acetat  
MAF ⇒ Hydrocortison-17-acetat  
15 F ⇒ Hydrocortison  
Pln ⇒ Prednisolon
- Fig. 5** zeigt die Umsetzung von AD zu ADD [1 g/L]: Vergleich Stamm AD#67 mit *Bacillus sphaericus* ATCC 13805  
In der Abbildung bedeuten:
- 20 AD ⇒ 4-Androsten-3,17-dion  
ADD ⇒ Androsta-1,4-dien-3,17-dion
- Fig. 6** zeigt zeigt die Umsetzung von FCAA zu FC [1 g/L]: Vergleich Stamm AD#116 mit *Bacillus sphaericus* ATCC 13805  
In der Abbildung bedeuten:
- 25 FCAA ⇒ Fluocortolon A Acetat  
FCA ⇒ Fluocortolon A  
FC ⇒ Fluocortolon
- 30 **Fig. 7** zeigt die Umsetzung von DDFMP zu  $\Delta^1$ -DDFMP [0.2 g/L]: Vergleich Stamm AD#116 mit *Bacillus sphaericus* ATCC 13805

In der Abbildung bedeuten:

DDFMP  $\Rightarrow$  11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluor-16 $\alpha$ -  
methylprogesteron

$\Delta^1$ -DDFMP  $\Rightarrow$   $\Delta^1$ -11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluor-16 $\alpha$ -  
methylprogesteron

5

**Fig. 8** zeigt die Umwandlung von EAF/MAF/F zu PIn im 10 L  
Fermenter [ 20 g/L ]

Vergleich Stamm AD#67 / *Bacillus sphaericus* ATCC 13805

10

Bedeutung der Abkürzungen siehe oben.

**Fig. 9** zeigt die Umsetzung von 11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' $\beta$ H-pregn-4-  
eno[17,16-d]oxazol-3,20-dion zu 11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' $\beta$ H-  
pregna-1,4-dieno[17,16-d]oxazol-3,20-dion (Deflazacortalkohol) [1 g/L]:

15

Vergleich Stamm AO#205 mit *Bacillus sphaericus* ATCC 13805

20

Die nachfolgenden Klonierungs, Isolierungs- und Konstruktions-Beispiele beschreiben die biologische Ausführbarkeit der Erfindung, ohne diese auf die Beispiele zu beschränken.

5

## Beispiel 1

### Klonierung der 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegene aus verschiedenen Species

#### 10 1.1 Aus *Arthrobacter simplex* ATCC 6946

Zur Isolierung des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens aus *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 wurde der offene Leserahmen in einer PCR-Reaktion mit dem Primer-Paar 2026 [5' CGG GAT CCA TGG ACT GGG CAG AGG AGT ACG ACG TAC TGG TGG<sub>1435-1468</sub>] und 2027 [5' CGG AAT TCT CAT CGC GCG TCC TCG GTG CCC ATG  
15 TGC CGC ACG<sub>2982-2949</sub>] aus genomischer DNA von *Arthrobacter simplex* amplifiziert. Das amplifizierte Gen wurde als *NcoI-EcoRI*-Fragment in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pTrc99A [Pharmacia] oder als *BamHI-EcoRI*-Fragment in die entsprechenden Schnittstellen des Plasmids pSP72 [Promega] kloniert. Die Gensequenz wurde mit einem GATC® 1500 Sequencer [GATC] verifiziert.

20

#### 1.2 Aus *Bacillus sphaericus* ATCC 13805

Zur Isolierung des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens aus *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 wurde unter Verwendung degenerierter Primer in einer PCR-Reaktion eine homologe Sonde aus genomischer DNA von *Bacillus sphaericus* isoliert: Unter  
25 wenig stringenten Bedingungen wurde mit dem Primer-Paar 2048 [5' GAA TRY GAT NTW NTW GTW GYW GGW WSW GG] und 2054 [5' NAR NCC NCC YTT NGT NCC] ein 1463 bp Fragment amplifiziert und in pCRScript™ Amp SK(+) [Stratagene] kloniert. Mit dem Insert als DNA-Sonde wurden überlappende genomische Klone aus einer DNA-Bibliothek, die unter Verwendung des Zero Background™ / Kan Cloning  
30 Kits [Invitrogen] hergestellt worden war, isoliert. Die Sequenz des *Bacillus sphaericus* 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens wurde mit einem GATC® 1500 Sequencer [GATC] bestimmt. Die von der Gensequenz abgeleitete Proteinsequenz ist mit der Sequenz der 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase aus *Comamonas*

*testosteroni* zu 34 % identisch. Die Ähnlichkeit beträgt 54 %. Zur 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase aus *Arthrobacter simplex* besteht eine Identität von 34 % und eine Ähnlichkeit von 54 %.

### 5 1.3 Aus *Brevibacterium maris* ATCC 21111

Zur Isolierung des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens aus *Brevibacterium maris* ATCC 21111 wurden zunächst heterologe DNA-Sonden aus dem 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen von *Arthrobacter simplex* isoliert und DIG-markiert: Mit dem Primer-Paar 2017 [GAC GCC GTA CTT CTG GCG GAG CTC GTC ATT GGC C<sub>2175-2142</sub>] und 2032 [CGA TCG TCG AGA CCG ACG G<sub>2066-2084</sub>] wurde ein 109 bp Fragment [2066-2175], mit dem Primer-Paar 2016 [GAT CAC GAT GGA CTG GGC AGA GGA GTA CGA CG<sub>1428-1459</sub>] und 2055 [GCA GCA CCG GGT TCG CGG GGA ACC AGG<sub>1618-1592</sub>] ein 190 bp Fragment [1428-1618] und mit dem Primer-Paar 2016 und 2017 ein 747 bp Fragment [1428-2175] amplifiziert. In Southern-Analysen wurde

15 anschließend spezifische Bindung der genannten Sonden an *Brevibacterium maris* DNA nachgewiesen. Die Bedingungen wurden verwendet, um Klone mit 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegensequenzen in einer DNA-Bibliothek von *Brevibacterium maris*, die unter Verwendung des Zero Background™ / Kan Cloning Kits [Invitrogen] hergestellt worden war, zu identifizieren. Hierbei wurden zwei

20 überlappende Klone identifiziert. Die Sequenz des *Brevibacterium maris* 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens wurde bestimmt. Die von der Gensequenz abgeleitete Proteinsequenz ist mit der Sequenz der 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase aus *Comamonas testosteroni* zu 28 % identisch. Die Ähnlichkeit beträgt 44 %. Zur 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase aus *Arthrobacter simplex* besteht eine Identität von

25 72 % und eine Ähnlichkeit von 83 %.

Ein Vergleich aller bekannten, die hier beschriebenen neuen Sequenzen eingeschlossen, 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasen ergibt - bezogen auf die Länge des Consensus - eine Identität von nur 10 % und eine Ähnlichkeit von nur 18 % [Abb. 1].

#### 1.4 Aus *Mycobacterium species* NRRL B-3683

Zur Klonierung des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens aus *Mycobacterium species* NRRLB-3683 wurde zunächst analog oben mit den beschriebenen DNA-Sonden Bindung an *Mycobacterium sp.* DNA nachgewiesen und das Gen anschließend aus einer genomischen DNA-Bibliothek isoliert.

#### 1.5 Aus *Mycobacterium species* NRRL B-3805

Zur Klonierung des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens aus *Mycobacterium species* NRRLB-3805 wurde zunächst analog oben mit den beschriebenen DNA-Sonden Bindung an *Mycobacterium sp.* DNA nachgewiesen und das Gen anschließend aus einer genomischen DNA-Bibliothek isoliert.

### Beispiel 2

#### Isolierung und Charakterisierung der Promotor- und Terminator-Sequenzen

Als regulatorische Sequenzen für die Überexpression der 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegene wurden Promotor- und Terminatorelemente des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens aus *Bacillus sphaericus* verwendet. Beide Elemente wurden im Zuge der Klonierung des Gens isoliert und charakterisiert.

Der Promotor enthält an Position 84 bp bzw. 61 bp oberhalb des Startcodons zwei Hexanucleotide [TTGACT<sub>-84 bis -79</sub> / TATACT<sub>-61 bis -56</sub>], die mit jeweils einer Abweichung dem Consensus bakterieller Promotoren entsprechen [ -10 / -35 Box ]. Die Distanz von 17 Nucleotiden der beiden Elemente zueinander entspricht exakt dem bakteriellen Consensus [s. Record MT et al. (1996) In: *Escherichia coli and Salmonella*, Neidhardt FC (ed), 2<sup>nd</sup> Edition, ASM Press, Washington DC, Vol 1, pp 792-821].

16 bp oberhalb des Startcodons liegt eine für *Bacillus* typische Ribosomen-Bindestelle [AGGGAGG<sub>-16 bis -10</sub>; Band L and Henner DJ (1984) *DNA* 3: 17-21].

Promotoraktivität wurde für Fragmente von Position -126 [*Sall*] bis Position -28 [*Clal*] und von Position -258 [*PstI*] bis Position -28 [*Clal*] in *lacZ*-Assays nachgewiesen.

9 bp hinter dem Stopcodon liegt ein Palindrom [AAGCCCTTCCT<sub>1698-1708</sub> / AGGAAGGGCT<sub>1731-1741</sub>], das als  $\rho$ -unabhängiger Terminator fungiert [s. Richardson

JP and Greenblatt J (1996) In: *Escherichia coli and Salmonella*, Neidhardt FC (ed), 2<sup>nd</sup> Edition, ASM Press, Washington DC, Vol 1, pp 822-848].

Prinzipiell können auch andere Promotoren und Terminatoren verwendet werden [s. u.a. Doi RH (1984) In: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Vol 2, Russell GE (ed), Intercept, Newcastle Upon Tyne, UK, pp 121-153; Le Grice SFJ et al. (1986) In: *Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications*, Ganesan AT and Hoch JA (eds), Academic Press, New York, 433-445; Mountain A (1989) In: *Bacillus*, Harwood CR (ed), Plenum Press, New York, pp 73-114; Le Grice SFJ (1990) *Meth Enzymol* 185:210-214; Wang and Doi (1992) In: *Biology of Bacilli: Applications to Industry*, Doi et al. (eds), Massachusetts, Butterworth-Heinemann, pp 143-188].

### Beispiel 3

#### 15 Konstruktion der Expressionsplasmide

Für die Herstellung eines Expressionsplasmids wurde zunächst ein "shuttle"-Plasmid, bestehend aus pSP72 [Promega] und Teilen aus pUB110 [McKenzie et al. (1986) *Plasmid* 15:93-103], konstruiert. Hierzu wurde pUB110 mit *EcoRI* und *PvuII* restringiert und das entstehende 3,6 kb Fragment in die *EcoRI* und *EcoRV*

20 Schnittstellen von pSP72 inseriert. Das 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen von *Bacillus sphaericus*, flankiert von Promotor- und Terminationssequenzen [Position -126 (*Sall*) bis Position 1861 (*Scal*)], wurde als *XbaI*-*Scal*-Fragment in die *XbaI* und *PvuII* Schnittstellen des oben beschriebenen "shuttle"-Vektors ligiert [ $\rightarrow$  TS#196, s. Abb. 2].

25 Ein zweites Expressionsplasmid trägt einen modifizierten  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen-Promotor  $p(\Delta^1)_{mut}$ : Durch PCR-Mutagenese wurden in der -35 [TTGACT  $\rightarrow$  TTGACA] und in der -10 Box [TATACT  $\rightarrow$  TATAAT] jeweils eine Base ausgetauscht, um eine exakte Übereinstimmung mit dem Consensus bakterieller Promotoren zu erzielen. Hierfür wurde der Promotor zunächst mit dem Mutagenese-Primer 2089<sub>mut</sub> [CCA

30 TCG ATG AAT CTG GTC TTC CTA TTA AAA ATT ATA GAA TTA AAC TAA TAT TCT GTC AAT TTT TCC<sub>-29 bis -91</sub>] und Primer 2090 [CAT GAC AAA ATT ATT TGA TTT AAT CAC<sub>-258 bis -284</sub>] amplifiziert und als *PstI*-*ClaI*-Fragment in die entsprechenden Schnittstellen von pBluescript II KS(+) inseriert. Die Mutationen wurden durch

Sequenzanalyse verifiziert.  $p(\Delta^1)_{mut}$  wurde als *Xba*I-*Cl*I-Fragment ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von TS#196 ligiert. Hierbei wurde der *wt*-Promotor gegen  $p(\Delta^1)_{mut}$  ausgetauscht [ $\rightarrow$  TS#251].

Zwei weitere Plasmide tragen zusätzlich ein Plasmid stabilisierendes Signal, *parS* [Lin DC and Grossman AD (1998) *Cell* **92**:675-685]. Dieses wurde über zwei zueinander komplementäre Oligonucleotide, 2091<sub>*parS*</sub> [GAT CCT GTT CCA CGT GAA ACA G] und 2092<sub>*parS*</sub> [GAT CCT GTT TCA CGT GGA ACA G], in die *Bam*HI Schnittstelle von TS#196 [ $\rightarrow$  AD#82] und TS#251 [ $\rightarrow$  TS#255] kloniert. Zur Expression in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [ $\equiv$  DSM 6897] wurde das 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen von *Bacillus sphaericus*, flankiert von Promotor- und Terminationssequenzen als 2865 bp *Sal*I-partiell*Sau*3A-Fragment [Position -126 bis Position 2739] in das mit *Bam*HI und *Xho*I geschnittene Plasmid pZErO<sup>TM</sup>-2 kloniert und in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformiert [ $\rightarrow$  Plasmid MS#46 bzw. Stamm MS#46<sub>MS#46</sub>].

15

#### Beispiel 4

#### Erzeugung rekombinanter Stämme der Gattung *Bacillus* für die Einführung einer $\Delta^1$ -Dehydrierung am Steroid

Die Expressionsplasmide TS#196, TS#251, AD#82 und TS#255 wurden in *Bacillus subtilis* DSM 402 [Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen, Braunschweig] und *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 transformiert. *Bacillus subtilis* und *Bacillus sphaericus* sind gram-positive, apathogene Organismen. Sie sind einfach zu kultivieren. Im Gegensatz zu *Bacillus sphaericus* ist *Bacillus subtilis* molekular-genetisch gut charakterisiert. Es gibt eine Reihe von Beispielen für die heterologe Expression und Sekretion von Proteinen zur Herstellung rekombinanter Genprodukte [Wang and Doi (1992) In: *Biology of Bacilli: Applications to Industry*, Doi et al. (eds), Massachusetts, Butterworth-Heinemann, pp 143-188]. Auch werden hier geeignete Promotoren und Terminatoren beschrieben.

Mit einigen der rekombinanten Stämmen wurden exemplarisch Umsetzungen eines Gemischs aus Hydrocortison [F], Hydrocortison-17-acetat [MAF] und Hydrocortison-21-acetat [EAF] zu Prednisolon [Pln] im Schüttelkolben durchgeführt. Neben den Ausgangssubstanzen F, MAF und EAF sowie dem gewünschten Produkt Pln wurde zusätzlich die Bildung von Prednisolon-21-acetat [Pln-21-Acetat] und der

30

unerwünschten Nebenzone 11 $\beta$ -Hydroxyandrosta-1,4-dien-3,17-dion [11  $\beta$  -OH-ADD] verfolgt. Um das Umsetzungspotential der rekombinanten Stämme zu demonstrieren, wurde mit Substratkonzentrationen gearbeitet, bei denen *Bacillus sphaericus* ATCC 13085 nicht mehr als 20 % PIn bildet.

- 5 Die Stämme AD#67<sub>TS#196</sub>, AD#94<sub>TS#251</sub>, AD#95<sub>TS#255</sub>, AD#96<sub>TS#255</sub>, AD#116<sub>TS#251</sub> und AO#205<sub>TS#196</sub> sind aus *Bacillus sphaericus* ATCC 13085 hervorgegangen und enthalten jeweils das angezeigte Expressionsplasmid. Die Stämme AD#89<sub>TS#196</sub> und AD#90<sub>TS#196</sub> sind aus *Bacillus subtilis* DSM 402 hervorgegangen und enthalten jeweils das angezeigte Expressionsplasmid.

Die nachfolgenden Umsetzungsbeispiele beschreiben die mikrobiologische Ausführbarkeit der Erfindung, ohne diese auf die Beispiele zu beschränken.

### Beispiel 1

#### 5 Umsetzung von EAF/MAF/F zu PIn

*Bacillus sphaericus* ATCC 13805, AD#67<sub>TS#196</sub>, AD#94<sub>TS#251</sub>, AD#95<sub>TS#255</sub>, AD#96<sub>TS#255</sub>, AD#116<sub>TS#251</sub>, *Bacillus subtilis* DSM 402, AD#89<sub>TS#196</sub>, AD#90<sub>TS#196</sub>, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  DSM 6897 und MS#46<sub>MS#46</sub> wurden in LB-Medium [Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York] in Anwesenheit von 5  $\mu$ g/ml Neomycin [*Bacillus* *sphaericus* Derivate], 50  $\mu$ g/ml bzw. 100  $\mu$ g/ml Kanamycin [*Escherichia coli* bzw. *Bacillus subtilis* Derivate] oder ohne Zusatz von Antibiotikum [*wt*-Stämme] bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Zur Umsetzung von EAF/MAF/F zu PIn wurde das Impfmateri-  
10 Spring Harbor, New York] in Anwesenheit von 5  $\mu$ g/ml Neomycin [*Bacillus* *sphaericus* Derivate], 50  $\mu$ g/ml bzw. 100  $\mu$ g/ml Kanamycin [*Escherichia coli* bzw. *Bacillus subtilis* Derivate] oder ohne Zusatz von Antibiotikum [*wt*-Stämme] bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Zur Umsetzung von EAF/MAF/F zu PIn wurde das Impfmateri-  
15 die Kultur wie oben geschüttelt. Prinzipiell kann auch jedes andere Medium verwendet werden, in dem der Organismus wachsen kann. Substratzugabe erfolgte nach 3 Stunden. Nach 24 Stunden wurden die Kolben abgenommen, Edukte und Produkt(e) extrahiert und HPLC-analysiert [s. Tab. 1; Reaktionsschema s.u.]. *Bacillus subtilis* DSM 402 und *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  zeigen erwartungsgemäß keine  
20 Umsetzung, *Bacillus sphaericus* ATCC 13085 bildet nach 24 Stunden weniger als 20 % Produkt, während alle rekombinanten Stämme der Gattung *Bacillus* [AD#67<sub>TS#196</sub>, AD#94<sub>TS#251</sub>, AD#95<sub>TS#255</sub>, AD#96<sub>TS#255</sub>, AD#89<sub>TS#196</sub> und AD#90<sub>TS#196</sub>] im gleichen Zeitraum mehr als 80 % PIn hervorbringen. Ein Abbau von Substrat oder Produkt über 48 Stunden konnte nicht beobachtet werden.  
25 Alle im folgenden beschriebenen Versuche wurden exemplarisch mit AD#67<sub>TS#196</sub> oder AD#116<sub>TS#251</sub> durchgeführt. Als Standard wurde *Bacillus sphaericus* ATCC 13085 eingesetzt. Die Versuche zeigen die um ein Vielfaches gesteigerte Umsetzungsaktivität o.g. rekombinanter Stämme hinsichtlich  $\Delta^1$ -Dehydrierungen am Steroidmolekül.

**Beispiel 2****Kinetik der Umsetzung von EAF/MAF/F zu Pln [ 1 g/L ]**

Zunächst wurde eine  $\Delta^1$ -Dehydrierung am Beispiel einer Umsetzung von EAF/MAF/F zu Pln analog oben bei einer Substratkonzentration von 1 g/L im Schüttelkolben durchgeführt [LB-Medium, 37 °C, 220 rpm]. Die Substratzugabe erfolgte nach 3  
5 Stunden. Um den Ablauf der Reaktion verfolgen zu können, wurden nach 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 24 Stunden Proben genommen, Edukte und Produkt extrahiert und HPLC-analysiert. Während der Stamm ATCC 13805 24 Stunden benötigt, um das Substrat vollständig in Pln umzuwandeln, hat Stamm AD#67 die entsprechende  
10 Menge an Pln bereits nach <10 Stunden gebildet [Abb. 3; Reaktionschema s.u.].

**Beispiel 3****Kinetik der Umsetzung von EAF/MAF/F zu Pln [ 10 g/L ]**

Der gleiche Versuch wurde bei einer Substratbelastung von 10 g/L durchgeführt. Die  
15 Substratzugabe erfolgte nach 3 Stunden, Proben wurden nach 6, 9, 12, 24, 30 und 36 Stunden genommen, die Steroide extrahiert und analysiert. Nach 6 Stunden weist die ATCC 13805 Kultur nur 1 % Pln auf, während der Stamm AD#67 bereits > 15 % Produkt gebildet hat. Nach 12 Stunden hat Stamm AD#67 bereits mehr als 50 % des Substrats in Pln umgewandelt, Stamm ATCC 13805 dagegen nur 5 % [Abb. 4;  
20 Reaktionschema s.u.].

Die hohe Umsetzungsaktivität von Stamm AD#67 beschränkt sich nicht auf das Verfahren zur Herstellung von Prednisolon aus EAF/MAF/F, sondern gilt generell für die Einführung von  $\Delta^1$  in Steroid-Moleküle.

25

**Beispiel 4****Umwandlung von 4-Androsten-3,17-dion [AD] zu Androsta-1,2-dien-3,17-dion [ADD]**

Die Umwandlung von AD zu ADD durch Stamm AD#67 bzw. Stamm ATCC 13805  
30 wurde analog oben im Schüttelkolben untersucht [LB-Medium, 37 °C, 220 rpm]. Die Substratzugabe erfolgte nach 3 Stunden, Proben wurden nach 4, 5, 6, 7, 9 und 10 Stunden genommen. Wie bei der Umwandlung von MAF/F zu Pln erfolgt die Produktbildung bei Fermentation mit Stamm AD#67 erheblich schneller als bei

Verwendung von Stamm ATCC 13805. *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 hat nach 10 Stunden weniger als 30 % des Substrats zu ADD umgewandelt, während bei Stamm AD#67 zu diesem Zeitpunkt bereits mehr als 70 % Produkt isoliert werden konnten [Abb. 5].

5

### Beispiel 5

#### Umsetzung von Fluocortolon A Acetat [FCAA] zu Fluocortolon [FC]

Auch fluoridierte Steroide werden durch rekombinante Stämme wesentlich effizienter an Position 1 dehydriert als es bislang mit den zur Verfügung stehenden

10 Biokatalysatoren möglich gewesen ist. Dies zeigt die Umwandlung von FCAA zu FC analog oben im Schüttelkolben durch AD#116 im Vergleich zu *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 [Abb. 6; Reaktionschema s.u.].

### Beispiel 6

15 **Umsetzung von 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluor-16 $\alpha$ -methylprogesteron [DDFMP] zu  $\Delta^1$ -11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluor-16 $\alpha$ -methylprogesteron [ $\Delta^1$ DDFMP]**

Auch die Umwandlung von DDFMP zu  $\Delta^1$ DDFMP analog obiger Beispiele erfolgt erheblich effizienter mit AD#116 als mit *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 [Abb. 7;

20 Reaktionsschema s.u.].

### Beispiel 7

#### Umwandlung von EAF/MAF/F zu PIn im 10 L Fermenter [ 20 g/L ]

#### Vergleich Stamm AD#67 / *Bacillus sphaericus* ATCC 13805

25 Die  $\Delta^1$ -Dehydrierungskapazität von Stamm AD#67 im Vergleich zu *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 wurde am Beispiel EAF/MAF/F  $\rightarrow$  PIn im 10 L Fermenter getestet. Die Reaktion wurde bei einer 20-fach höheren Substratbelastung durchgeführt. Die Anzucht des Impfmateri- als erfolgte in einem ersten Schritt über Nacht bei 37 °C und 220 rpm in LB-Medium in Anwesenheit von 5  $\mu$ g/ml Neomycin

30 [AD#67] bzw. ohne Zusatz eines Antibiotikums [ATCC 13805]. Im Anschluß daran wurde die Übernachtskultur 1:100 in eine 1000 ml Zwischenkultur überführt und für 9 h bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von 2,4 geschüttelt. Die Fermentation erfolgte in LB-Medium ohne Zusatz eines Antibiotikums. Prinzipiell

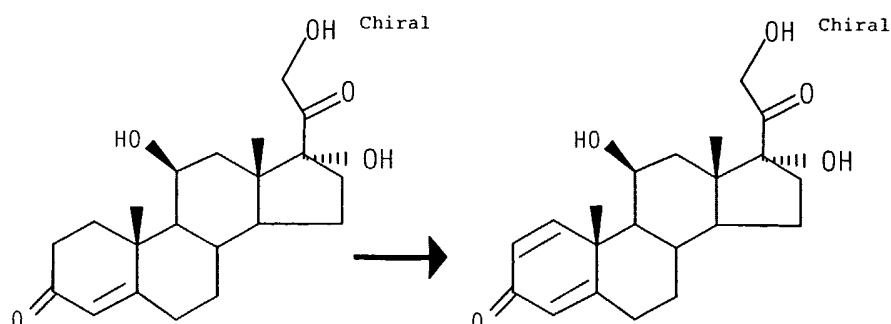
kann jedoch jedes andere Medium verwendet werden, in dem der Organismus wachsen kann. Das Substrat wurde nach 3 Stunden kontinuierlich über 30 Stunden hinzugegeben. Der pH-Wert wurde bei pH 8 gehalten. Im Verlauf der Fermentation wurden Proben gezogen und auf ihren Gehalt an Produkt und Edukt getestet. Das Fermentationsprofil zeigt, daß *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 Substratkonzentrationen dieser Größenordnung nicht bewältigen kann: Die Reaktion stoppt bei einem Rest an Substrat von über 80 %. Die Umwandlungskapazität von Stamm AD#67 ist dagegen beträchtlich: Kurz nach Abschluß der Substratapplikationsphase ist die Reaktion nahezu vollständig [ $>98\%$ ] abgelaufen [Abb. 8]. Die Umwandlungsaktivität von Stamm AD#67 liegt bei 0,6 g/L pro Stunde. Stamm ATCC 13805 zeigt dagegen eine Aktivität von 0,1 g/L pro Stunde. Störende Nebenzoneen wie z.B. 11- $\beta$ -OH-ADD wurden allenfalls in Spuren beobachtet. Die Kristallausbeute an Pln lag bei über 80 % der Theorie und entspricht dem Wert, der beim herkömmlichen Verfahren erzielt wird [Reaktionschema s.u.].

15

### Beispiel 8

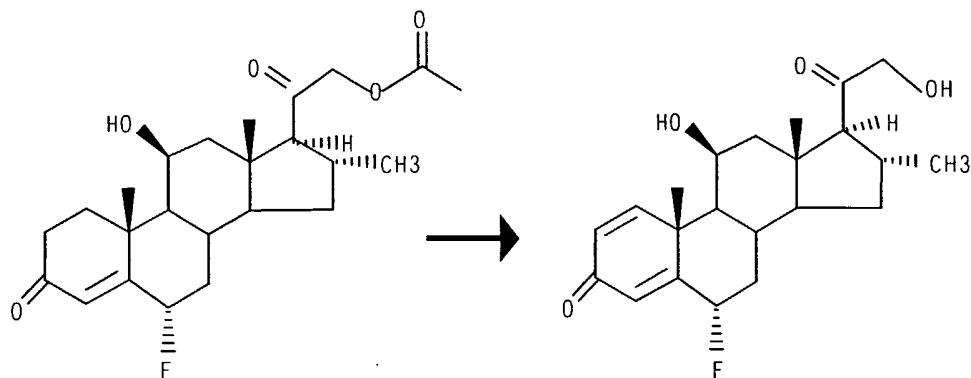
**Umsetzung von 11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' $\beta$ H-pregn-4-eno[17,16-d]oxazol-3,20-dion zu 11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' $\beta$ H-pregna-1,4-dieno[17,16-d]oxazol-3,20-dion (Deflazacortalkohol)**

Auch die Umwandlung von 1 g/L 11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' $\beta$ H-pregn-4-eno[17,16-d]oxazol-3,20-dion zu Deflazacortalkohol im Schüttelkolben analog obiger Beispiele erfolgt erheblich effizienter mit AO#205 als mit *Bacillus sphaericus* ATCC 13805 [Abb. 9; Reaktionschema s.u.]. Abweichend zu oben wurde eine Medium bestehend aus 12 g/L 67 %-igem Hefextrakt, 27 g/L Maisquellwasser und 9.2 g/L NaCl verwendet.



Hydrocortison  
[F]

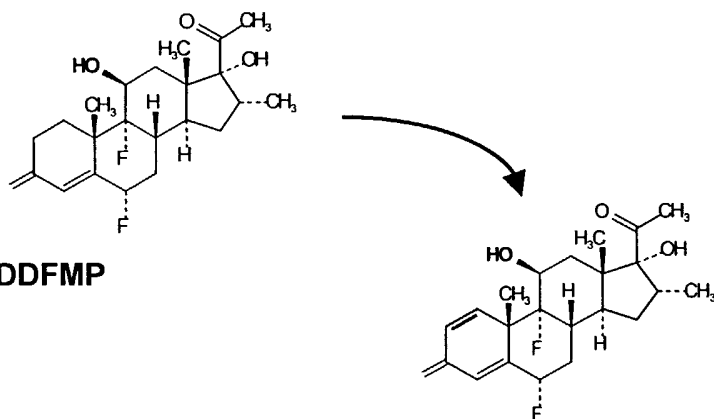
Prednisolon  
[Pln]



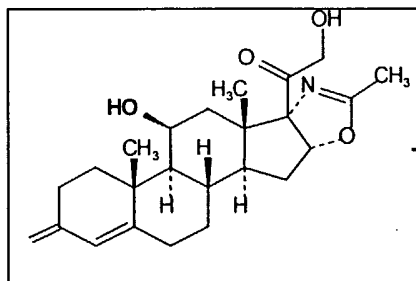
5

Fluocortolon A Acetat  
[FCAA]

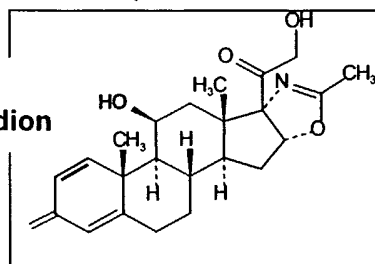
Fluocortolon  
[FC]



$\Delta^1$ -DDFMP



11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' $\beta$ H-pregn-4-eno[17,16-d]oxazol-3,20-dion



Deflazacortalkohol

Tabelle 1

Stamm	F [mg/L]	EAF/MAF [mg/L]	Pln [mg/L]	11 $\beta$ -OH-ADD [mg/L]	Substrat- belastung
<i>Bacillus sphaericus</i>					
ATCC 13805 <sup>a)</sup>	7720	39	1730	<10	9 g/L
AD#67 <sub>TS#196</sub> <sup>a)</sup>	1570	22	7790	<10	9 g/L
AD#94 <sub>TS#251</sub> <sup>a)</sup>	1650	30	7480	13	9 g/L
AD#95 <sub>TS#255</sub> <sup>a)</sup>	1460	18	7500	13	9 g/L
AD#96 <sub>TS#255</sub> <sup>a)</sup>	1530	19	7130	13	9 g/L
AD#116 <sub>TS#251</sub>	2150	n.b. <sup>b)</sup>	9330	<10	12 g/L
<i>Bacillus subtilis</i>					
DSM 402 <sup>a)</sup>	9030	510	<1	<10	9 g/L
AD#89 <sub>TS#196</sub>	1820	500	8280	14	10 g/L
AD#90 <sub>TS#196</sub>	1680	580	8120	<10	10 g/L
<i>Escherichia coli</i>					
DH5 $\alpha$	11110	1020	<1	n.b. <sup>b)</sup>	12 g/L
MS#46 <sub>MS#46</sub>	9510	1080	1910	n.b. <sup>b)</sup>	12 g/L

<sup>a)</sup> Doppelbestimmung

5 <sup>b)</sup> nicht bestimmt

## SEQUENCE LISTING

## 5 (1) GENERAL INFORMATION:

## (i) APPLICANT:

(A) NAME: Schering Aktiengesellschaft  
(B) STREET: Müllerstrasse 178  
10 (C) CITY: Berlin  
(E) COUNTRY: Germany  
(F) POSTAL CODE (ZIP): D-13342  
(G) TELEPHONE: (030)-4681-2085  
(H) TELEFAX: (030)-4681-2058

## 15 (ii) TITLE OF INVENTION:

Verfahren zur Überexpression von Dehydrogenasen

## 20 (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 20

## (iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
25 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

## (v) CURRENT APPLICATION DATA:

APPLICATION NUMBER:

## 30 (vi) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:  
(B) FILING DATE:

## 35 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1506 base pairs  
40 (B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid

## 45 (iii) HYPOTHETICAL: No

## (iii) ANTI-SENSE: No

## (vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Arthrobacter simplex* ATCC 6946  
50 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Gen *ksdD*

## (vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: EMBL Datenbank D37969  
55 (Molnar I et al., 1995, Mol Microbiol 15:895-905)

## (viii) POSITION IN GENOME:

(B) MAP POSITION: from 1435 to 2982 coding region  
(C) UNITS:

60

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 1:

atggac 1440

tgggcagagg agtacgacgt actggtggcg ggctccggcg ccggcggcat ggccgggacc 1500

65

tacaccgchg cccgcgagg gctcagcgtg tgcttggtcg aggccgggga caagttcggc 1560

gggacgaccg cctactccgg cggcgggtggg gcctgggttcc ccgcaaaccc ggtgctgctg 1620  
 cgggcccggca ccgacgacac gatcgaggac gctctcgagt actaccgagc ggtcgtcggc 1680  
 gaccgcaccc ccgcggaacct gcaggagacc tacgtccgcg gcggcgccgg cctggtcgcc 1740  
 tacctcgagg aggacgacca cttctccttc gagtccctacc cgtggccgga ctacttcggc 1800  
 5 gacgccccca aggcccgtcg cgacggccag cggcacatca tcccagacgc gctgccgggtg 1860  
 ccctccgcac ccgagctgcg cgaggtggtc cgcggggccgc tcgacaacga ccggctcggc 1920  
 acgccgcagc ccgacgacct gttcatcggc ggacggggcgc tcgtcgcccg cttcctgacc 1980  
 gcgctcgcga cctaccccc cgcacgctc gtgcgcgaga ccgactggc cgagctcgtc 2040  
 gtcgaggacg gcgtcgtggt cggcgcgata gtcgagaccg acggcgtccg ccgcgcgatc 2100  
 10 cgggcccggc gcggcgtcct cctggccgcg ggcggcttcg aggccaatga cgagctccgc 2160  
 cagaagtacg gcgtccccg cgtcgcgcgc gacacgatgg gcccgccgac caacgtcggc 2220  
 gccgcgcacc aggcccgcat cgcggtcggc gccgacaccg acctgatggg cgaggcctgg 2280  
 tgggtccccg ggctgacca ccccagcggc cgatcggcgt tcgcgctctg gttcaccggc 2340  
 ggcatcttcg tcgacggcgc cggccggcgc ttcgtcaacg agtcggcgcc gtacgaccgg 2400  
 15 ctcgcccgcg ccgtcatcga ccacctcacc gagggcggcg tcccccgcg gtactggatg 2460  
 gtctacgacc acaaggaggg ctgatcccc ccggtgcgcg ccaccaacgt ctgatggtc 2520  
 gacgaggagc agtacgtcgc cgcgggcctg tggcacaccg ccgacacgct gcccgagctg 2580  
 gccgcgctga tcggcgtccc cgcgacgcg ctggtcgcca cggtcgcgcg cttcaacgag 2640  
 ctcgtcgccg acgggtacga cgcggacttc ggccgcggcg gcgaggccta cgaccggttc 2700  
 20 ttctccggcg gcgagccgcc gctggtgagc atcgacgagg ggccgttcca cgcggccgcc 2760  
 ttcggcatct ccgacctcgg caccaagggc gggctgcgca ccgacacgtc cgcgcgcgctg 2820  
 ctgaccgcg acggcacgcc gatcgggggc ctctacgcag ccggcaatac gatggcggcg 2880  
 ccgagcggca ccacctacc gggcgggtggc aaccgatcg ggacaagcat gctcttcagc 2940  
 cacctcggcg tgcggacat gggcaccgag gacgcgcgat ga 2982  
 25

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

- 30 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 32 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear
- 35 (ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid
- (iii) HYPOTHETICAL: No
- 40 (iii) ANTI-SENSE: No
- (vi) ORIGINAL SOURCE  
 (A) ORGANISM:  
 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: Primer 2026
- 45 (vii) IMMEDIATE SOURCE:  
 (A) LIBRARY: EMBL/ GenBank, AC:D37969
- (viii) POSITION IN GENOME:  
 50 (B) MAP POSITION: from 8 to 32 coding region (Primer)  
 (C) UNITS:
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 2:
- 55 GAT CAC GAT GGA CTG GGC AGA GGA GTA CGA CG 1428-1459

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 34 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
10 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid
- (iii) HYPOTHETICAL: No
- 15 (iii) ANTI-SENSE: No
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM:  
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: Primer 2017
- 20 (vii) IMMEDIATE SOURCE:  
(A) LIBRARY: EMBL/ GenBank, AC:D37969
- (viii) POSITION IN GENOME:  
25 (B) MAP POSITION: from 1 to 34 coding region (Primer)  
(C) UNITS:
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 3:  
30 GAC GCC GTA CTT CTG GCG GAG CTC GTC ATT GGC C 2175-2142

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

- 35 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 42 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
40 (C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid
- (iii) HYPOTHETICAL: No
- 45 (iii) ANTI-SENSE: No
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM:  
50 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: Primer 2026
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:  
(A) LIBRARY: EMBL/ GenBank, AC:D37969
- 55 (viii) POSITION IN GENOME:  
(B) MAP POSITION: from 9 to 42 coding region (Primer)  
(C) UNITS:
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 4:  
60 CGG GAT CCA TGG ACT GGG CAG AGG AGT ACG ACG TAC TGG TGG 1435-1468  
BamHI NcoI

## 65 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

33

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 42 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid
- (iii) HYPOTHETICAL: No
- (iii) ANTI-SENSE: No
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM:  
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: Primer
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:  
(A) LIBRARY: EMBL/ GenBank, AC:D37969
- (viii) POSITION IN GENOME:  
(B) MAP POSITION: from 9 to 42 coding region (Primer)  
(C) UNITS:
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 5:  
CGG AAT TCT CAT CGC GCG TCC TCG GTG CCC ATG TGC CGC ACG <sub>2982-2949</sub>  
EcoRI
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 19 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid
- (iii) HYPOTHETICAL: No
- (iii) ANTI-SENSE: No
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(A) ORGANISM:  
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: Primer 2032
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:  
(A) LIBRARY: EMBL/ GenBank, AC:D37969
- (viii) POSITION IN GENOME:  
(B) MAP POSITION: from 1 to 19 coding region (Primer)  
(C) UNITS:
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 6:  
CGA TCG TCG AGA CCG ACG G <sub>2066-2084</sub>
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 27 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid

(iii) HYPOTHETICAL: No

5 (iii) ANTI-SENSE: No

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM:

10 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: Primer 2055

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: EMBL/ GenBank, AC:D37969

15 (viii) POSITION IN GENOME:

(B) MAP POSITION: from 1 to 27 coding region (Primer)

(C) UNITS:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 7:

20 GCA GCA CCG GGT TCG CGG GGA ACC AGG <sub>1618-1592</sub>

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 3630 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

30 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid

(iii) HYPOTHETICAL: No

35 (iii) ANTI-SENSE: No

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Arthrobacter simplex* ATCC 6946

40 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Gen *ksdD*  
3-Ketosteroid- $\Delta^5$ -Isomerase-Gen *ksdI*

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: EMBL/ GenBank, AC:D37969

45 (viii) POSITION IN GENOME:

(B) MAP POSITION: from 1435 to 2982 *ksdD* coding region  
from 2979 to 3350 *ksdI* coding region

50 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 8:

ctgcaggagc tcggcctggt cgagcgggcc gcggacacct tcgaccggcg caccacgctg 60

gtccgctgct cgcgcgcgg cgctcgcccag gtaccgccgc tcgcgccgc ccagcgcgcc 120

55 gacctagccg ccgcgctcgg tccggtcgac ccggccgacc gggaccgctg gacggtgctc 180

gtggagcgct acgtgcgggc tctcgaggcc cgcgggctca tctccgagct gtgactcgcc 240

ggtaagttca gagaacatta tgtgcaaacg gtccagtaaa actagccgtt cggcaagtag 300

attggtgacc catcgcattc tgtgtttccg caggtcagag gcacagtttc ggaggtgacc 360

gcagtcccgg tgaccgggag tgccgattca cggcggaaac ctcaccgaaa aatatgtgcg 420

60 ttcgatccac ttgatttgcc ctgtgtcagt gctcacactc gacgggaggc cgcactcccg 480

aggagcaccg gcatgaccgt caccgcactg cccacgacca cgcgcccgcg ctccggcgca 540

cccgcctgga accccgacga ccgcgcgacg cccctggggcg tcgtggggcg ggtgaccggg 600

	atcctcaacg	ccttcagcga	gtcccccgac	cgcctcatgc	tcgaggacgt	gatggcgctg	660
	accggcctgc	cccggtcgac	cgccttcggy	atcctcggcc	agctcatcga	cgaggggtgg	720
	gtcgagcacg	acaccgcgg	ctaccggctc	gggccgcacg	cgcccacgct	caccggccgg	780
	cccggcgagc	accaggaggt	gcgggtcgcc	gcgtcgccgt	acctcaacga	gctgcacgcc	840
5	ctcaccggcg	cggtcgccca	cctctcggtg	ctcgagggcg	accgggtcca	ctacctcgac	900
	aagatcggcg	gctccgcggc	tcgcgccgtc	ccctcgcggy	tcggcgcccg	gctgctcgcc	960
	tccgacaccg	tcagcggccg	cgcgctgctc	gcctgccgct	cccccgagta	cgtcgacgac	1020
	gtcctcggcc	cgcggtgctc	cgcgccccgg	ctcgccctgc	tccaccgcga	cctcgccgcc	1080
	gcccgcagc	gccgcggcgt	cgtgcacgcc	ccggccgacc	cgaccaccgg	catgcctcg	1140
10	atcgccgac	ccgtcctcgg	cccgcacgga	gccgtcgccg	cgatctcgct	ggcctgccc	1200
	ggcgagctgc	cgccccccc	gctcgcaccc	ctgctgctca	accaggccca	ccggatcgcc	1260
	ggcgtcctgt	tccccagcg	cgcctgcac	ggacgatcct	ggctgcgctg	atcccgcccc	1320
	cgccccgaga	ctccccgagg	acgggagaa	ccaccggggc	accggggcc	gctgcctagc	1380
	gtcgccgcca	cgacgccgga	ggtcggcgctc	ggtcaaccgg	gcgagaggat	cacgatggac	1440
15	<b>tgggcagagg</b>	<b>agtacgacgt</b>	<b>actggtggcg</b>	<b>ggctccggcg</b>	<b>ccggcggcat</b>	<b>ggccgggacc</b>	1500
	tacaccgagg	cccgcgaggg	gctcagcgtg	tgctggctcg	aggccgggga	caagttcggc	1560
	gggacgaccg	cctactccgg	cggcggtggg	gcctgggtcc	ccgcgaacc	ggtgctgctg	1620
	cgggcgggca	ccgacgacac	gatcgaggac	gctctcgagt	actaccgagc	ggtcgtcggc	1680
	gaccgcaccc	ccgcggacct	gcaggagacc	tacgtccgcg	gcggcgccgg	cctggtcgcc	1740
20	tacctcgagg	aggacgacca	cttctccttc	gagtcctacc	cgtggccgga	ctacttcggc	1800
	gacgccccca	aggcccgtcg	cgacggccag	cggcacatca	tcccgacgcc	gctgcccgtg	1860
	ccctccgac	ccgagctgcg	cgaggtggtc	cgcgggccgc	tcgacaacga	ccggtcggc	1920
	acgcccgagc	ccgacgacct	gttcacgggc	ggacggggcg	tcgtcgcccg	cttctcgacc	1980
	gcgctcgca	cctaccccc	cgccacgctc	gtgcgcgaga	ccgcactggc	cgagctcgtc	2040
25	gtcagggacg	gcgtcgtggt	cggcgcgatc	gtcgagaccg	acggcgctccg	ccgcgcgac	2100
	cgggcccggc	gcggtcctct	cctggccgcg	ggcggtctcg	aggccaatga	cgagctccgc	2160
	cagaagtaag	gcgtccccgg	cgtcgcgcgc	gacacgatgg	gcccgcggac	caacgtoggc	2220
	gccgcgcacc	aggccgcgat	cgcggctggc	gccgacaccg	acctgatggg	cgaggccctgg	2280
	tggtcccccg	ggctgaccca	ccccgacgga	cgatcggcgt	tcgcgctctg	gttcaaccggc	2340
30	ggcatcttcg	tcgacggcgc	cggccggcgc	ttcgtcaacg	agtcggcgcc	gtacgaccgg	2400
	ctcggccgcg	ccgtcatcga	ccacctcacc	gagggcgggc	tcaccccgcg	gtactggatg	2460
	gtctacgacc	acaaggaggg	ctcgatcccc	ccggtgcgcg	ccaccaacgt	ctcgatggtc	2520
	gacgaggagc	agtacgtcgc	cgcgggctcg	tgccacaccg	ccgacacgct	gcccgagctg	2580
	gccgcgctga	tcggcgtccc	cgcgcacgcg	ctggctcgcca	cggtcgcgcg	cttcaacgag	2640
35	ctcgtcgccg	acgggtaaga	cgcggacttc	ggccgcggcg	gcgaggccta	cgaccgggtc	2700
	ttctccggcg	gcgagccgcc	gctggtgagc	atcgacgagg	ggccgttcca	cgcggccgcc	2760
	ttcggcatct	ccgacctcgg	caccaagggc	gggctgcgca	ccgacacgctc	cgcgcgctg	2820
	ctgaccgagg	acggcacgcc	gatcgggggc	ctctacgacg	ccggcaatac	gatggcggcg	2880
	ccgagcggca	ccacctaccc	ggcggtgggc	aaccgatcgc	ggacaagcat	gctcttcagc	2940
40	caactcggcg	tgcggcacat	gggcaccgag	gacgcgcgat	gagcgcggag	gtgaaggccg	3000
	ccgtggcgcg	ctacctcgat	gctgtcgccg	gcggctcgcc	ggccgcgatc	gccgcgctct	3060
	acgcccccca	cgccacgctc	gaggaccccg	tcggcgccga	cctcgtccgc	ggccgcgagg	3120
	cgatcgaaga	gttctacggc	gccctcggcg	gcgcgaaggt	cagcaccgag	ctgctcggcg	3180
	tccgcgccgt	cgcgggccac	gccgcgttct	cgttccgggt	caccaccgac	gccggcgacc	3240

36

agcagtacgt cgtcagaccg atcgacgtga tgacgttcga cgcggacggc cagatcacgt 3300  
 ccatgcgggc gttctgggcg cccggggaca tggtcgtcac gccggcctga cggtcccgt 3360  
 gtaacacgct gtccaccgcg cttcccggcg gttgtcgacg cgctctcggc gtgtcgcacg 3420  
 gcgtgtcgcg ccgtggacag cgtgttacag cggcgggggc cgtcaggcgg tggccgcgtg 3480  
 5 ggtggcgacg atgtggccga agaccagacc ctggccgatg gtcgcccgg cccccgggta 3540  
 gctgcgcccg aagacgttgc ccgcggtgtt gccgatcgcg tagagcccct cgatcgggct 3600  
 gccgtcggcg cgcagcggac ggccgagctc 3630

## 10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 241 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 15 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid

20 (iii) HYPOTHETICAL: No

(iii) ANTI-SENSE: No

## (vi) ORIGINAL SOURCE:

- 25 (A) ORGANISM: *Bacillus sphaericus* ATCC 13805  
 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: promoter of 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase  
*ksdD*  
 (*ksd*  $\Rightarrow$  keto-steroid-degradation)

30 (vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: --

## (viii) POSITION IN GENOME:

- (B) MAP POSITION: from -258 to -28 promoter region  
 35 (C) UNITS:

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 9:

catg acaaaattat ttgatttaat cactgcagga aagtttgatc - 241  
 40 cgactgacat aattacacat aagctaccat tagaagaagc aagtaaagcc tatcaactat - 181  
 ttagtaaccg tgaagataac tgtattaaag tgattttaaa accttaaagg gagcgtcgac - 121  
 gctccttttt ttgtgtgtaa tgttgggatg gaaaaattga ctgaatatta gtttaattct - 61  
 atacttttta ataggaagac cagattcatc gatttagctc attaagggag gaatggttga - 1

## 45 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1884 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 50 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid

55 (iii) HYPOTHETICAL: No

(iii) ANTI-SENSE: No

## (vi) ORIGINAL SOURCE:

- 60 (A) ORGANISM: *Bacillus sphaericus* ATCC 13805

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase *ksdD*  
( *ksd*  $\Rightarrow$  keto-steroid-degradation )

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

5 (A) LIBRARY: --

(viii) POSITION IN GENOME:

(B) MAP POSITION: from 1 to 1689 coding region

(C) UNITS:

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 10:

	atgaaatggg atgcaagtta tgatgtagtt gtagtaggct ctggagctgc gggattgaca	60
15	gcaggtttaa cagcaaagtt acaaggtttg aaatcattag taattgaaaa aacggatcgc	120
	tatggtggtg cctctgctat ttcaggcggg gccttatgga ttccgaataa tcatgttatt	180
	aaaggtgcag gtgttccaga tacacatgaa cttgcacgcc aatatttaga ttcaacagtt	240
	ggtgatcgag tgctgaagc tttaaaggaa gcctatatta caagaggccc agaaatggtg	300
	cggtttttat acaataaaac taagcatatg cgtttccaat atgcaaaagg ttactcggac	360
20	tactatccag aaaaaccagg gggcttgtct cagggacggt ccattgaacc actaattttc	420
	gatttaacga aaatgggctc tttagcaaat actatgcgtc gagcaactct atcaactaag	480
	ggctttacaa tgaatagcta tgagtttcat aaagttaata tgataacacg gacgttaaaa	540
	ggtaaaacaa ctgcaactgaa attagggcatg cgcctagtaa aatcaaagggt gacaaaaagt	600
	gagccagttg cgttagggtga agcttttagta gcaogttttac gactatcgcct agcggaggca	660
25	aatggtgagc tttggctatc aacggccttt aaagatttta tgatggataa gggtcgagtg	720
	atggggatca ttgtggaacg agatggacaa gagctgcgaa ttgaggcaaa gaaagggtgtt	780
	gttctttcat caggcggcct ttcacacaac caagcacttc gagaacaata tttaccaagc	840
	ccaacgaacg ctgcatggac ttcttcacca gagggacaaa cagggtgacgt tatagaacca	900
	ggtgtaaaaa ttggcgctac attagattta atggataaag tgtggggagc gccttctggt	960
30	attgatccac aaggacaacc cttcttcta gtagcggaca ggggcgtacc aaatattgatt	1020
	gtttagata gcgcaggaca gcgtttgtg aatgaagcgg ctccttatca tgaatttgta	1080
	gataccatgt acgagcatca aaagaccacg caacaggctg ttccttcatg gatagtcatt	1140
	gatgcctcta ctaaaagccg ttatattttt acaggctctgt tcccaggaca agccttccca	1200
	aaaagctggt ttgatcatgg catcgtgaaa agtgcagagt ccattgaaga acttgctaga	1260
35	caaatggatg tgctgcctga aagtctaata gagacagtaa atcgttttaa tgactttgcc	1320
	cgaaatggtc atgatgatga tttttatcgt ggtgatagtg cctatgataa ttactatggg	1380
	gaccaacat tgccaaatcc aaatttagca gagatcaaaa aagctccttt ctatgcatta	1440
	cgtatatac caggcgatat tggcacaag ggaggcttgg tagtggatga acatgctcgg	1500
	gttattaagg cagatggcga accaatcgaa ggattatatg cttcaggtaa ttgttcagcg	1560
40	tcgatcatgg gagaaacgta tcctggcccg ggtgctacga ttgggcctgg tatgacatta	1620
	agctttgtgg cgactacaca tatggctaac accgtaaaaa aagaagaagt accacttgta	1680
	aaaatataa	1689
	a gttgactaag cccttctat gactgtgata aggaagggtt ttcattgtgga	1740
	tgaaatgttc taatattttt ttgctaagaa tatagtggct acaacatgta tggcgatgat	1800
45	aatggaaaaa aggagcgata tagtaaattg cttacgtata aacttatcac gactattgaa	1860
	gcattagagc cctatcgaag tact	1884

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 562 amino acids  
 (B) TYPE: peptide  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
 (A) ORGANISM: *Bacillus sphaericus* ATCC 13805  
 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase KsdD  
 ( Ksd  $\Rightarrow$  Keto-steroid-degradation )
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 11:
- |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|-----|
| MKWDASYDVV | VVGSGAAGLT | AGLTAKLQGL | KSLVIEKTDR | 40  |
| YGGASAISSG | ALWIPNNHVI | KGAGVPDTHE | LARQYLDSTV | 80  |
| GDRVPEALKE | AYITRGPEML | RFLYNKTKHM | RFQYAKGYSD | 120 |
| YYPEKPGGLS | QGRSIEPLIF | DLTKMGSLAN | TMRRATLSTK | 160 |
| GFTMNSYEFH | KVNMITRTLK | GKTTALKLGM | RLVKSKVTKS | 200 |
| EPVALGEALV | ARLRLSLAEA | NGELWLSTAF | KDFMMDKGRV | 240 |
| MGIIVERDQ  | ELRIEAKKGV | VLSSGGFSHN | QALREQYLPS | 280 |
| PTNAAWTSSP | EGQTGDVIEP | GVKIGATLDL | MDKVWGAPSV | 320 |
| IDPQQPFFL  | VADRGVPMI  | VVDSAGQRF  | NEAAPYHEFV | 360 |
| DTMYEHQKTT | QQAVPSWIVI | DASTKSRYIF | TGLFPGQAFP | 400 |
| KSWFDHGIVK | SAESIEELAR | QMDVLLESLI | ETVNRFNDF  | 440 |
| RNGHDDDFYR | GDSVDNYYG  | DPTLPNPNLA | EIKKAPFYAL | 480 |
| RIYPGDIGTK | GGLVDEHARV | IKADGEPIEG | LYASGNCSAS | 520 |
| IMGETYPPG  | ATIGPGMTLS | FVAATTHMAN | TVKKEEVPLV | 560 |
| KI*        |            |            |            | 562 |

## 35 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 1539 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid
- (iii) HYPOTHETICAL: No
- (iii) ANTI-SENSE: No
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
 (A) ORGANISM: *Brevibacterium maris* ATCC 2111  
 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Gen *ksdD*  
 ( *ksd*  $\Rightarrow$  keto-steroid-degradation )
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:  
 (A) LIBRARY: --
- (viii) POSITION IN GENOME:  
 (B) MAP POSITION: from 1 to 1539 coding region

## (C) UNITS:

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 12:

5	atggtcaact ggaacgaaga atgtgacgtg ttggtggccg ggtcggggcg cgggtggcgtc	60
	accggcgcggt acaccgcggc tcgcgagggc ctgcgacgtga tcctgggtcga ggcgacggac	120
	aagttcggcg gcaccaccgc gtactccggt gggggcggggt tctggttccc ggccaaccgc	180
	gtgctcaagc gcgccggcac cgacgacacg atcgaggacg cgctcgagta ctaccacgcc	240
	gtcgtcggcg accggacccc gcgcgagctg caggacacct acgtcaaggg cggcgctccg	300
10	ctggtcgagt acctcgagca ggacgagaac ctcaagttcg agatgctgcc gtggcccgcac	360
	tactacggca agatgccgaa ggcccgcaac gacggccagc gccacacgat gccgacgccg	420
	ctgccgatct ccgaggtcgg tgacctgcac aagctcgtcc gcggaccgct cgacttcgac	480
	cggctcggcg ccgacctgcc cgagatgctg atcggcgggc gcgcgctcgt cggtcgcttc	540
	ctcaaggcga tcggcaacta cccgaacgcg aagctgaacc tcaacacccc gctcgtcgag	600
15	ctggtggtcg aggacggcg cgctcgtcggc gcgctcgtcg agcgtgacgg cgagcaggtc	660
	gcgatccgcg cccgcaaggc cgtcatcctg gcggccggcg gcttcgaggg caacgacgag	720
	ctgcgccaga agtacggcgt ccccggtgtc gcgcgcgaca cgatgggtcc gtggggcaac	780
	gtcggccagg cgcaccaggc cggcatcgcc gtcggtgccg acaccgacct gatggaccag	840
	gcgtggtggt gcgccggcct gacccacccg gacggacggt ccgcgttcgc gctgtgcttc	900
20	accggcgcca tcttcgtcaa cgacgacggc aagcgcttcg tcaacgagta cgcgccgtac	960
	gaccgcctcg gccgcgacat catcgcgggc atggaggacg gctcggtcac gctgccgtac	1020
	tggatgatct acgacgacaa gcagggccag cggccgccga tcgcggccac caacgtctcg	1080
	atggtcgaga ccgagaagta cgtcgacgcc ggcctgtggc acaccgccga cagctcgag	1140
	gagctggccg gaaagatcgg tgtcccggcg gagaacctgc tggcaacggt ggagcggttc	1200
25	aacgcgatgg ccgccaacga cgtcgacgag gacttcggtc gcggcgacga ggcgtacgac	1260
	cgggcgttca ccggcgggcg cccggcgctg atcccgatcg agcaggggtcc gttccacgct	1320
	gccgcgctcg gcactctccg cctcggcacc aagggcggtc tgcgtaccga caccgcggcg	1380
	cggggtgctcg acacctcggg caaccggatc cccggtctgt acgcggcccg caacaccatg	1440
	gcggccccga gcggcaccac ctaccccggt ggcggtaacc cgatcggcac ctccatgctg	1500
30	ttcagccaca tcgccgcgat gaacatcgcc ggcaagtag	1539

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

35	(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
	(A) LENGTH: 512 amino acids
	(B) TYPE: peptide
	(C) STRANDEDNESS: single
	(D) TOPOLOGY: linear
40	(ii) MOLECULE TYPE: peptide
	(vi) ORIGINAL SOURCE:
	(A) ORGANISM: <i>Brevibacterium maris</i> ATCC 2111
45	(C) INDIVIDUAL ISOLATE: 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase KsdD ( Ksd $\Rightarrow$ <u>K</u> eto- <u>s</u> teroid- <u>d</u> egradation)

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 13:

50	MVNWNEECDV LVAGSGAGGV TGAYTAAREG LDVILVEATD	40
	KFGGTTAYSG GGGFWFPANP VLKRA GTDDT IEDALEYYHA	80
	VVGDRTPREL QDTYVKG G GAP LVEYLEQDEN LKFEMLPWPD	120

	YYGKMPKARN DGQRHTMTP LPISEVGDH KLVRGPLDFD	160
	RLGADLPEML IGGRALVGRF LKAIGNYPNA KLNLNTPLVE	200
	LVVEDGAVVG ALVERDGEQV AIRARKGVIL AAGGFEGNDE	240
	LRQKYGVPGV ARDTMGPWGN VGQAHQAGIA VGADTDLMDQ	280
5	AWWSPGLTHP DGRSAFALCF TGGIFVNDG KRFVNEYAPY	320
	DRLGRDIIAG MEDGSVTLPY WMIYDDKQGQ RPPIAATNVS	360
	MVETEKYVDA GLWHTADTLE ELAGKIGVPA ENLLATVERF	400
	NAMAANDVDE DFRGDEAYD RAFTGGGPAL IPIEQPFHA	440
	AAFGISDLGT KGGLRTDTAA RVLDTSGNPI PGLYAAGNTM	480
10	AAPSGTTYPG GGNPIGTSML FSHIAAMNIA GK	512

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

- 15 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 515 amino acids  
 (B) TYPE: peptide  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear
- 20 (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
 (A) ORGANISM: *Arthrobacter simplex*  
 25 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase Ksd  
 ( Ksd  $\Rightarrow$  Keto-steroid-degradation)
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:  
 (A) LIBRARY: EMBL/ GenBank, AC:D37969
- 30 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 14:

35	MDWAEEDVVL VAGSGAGGMA GTYTAAREGL SVCLVEAGDK	40
	FGGTTAYSGG GGAWFANPV LLRAGTDDTI EDALEYRYAV	80
	VGDRTPADLQ ETYVRGGAGL VAYLEEDDH SFESYPWPDY	120
	FGDAPKARRD QQRHIIPTPL PVPSAPELRE VVRGPLDNR	160
	LGTPQPDDL F IGGRALVARF LTALATYPHA TLVRETALAE	200
40	LVVEDGVVVG AIVETDGVRR AIRARRVLL AAGGFEEANDE	240
	LRQKYGVPGV ARDTMGPPTN VGAAHQAAIA VGADTDLMGE	280
	AWWSPGLTHP DGRSAFALWF TGGIFVDGAG RRFVNESAPY	320
	DRLGRAVIDH LTEGGVTPRY WMVYDHKEGS IPPVRATNVS	360
	MVDEEQYVAA GLWHTADTLP ELAALIGVPA DALVATVARF	400
45	NELVADGYDA DFRGGEAYD RFFSGGEPPL VSIDEQPFHA	440
	AAFGISDLGT KGGLRTDTSA RVLTDGTPI GGLYAAGNTM	480
	AAPSGTTYPG GGNPIGTSML FSHLAVRHMG TEDAR*	515

50 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 29 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 55 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

41

- (ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid
- (iii) HYPOTHETICAL: No
- 5 (iii) ANTI-SENSE: No
- (vi) ORIGINAL SOURCE:  
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: Primer 2048
- 10 (vii) IMMEDIATE SOURCE:  
(A) LIBRARY: --

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 15:

15

GAA TRY GAT NTW NTW GTW GYW GGW WSW GG

mit N ≡ GATC, R ≡ GA, S ≡ GC, W ≡ AT, Y ≡ TC

20

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
25 (A) LENGTH: 18 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid

30

- (iii) HYPOTHETICAL: No

- (iii) ANTI-SENSE: No

- 35 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: Primer 2054

- (vii) IMMEDIATE SOURCE:

40

(A) LIBRARY: --

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 16:

45

NAR NCC NCC YTT NGT NCC

mit N ≡ GATC, R ≡ GA, S ≡ GC, W ≡ AT, Y ≡ TC

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 17:

50

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 66 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
55 (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid

- (iii) HYPOTHETICAL: No

(iii) ANTI-SENSE: No

(vi) ORIGINAL SOURCE:

5 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: Primer 2089<sub>mut</sub>

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: Seq. ID No. 9

10 (viii) POSITION IN GENOME:

(B) MAP POSITION: from -29 to -91 promoter region

(C) UNITS:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 17:

15

CCA TCG ATG AAT CTG GTC TTC CTA TTA AAA ATT ATA GAA TTA AAC TAA

TAT TCT GTC AAT TTT TCC<sub>-29 bis -91</sub>

mit N ≡ GATC, R ≡ GA, S ≡ GC, W ≡ AT, Y ≡ TC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25

(A) LENGTH: 27 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid

(iii) HYPOTHETICAL: No

(iii) ANTI-SENSE: No

35

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: Primer 2090

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

40

(A) LIBRARY: Seq. ID No. 9

(viii) POSITION IN GENOME:

(B) MAP POSITION: from -258 to -284

(C) UNITS:

45

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 18:

CAT GAC AAA ATT ATT TGA TTT AAT CAC<sub>-258 bis -284</sub>

50

mit N ≡ GATC, R ≡ GA, S ≡ GC, W ≡ AT, Y ≡ TC

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

55

(A) LENGTH: 22 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

60

(ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid

(iii) HYPOTHETICAL: No

(iii) ANTI-SENSE: No

5

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: Oligonukleotid 2091<sub>pars</sub>

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

10

(A) LIBRARY: Lin DC and Grossman AD (1998, Cell 92: 675-685)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 19:

15

GAT CCT GTT CCA CGT GAA ACA G

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 20:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 22 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: nucleic acid

(iii) HYPOTHETICAL: No

30

(iii) ANTI-SENSE: No

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: Oligonukleotid 2092<sub>pars</sub>

35

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: Lin DC and Grossman AD (1998, Cell 92: 675-685)

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 20:

GAT CCT GTT TCA CGT GGA ACA G

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur selektiven Einführung einer Doppelbindung in ein Steroidgerüst durch Überexpression von Dehydrogenasen, dadurch gekennzeichnet, daß man
- 5 a) ein Dehydrogenasegen aus einem Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert,
- b) Promotor- und Terminator-Elemente des Dehydrogenasegens oder andere Promotor- und Terminator-Elemente aus dem gleichen oder einem
- 10 einem weiteren Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert
- c) Expressionsplasmide konstruiert, worin das Dehydrogenasegen aus a), flankiert von Promotor- und Terminatorsequenz des Dehydrogenasegens oder von anderen Promotor- und Terminator-Elementen aus b), enthalten ist,
- 15 d) mit dem unter c) hergestellten Expressionsplasmid Bakterien transformiert und
- e) die so hergestellten Bakterien kultiviert und mit diesen Kulturen die selektive Dehydrierung im Steroidgerüst durchführt, wobei
- 20 i) eine hohe Substratkonzentration bei unveränderter Laufzeit eingesetzt wird und
- ii) keine störenden Nebenzone entstehen.
2. Verfahren zur selektiven Einführung einer Doppelbindung in ein Steroidgerüst durch Überexpression von  $\Delta^1$ -Dehydrogenasen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man
- 25 a) ein  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus einem Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert,
- 30 b) Promotor- und Terminator-Elemente des  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens oder andere Promotor- und Terminator-Elemente aus dem gleichen oder einem weiteren Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert
- c) Expressionsplasmide konstruiert, worin das  $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus a), flankiert von Promotor- und Terminatorsequenz des  $\Delta^1$ -

Dehydrogenasegens oder von anderen Promotor- und Terminator-Elementen aus b), enthalten ist,

- d) mit dem unter c) hergestellten Expressionsplasmid Bakterien transformiert und
- 5 e) die so hergestellten Bakterien kultiviert und mit diesen Kulturen die selektive Dehydrierung im Steroidgerüst durchführt, wobei
- i) eine hohe Substratkonzentration bei unveränderter Laufzeit eingesetzt wird und
- ii) keine störenden Nebenzonen entstehen.

10

3. Verfahren zur selektiven Einführung einer Doppelbindung in ein Steroidgerüst durch Überexpression von 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasen gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man

15

a) das 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus einem Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert,

b) Promotor- und Terminator-Elemente des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens oder andere Promotor- und Terminator-Elemente aus dem gleichen oder einem weiteren Bakterium isoliert, kloniert und amplifiziert,

20

c) Expressionsplasmide konstruiert, worin das 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus a), flankiert von Promotor- und Terminatorsequenz des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens oder von anderen Promotor- und Terminator-Elementen aus b), enthalten ist,

25

d) mit dem unter c) hergestellten Expressionsplasmid Bakterien transformiert und

e) die so hergestellten Bakterien kultiviert und mit diesen Kulturen die selektive Dehydrierung an Position 1 im Steroidgerüst durchführt, wobei

i) eine hohe Substratkonzentration bei unveränderter Laufzeit eingesetzt wird und

30

ii) keine störenden Nebenzonen entstehen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die unter a), b) und d) genannten Bakterien zur *gram*-positiven Gattung *Bacillus*

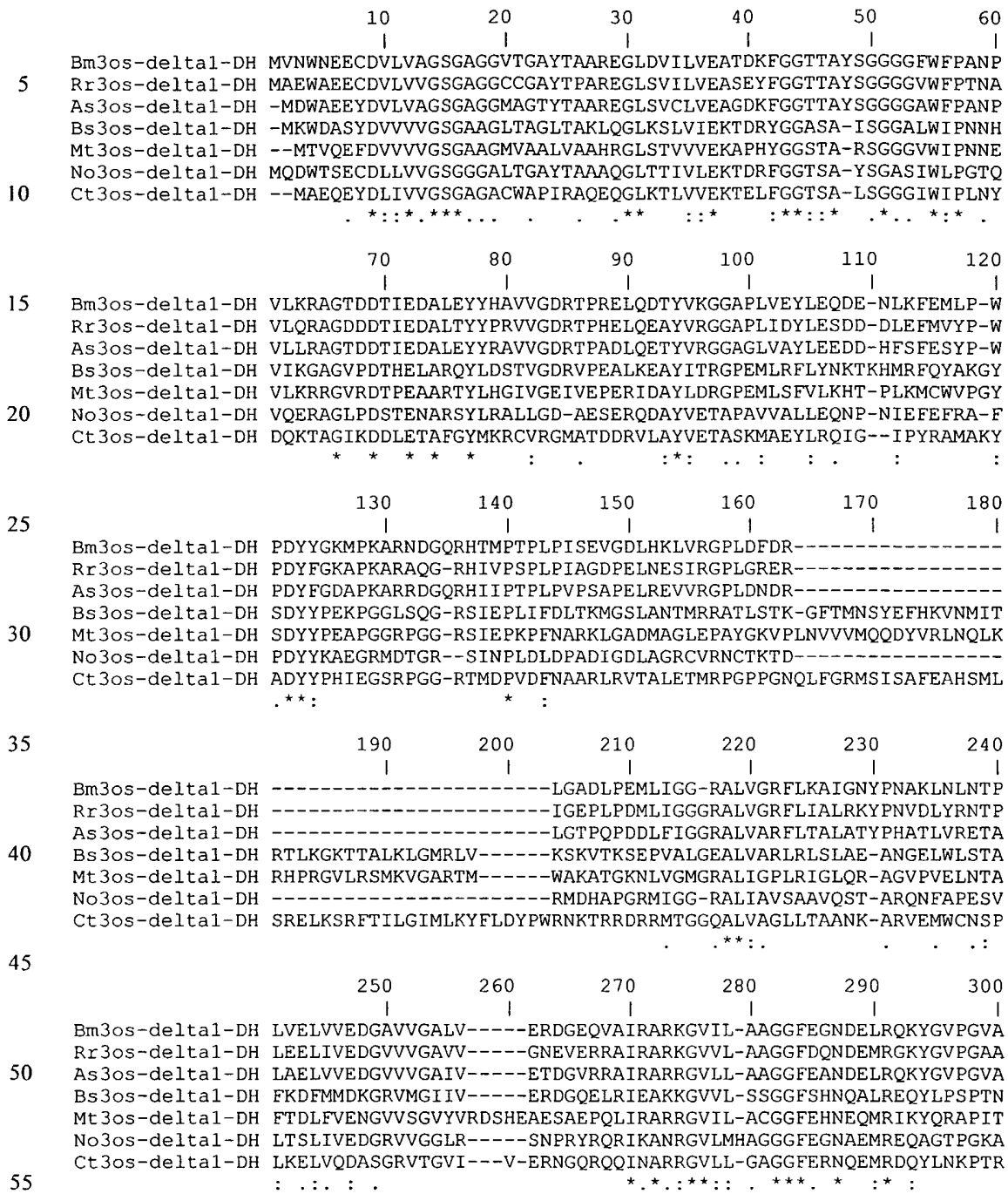
und *Arthrobacter* und zur gram-negativen Gattung *Escherichia coli* und *Pseudomonas* gehören.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien zur Spezies *Bacillus spec.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Arthrobacter simplex*, *Brevibacterium maris* und *Pseudomonas species* gehören.
6. 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus *Arthrobacter simplex* gemäß Seq. ID No. 1.
7. 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus *Bacillus sphaericus* gemäß Seq. ID No. 10.
8. 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen aus *Brevibacterium maris* gemäß Seq. ID No. 12.
9. 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase aus *Bacillus sphaericus* gemäß Seq. ID No. 11.
10. 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase aus *Brevibacterium maris* gemäß Seq. ID No. 13.
11. 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase aus *Arthrobacter simplex* gemäß Seq. ID No. 14.
12. 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegen Promotor aus *Bacillus sphaericus* gemäß Seq. ID No. 9.
13. Gram-positive Bakterien der Gattung *Bacillus* als Rezipienten für die Überexpression von  $\Delta^1$ -Dehydrogenasen zur Umsetzung von Steroiden, bei denen eine selektive Dehydrierung vollzogen wird.

14. Bakterien gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es *Bacillus sphaericus* und *Bacillus subtilis* sind.
15. Plasmide, enthaltend mindestens eine DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8 und 12.
16. Plasmide gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß diese geeignete Promotoren und Terminatoren zur Überexpression von  $\Delta^1$ -Dehydrogenasen in Bakterien enthalten.
17. Plasmide gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß als Terminatoren der Terminator des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens von *Bacillus sphaericus* gemäß Seq. ID No. 10, oder Terminatoren von *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* und als Promotoren der Promotor des 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenasegens von *Bacillus sphaericus* gemäß Seq. ID No. 9, oder konstitutive Promotoren, oder Promotoren der Bacteriophagen  $\Phi 29$  und SPO1, oder induzierbare Promotoren aus *Bacillus subtilis* oder Hybridpromotoren verwendet werden.
18. Plasmide gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß als Terminator der *Escherichia coli* Terminator t(*rrmB*), der *Bacillus subtilis* Terminator t(*senS*) oder t(*senN*) und als Promotoren der konstitutive Promotor p(*veg*), als induzierbarer Promotor p(*aprE*) oder p(*sacB*) aus *Bacillus subtilis* oder als Hybridpromotor ein *lacI* kontrollierter SPO1-Promotor verwendet werden.
19. Verwendung der Plasmide gemäß den Ansprüchen 15 bis 18, zur Transformation von Bakterien, die zur Überexpression von  $\Delta^1$ -Dehydrogenasen befähigt sind.
20. DNA-Sequenzen mit 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Aktivität, gemäß den Ansprüchen 6 bis 8, deren DNA-Sequenzen eine Homologie von mehr als 80% aufweisen.

21. DNA-Sequenzen mit 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Aktivität, gemäß den Ansprüchen 6 bis 8, deren DNA-Sequenzen eine Homologie von mehr als 90% aufweisen.
- 5 22. DNA-Sequenzen mit 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Aktivität, gemäß den Ansprüchen 6 bis 8, deren DNA-Sequenzen eine Homologie von mehr als 95% aufweisen.
- 10 23. Protein-Sequenzen, gemäß den Ansprüchen 9 bis 11, die eine Homologie von mindestens 90% aufweisen und eine 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Aktivität besitzen.
- 15 24. Protein-Sequenzen, gemäß den Ansprüchen 9 bis 11, die eine Homologie von mindestens 95% aufweisen und eine 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase-Aktivität besitzen.
25. Promotor DNA-Sequenz gemäß Anspruch 12, deren DNA-Sequenz eine Homologie von mehr als 80% aufweist.
- 20 26. Promotor DNA-Sequenz gemäß Anspruch 12, deren DNA-Sequenz eine Homologie von mehr als 90% aufweist.
- 25 27. Promotor DNA-Sequenz gemäß Anspruch 12, deren DNA-Sequenz eine Homologie von mehr als 95% aufweist.
28. *Bacillus shaericus* 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -Dehydrogenase Oligonukleotide gemäß den Sequenzen Seq. ID No. 15, Seq. ID No. 16, Seq. ID No.17 und Seq. ID No. 18.
- 30 29. *parS* Oligonukleotide gemäß den Sequenzen Seq. ID No. 19 und Seq. ID No. 20.

30. Verwendung der DNA-Sequenzen gemäß den Ansprüchen 6 bis 8, 12 und 20 bis 22 zur selektiven Dehydrierung von Steroiden.
31. Verwendung der Proteine gemäß den Ansprüchen 9 bis 11, 23 und 24 zur  
5 selektiven Dehydrierung von Steroiden.
32. Verwendung gemäß den Ansprüchen 30 und 31, dadurch gekennzeichnet, daß das dehydrierte Steroid Betamethason, Clobetason, Clocortolon,  $\Delta^1$ -11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluor-16 $\alpha$ -methylprogesteron, 11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-2'-methyl-  
10 5' $\beta$ H-pregn-4-eno[17,16-d]oxazol-3,20-dion, Deflazacort, Deflazacortalkohol, Dexamethason, Diflocortolon, Fluocinolonacetonid, Fluocortolon, Hydroxysäure und Prednisolon ist.
33. Verwendung der Oligonukleotide gemäß den Ansprüchen 28 und 29, in  
15 Verfahren zur selektiven Einführung einer Doppelbindung in ein Steroidgerüst.



```

          310      320      330      340      350      360
          |        |        |        |        |        |
Bm3os-delta-DH RD-TMGFPWGNVGGQAHQAGIIVGADTDLMDQAWWSPGLTHPDGRSAFALC---FTGGIFVN
Rr3os-delta-DH RD-SMGFPWSNLGKAHEAGIIVGADVLDMDQAWWSPGLTHPDGRSAFALC---FTGGIFVD
5 As3os-delta-DH RD-TMGFPPTNVGAAHQAAIIVGADTDLMGAEAWWSPGLTHPDGRSAFALW---FTGGIFVD
Bs3os-delta-DH AAWTSSPEGQTDVIEPGVKIGATLDLMDKVVWGAPSVIDPQQQPFVLVADRGPVNMIVVD
Mt3os-delta-DH TEWTVGASANTGDGILAAEKLGAALDLDMAWGWPTVP-LVGKPFWFALSERNSPGSI IVN
No3os-delta-DH IW-SMGFSPGPTPATRSPPELAGRRRNSLARSGVVLPGRGAARRRRRLHGR---VRGGLVVD
10 Ct3os-delta-DH LVDGNPCGRQYGDADRAGQAWAHTGADGLVLGRAHHGCSQGAGLSRHFRTLAAGVHGGQ
          .          .          .          .          .          :
          370      380      390      400      410      420
          |        |        |        |        |        |
Bm3os-delta-DH DDGKRFVNEYAPYDRLGRDIIA----GMEDGSVTLPYWMIYDDKQGRPPPIAATNVSMVE
15 Rr3os-delta-DH QDGARFTNEYAPYDRLGRDVIA----RMERGEMTLPEWMIYDDRNGEAPPVVGATNVPLVE
As3os-delta-DH GAGRRFVNESAPYDRLGRAVID----HLEGGVTPRYWVMYDHKEGSI PPVVRATNVSMVD
Bs3os-delta-DH SAGQRFENEAAAPYHEFVDTMYE----HQKTTQQAVPSWIVIDASTKSRYIFTGLFFPQAF
Mt3os-delta-DH MSGKRFMNESMPYVEACHHMYGGEHGQGPGENIPAWLVFDQRYRDRYIFAGLQPGQRI
No3os-delta-DH SPGSVPQRVASVRPVRTSHGCS-----PDDNGSAVPSFMI FDSREVTDCPPSASRTRPPP
20 Ct3os-delta-DH RQGAALPQVRVPVSGIPAAMLA----ENAKNGGVPWIVFDASFRAQNPMPGLMPGSAV
          *          .          :          :          :          *
          430      440      450      460      470      480
          |        |        |        |        |        |
25 Bm3os-delta-DH TEKYVDAGLWHTADTLE---ELAGKIGVPAENILATVERFNAMAANDVDEDFGRGDEAYD
Rr3os-delta-DH TEKYVDAGLWKTADTLE---ELAQIGVPAESLKATVARWNELAAKGVDEDFGRGDEPYD
As3os-delta-DH EEQVVAAGLWHTADTLP---ELAALIGVPADALVATVARFNELVADGYDADFGRGGEAYD
Bs3os-delta-DH PKSWFDHGIVKSAESIE---ELARQMDVLLLES LIETVNRFNDFARNGHDDDFYRGDSVYD
Mt3os-delta-DH PSRWLDSGVIVQADTLA---ELAGKAGLPADEL TATVQRFNAFARSGVDEDEYHRGESAYD
30 No3os-delta-DH STSKPEPGSVPTLSK-----NSLPRPDYRPERIAQHC RKVQRCRKLGVDEEFHHRGEDPYD
Ct3os-delta-DH PDSKVRKSWLNNVYWKGRRWKIWRADRRGRAGLQVSARRMTEYARAGKDLDFDRGGNVFD
          .          :          :          :          . * : : * * . : *
          490      500      510      520      530      540
          |        |        |        |        |        |
35 Bm3os-delta-DH RAFTGGGP----ALIPIEQGFHAAAFGISDLGTKGGLRDTAARVLDTSGNPI PGLYAA
Rr3os-delta-DH LAFTGGGS----ALVPIEQGFHAAQFGISDLGTKGGLRDTVGRVLDSEGAPI PGLYAA
As3os-delta-DH RFFSGGEP----PLVSIDEGPFHAAAFGISDLGTKGGLRDT SARVLTADGTPIGGLYAA
Bs3os-delta-DH NYYGDP TL-PNPNLAEIKKAPFYALRIY PGDIGTKGGL-VDEHARVIKADGEPIEGLYAS
40 Mt3os-delta-DH RYYGDP SNKPNPNLGEVGHPPY GAKMVPGLDGTGGIRT DVNGRALRDDGSI IDGLYAA
No3os-delta-DH AFFC PPNGGANAALTAIENGP FYAARDRLSDLGTKGGLVTDVNGRVL RADGSAIDGLYAA
Ct3os-delta-DH RYYGDP RL-KNPNLGP IEGPFYAMRLWPGEIGTKGGLLTDREGRVLD TQGRIEGLYCV
          :          * : . * : . : : * * * * : . * . * : . * * * * .
          550      560      570      580
          |        |        |        |
45 Bm3os-delta-DH GNTMAAPSGTTYPGGGNPIGTSMLF SHIAAMNIAGK-----
Rr3os-delta-DH GNTMAAPSGTVYPGGGNPIGASALFAHLSVMDAA-----
As3os-delta-DH GNTMAAPSGTTYPGGGNPIGTSMLF SHLAVRHMGTEDAR-----
50 Bs3os-delta-DH GNCSASIMGETY PGPGATIGPGMTLSFVAATTHMANTVKKEEVPLVKI--
Mt3os-delta-DH GNVSAPVMGHTY PGPGGTIGPAMTFGYLAALHIADQAGKR-----
No3os-delta-DH GNTSASV-APFYPGPGVPLGTAMVFSYRAAQDMAK-----
55 Ct3os-delta-DH GNNSASVMAPAYAGAGSTLGPAMTFAFRAVADMVGKLPLEPHLLGKTV
          ** * . . * * * . : * . : . : . : .

```

Fig. 1b

Fig. 2

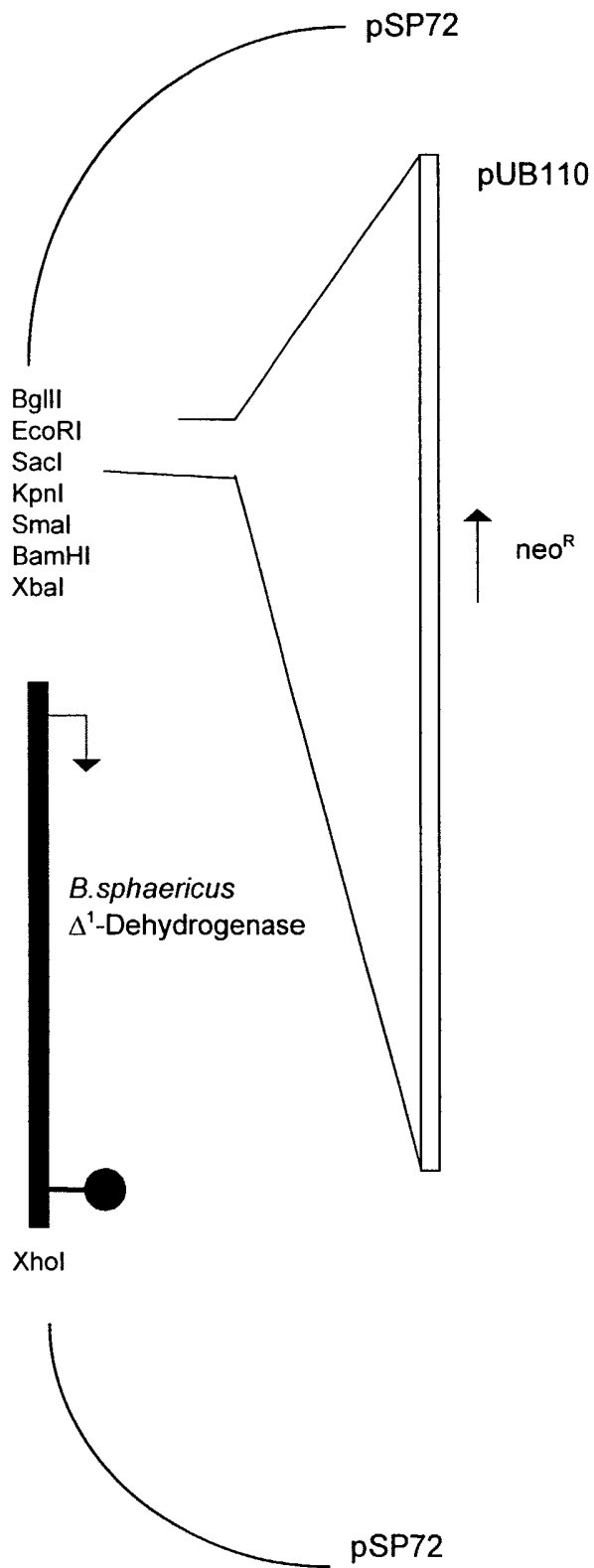


Fig. 3

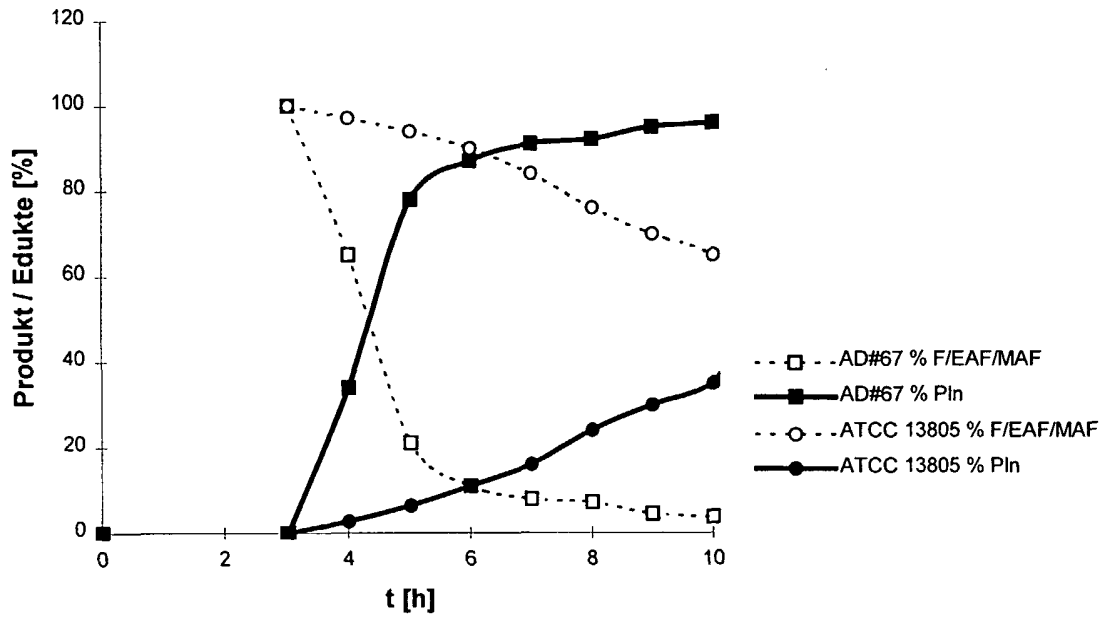


Fig. 4

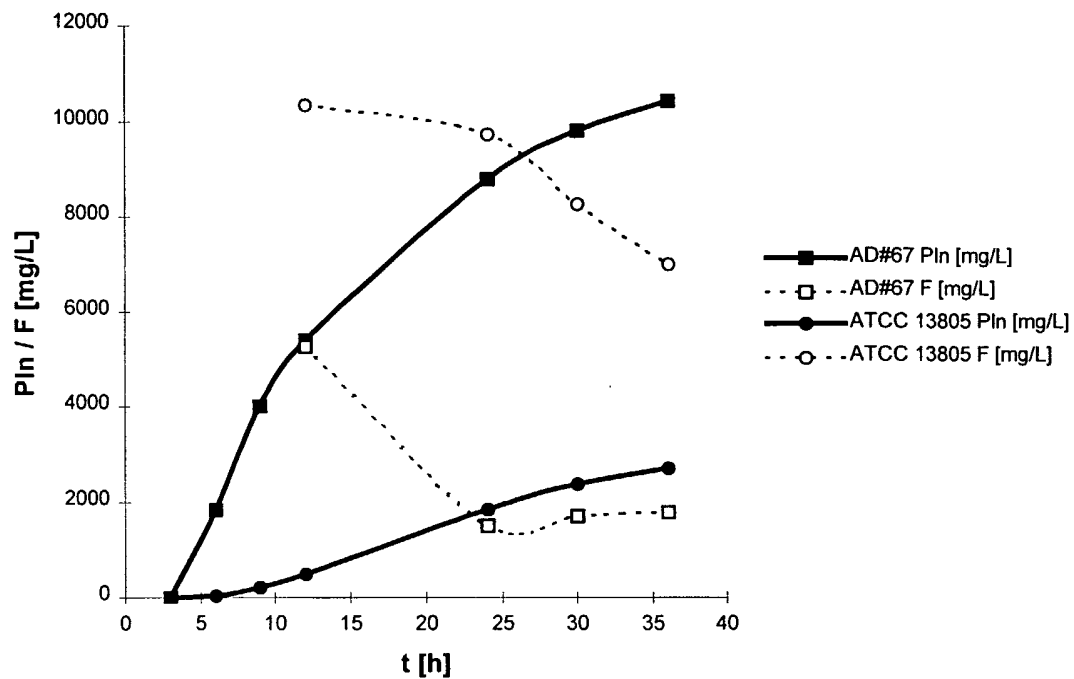


Fig. 5

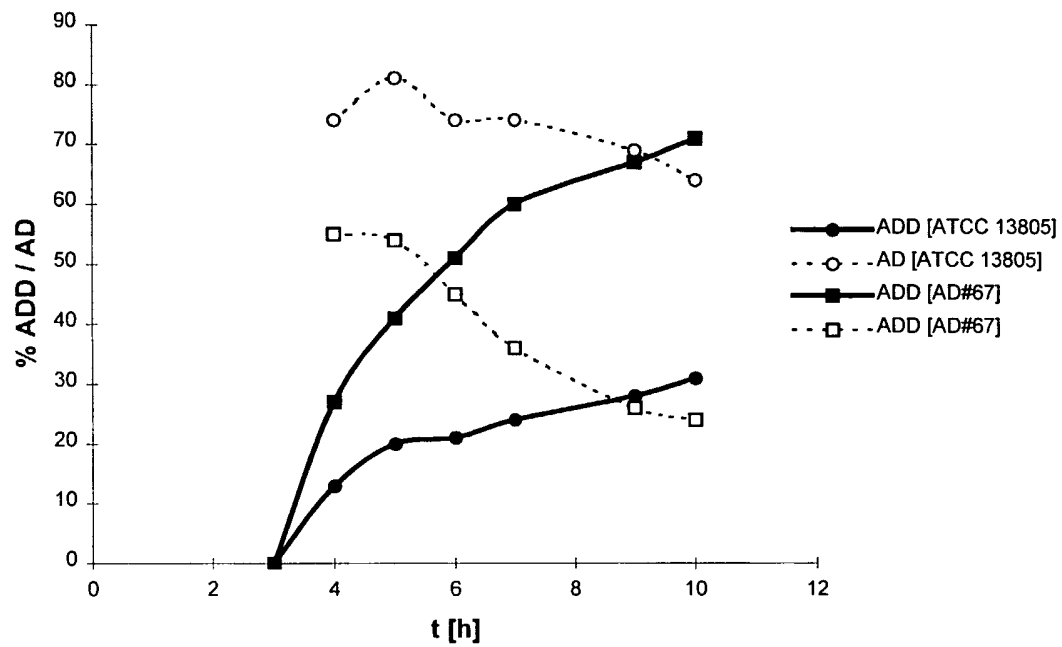


Fig. 6

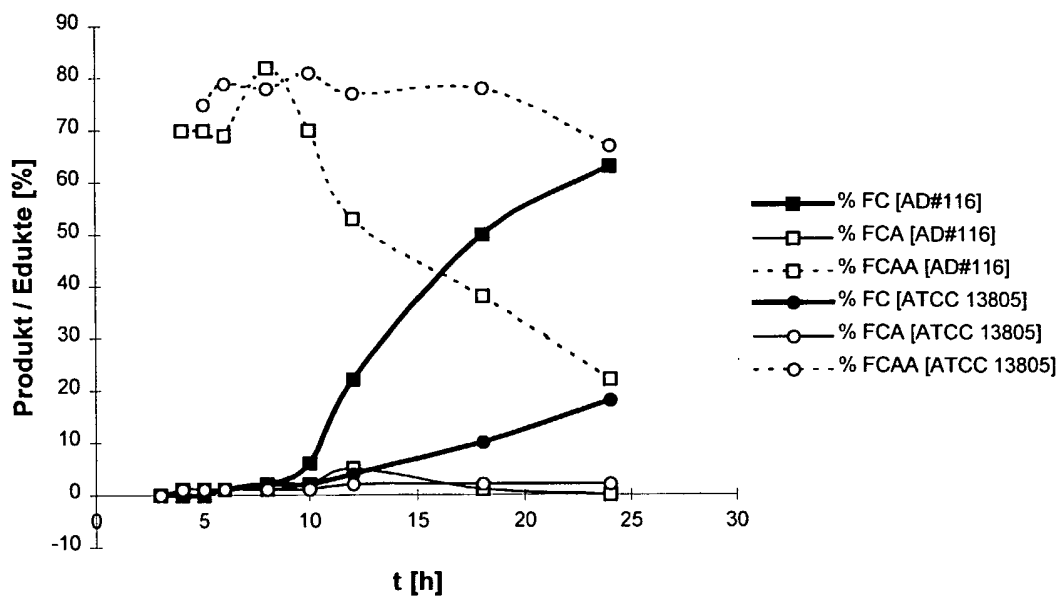


Fig. 7

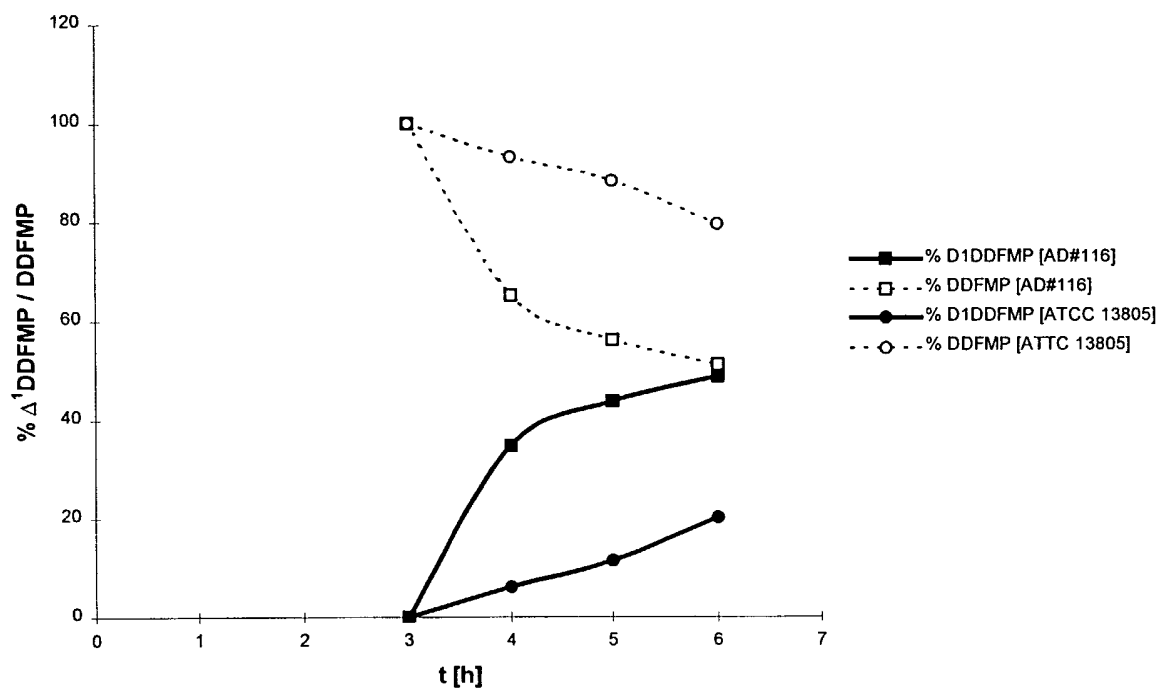


Fig. 8

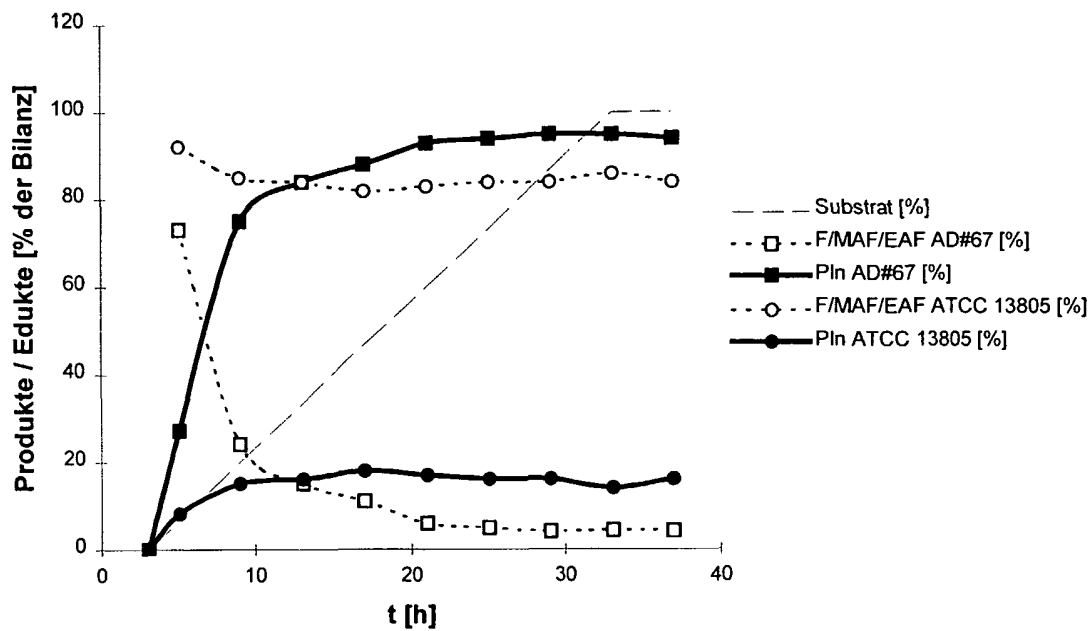


Fig. 9

